(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-242598
(P2004-242598A)
(43)公開日　平成16年9月2日(2004.9.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C07K 19/00	C07K 19/00		4B050
C12N 1/15	C12N 1/15		4B065
C12N 1/19	C12N 1/19		4H045
C12N 1/21	C12N 1/21		

審査請求 未請求　請求項の数 17　ＯＬ　（全 21 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-36827(P2003-36827)
(22)出願日　平成15年2月14日(2003.2.14)

(71)出願人　000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜２丁目２番８号
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100086405
弁理士　河宮　治
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(72)発明者　柴谷　滋郎
滋賀県大津市堅田二丁目１番１号　東洋紡績株式会社総合研究所内
(72)発明者　戸田　篤志
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素

(57)【要約】
【課題】新規β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を得る。さらにその効率的な製造方法を開発する。
【解決手段】新規ブタβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素およびその遺伝子ならびにその製造方法が提供される。さらに異種蛋白質と該新規β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素との融合蛋白質およびその遺伝子、ならびにその製造方法も提供される。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記（ａ）または（ｂ）に示すＤＮＡ：
（ａ）配列番号：１に記載の塩基配列の塩基番号５２～１２４２の塩基配列を含むＤＮＡ
（ｂ）（ａ）の配列を含むＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡ。
【請求項２】
下記（ａ）または（ｂ）に示す、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質：
（ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。
【請求項３】
請求項２記載の蛋白質をコードするＤＮＡ。
【請求項４】
請求項１または３記載のＤＮＡに相補的なＲＮＡ。
【請求項５】
請求項１または３記載のＤＮＡを含む組換えベクター。
【請求項６】
請求項５記載の組換えベクターにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。
【請求項７】
請求項１または３記載のＤＮＡあるいは請求項４記載のＲＮＡあるいは請求項５記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養し、該形質転換体からβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を採取することを特徴とする、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の製造方法。
【請求項８】
異種蛋白質と下記（ａ）または（ｂ）に示すβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質とを含み、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質：
（ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質。
【請求項９】
該β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質の膜貫通領域の一部または全部が欠失したものである請求項８記載の融合蛋白質。
【請求項１０】
異種蛋白質が糖結合性蛋白質である請求項８または９記載の融合蛋白質。
【請求項１１】
糖結合性蛋白質がマルトース結合性蛋白質である請求項１０記載の融合蛋白質。
【請求項１２】
請求項８ないし１１のいずれか１項記載の融合蛋白質をコードするＤＮＡ。
【請求項１３】
請求項１２記載のＤＮＡを含む組換えベクター。
【請求項１４】
請求項１３記載の組換えベクターにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。
【請求項１５】
請求項１２記載のＤＮＡあるいは請求項１３記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養し、該形質転換体からβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質を採取することを特徴とする、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質の製造方法。

【請求項１６】
得られる融合蛋白質において該β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質の膜貫通領域の一部または全部が欠失したものである請求項１５記載の融合蛋白質の製造方法。
【請求項１７】
糖結合性蛋白質がマルトース結合性蛋白質である請求項１５または１６記載の融合蛋白質の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性の製造方法に関する。また、本発明は、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質と異種蛋白質との融合蛋白質に関する。
【０００２】
【従来の技術】
種々の単糖がグリコシド結合により連結した糖鎖は、生体内において、細胞内オルガネラ成分、細胞表層成分、分泌糖蛋白質成分などとして存在している。糖鎖の構造は、生物種や組織特異的に異なっているが、同一生物種や同一組織内においても、その発生時期や疾病等によっても異なることから、従来考えられていた蛋白質の熱安定性、親水性、電荷、プロテアーゼ耐性等の蛋白質に対する物理的性質の付与といった機能のみならず、発生・分化、神経系、免疫系、ガンの転移等の細胞間認識に糖鎖が関与していることが明らかになり、医薬品等の種々の分野への応用の観点から、近年、非常に注目されるようになった。
【０００３】
糖鎖の合成は、生体内においては糖転移酵素によって担われている。糖転移酵素は、糖ヌクレオチドを糖供与体として、受容体となる糖鎖に糖を転移し、糖鎖の伸長を行う酵素である。糖受容体の糖鎖構造に対する糖転移酵素の特異性は厳密であり、通常、１つのグリコシド結合は対応する１つの糖転移酵素によって形成されると言われている。このような糖転移酵素は、糖鎖研究、特に有用糖鎖の簡便な合成、天然の糖鎖の修飾に利用されるという点で重要な酵素である。しかしながら、天然に存在する糖転移酵素の量は極微量であり、大量且つ安定に供給することは事実上困難であった。
【０００４】
ＧｌｃＮＡｃβ１，３　Ｇａｌの糖鎖構造（ＧｌｃＮＡｃはＮ－アセチルグルコサミン、Ｇａｌはガラクトースを示す。）は、天然の種々のオリゴ糖、糖脂質、糖蛋白質等に見出されている。なかでも、ＧｌｃＮＡｃβ１，３　Ｇａｌの構造を含むラクトサミノグリカンとして、Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３の繰り返し構造を有するポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンが、哺乳動物の種々のＮ－結合糖蛋白質（例えば、非特許文献１参照）、Ｏ－結合糖蛋白質（例えば、非特許文献２参照）および糖脂質（例えば、非特許文献３参照）に見出されている。ポリ－Ｎ－アセチルラクトサミンはＩｉ抗原と密接に関連し（例えば、非特許文献４参照）、ＡＢＨ型およびルイス型の血液型物質（例えば、非特許文献５参照）、あるいはシアリルルイスＸ等の糖鎖抗原の前駆体であり（例えば、非特許文献６参照）、細胞の分化や発生との密接な関連が研究されている。一方、Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃの構造（Ｇｌｃはグルコースを示す。）を有するラクト－Ｎ－ネオテトラース（以下、ＬＮｎＴとも示す。）は、哺乳動物においては、ネオラクト系糖脂質のコア構造であり、シアル酸、フコース等の種々の糖が結合した数十種類の糖脂質の構造が決定されている（例えば、非特許文献７参照）。
【０００５】
このようなＧｌｃＮＡｃβ１，３　Ｇａｌの糖鎖構造は、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素により合成される。β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素は、種々の哺乳動物細胞組織にその存在が確認されており（例えば、非特許文献８および９参照

）、由来により、糖蛋白質あるいは糖脂質の糖鎖に対する基質特異性が異なることが報告されている。上記のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の生体内における存在量は極めて少ないことから、ＧｌｃＮＡｃβ１，３　Ｇａｌの構造を有する糖鎖の大量合成に用いるには、遺伝子組換えによるβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の大量生産による安定した供給が必要とされる。β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡとしては、抗ｉ抗原を用いた発現クローニングによりヒト由来β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素（ｉＧｎＴ）のｃＤＮＡが最初に単離された（例えば、非特許文献１０参照）。続いて、β１，３－Ｎ－ガラクトース転移酵素と共通のモチーフをコードする、ヒトおよびマウス由来β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素のｃＤＮＡが単離されている（例えば、非特許文献１１および１２参照）。さらには、ラクトシルセラミドに特異的なラット、ヒトおよびマウス由来β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素（Ｌａｃ３Ｃｅｒ合成酵素）が見出されている（例えば、非特許文献１３および１４参照）。

上記のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡを利用して、形質転換体を作製し、組換えβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素が得られているが（例えば、非特許文献１５参照）、安定した供給が可能な大量生産のレベルには至っていない。

【０００６】

β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素のような哺乳動物由来の糖転移酵素を哺乳動物細胞において発現させて組換え酵素として得る場合、哺乳動物細胞が本来有する他の糖転移酵素の夾雑活性を完全に除去する必要があり、精製が困難になるという問題点がある。一方、大腸菌で発現させる場合、大腸菌は、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素等のＮ－アセチルグルコサミン転移酵素のみならず、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素、Ｎ－アセチルガラクトサミン転移酵素、フコース転移酵素、マンノース転移酵素等の哺乳動物に見られる糖転移酵素の酵素活性をほとんど有していないことから、精製工程が容易になり、得られた組換え酵素は、他の糖転移酵素の夾雑活性を有しない高純度の酵素であるという利点を有する。さらに、コスト面を考慮すれば、組換え蛋白質の大量生産には、大腸菌等の微生物に発現させる方法が有利である。

【０００７】

大腸菌における発現系において、目的とする遺伝子を大量に発現させ、且つ発現産物の精製を容易にする方法として、例えば、目的蛋白質をグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合蛋白質として発現させる方法がある。この方法では、ＧＳＴとの融合蛋白質はグルタチオンをリガンドとするアフィニティカラムクロマトグラフィーにより、容易に精製することができる。しかしながら、哺乳動物由来の糖転移酵素の発現にこの方法を用いた場合、発現した蛋白質の多くが不溶性の封入体（ｉｎｃｌｕｓｉｏｎ　ｂｏｄｙ）として存在することが多く、精製に際して可溶化・再生（ｒｅｎａｔｕｒａｔｉｏｎ）の工程を必要とするので、必ずしも効率的な発現系とは言えなかった。このような理由から、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を大量且つ安定に供給することは事実上困難であった。

【０００８】

【非特許文献１】

Ｅｕｒ．　Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，　９２，　２８９－３００　１９７８

【非特許文献２】

Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　Ｒｅｓ．　Ｃｏｍｍｕｎ．，　１１０，　４２４－４３１，　１９８３

【非特許文献３】

Ｅｕｒ．　Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，　７１，　９－１８，　１９７６

【非特許文献４】

ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，　１０４，　１３５－１４０，　１９７９

【非特許文献５】

Ｓｅｍｉｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，１８，３９－６２，１９８１
【非特許文献６】
Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５９，１０９２５－１０９３５，１９８４
【非特許文献７】
Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，５０，２３６－２５０，１９７２
【非特許文献８】
Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５８，３４３５－３４３７，
【非特許文献９】
１９８３；Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．，１２０，２５１－２６８，１９８３
【非特許文献１０】
Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９４，１４２９４－１４２９９，１９９７
【非特許文献１１】
Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９６，４０６－４１１，１９９９
【非特許文献１２】
Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６，３４９８－３５０７，２００１
【非特許文献１３】
Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６，２２０３２－２２０４０，２００１
【非特許文献１４】
Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６，３０２６１－３２０６９，２００１
【非特許文献１５】
Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，９，１１２３，１９９９

【０００９】
【発明が解決しようとする課題】
本発明は上記の実状を鑑みてなされたものであり、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を用いてβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を大量に生産する方法を開発することにより、糖鎖工学用試薬、糖鎖合成、糖鎖構造解析等に、安価且つ安定供給可能な当該酵素を提供することを目的とする。

【００１０】
【課題を解決するための手段および発明の実施の形態】
本発明者らは、上述したような事情に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡを単離し、本ＤＮＡがβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を発現することを見出した。さらに、遺伝子組換え技術により、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を糖結合性蛋白質との融合蛋白質として宿主に発現させると、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を可溶性蛋白質として得ることができ、容易に精製することが可能であり、得られた融合蛋白質がβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の活性を有していることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【００１１】
すなわち、本発明は、
（１）下記（ａ）または（ｂ）に示すＤＮＡ：
（ａ）配列番号：１に記載の塩基配列の塩基番号５２～１２４２の塩基配列を含むＤＮＡ
（ｂ）（ａ）の配列を含むＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡ、
（２）下記（ａ）または（ｂ）に示す、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質：
（ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加

されたアミノ酸配列からなる蛋白質、
（３）上記（２）記載の蛋白質をコードするＤＮＡ、
（４）上記（１）または（３）記載のＤＮＡに相補的なＲＮＡ、
（５）上記（１）または（３）記載のＤＮＡを含む組換えベクター、
（６）上記（５）記載の組換えベクターにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体、
（７）上記（１）または（３）記載のＤＮＡあるいは上記（４）記載のＲＮＡあるいは上記（５）記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養し、該形質転換体からβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を採取することを特徴とする、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の製造方法、
（８）異種蛋白質と下記（ａ）または（ｂ）に示すβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質とを含み、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質：
（ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質
（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、
（９）該β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質の膜貫通領域の一部または全部が欠失したものである上記（８）記載の融合蛋白質、
（１０）異種蛋白質が糖結合性蛋白質である上記（８）または（９）記載の融合蛋白質、
（１１）糖結合性蛋白質がマルトース結合性蛋白質である上記（１０）記載の融合蛋白質、
（１２）上記（８）ないし（１１）のいずれか１つに記載の融合蛋白質をコードするＤＮＡ、
（１３）上記（１２）記載のＤＮＡを含む組換えベクター、
（１４）上記（１３）記載の組換えベクターにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体、
（１５）上記（１２）記載のＤＮＡあるいは上記（１３）記載のベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養し、該形質転換体からβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質を採取することを特徴とする、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質の製造方法、
（１６）得られる融合蛋白質において該β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質の膜貫通領域の一部または全部が欠失したものである上記（１５）記載の融合蛋白質の製造方法、ならびに
（１７）糖結合性蛋白質がマルトース結合性蛋白質である上記（１５）または（１６）記載の融合蛋白質の製造方法
を提供するものである。

【００１２】

以下、本発明を具体的に説明する。
本発明の１の態様において、配列番号：１に記載の塩基配列の塩基番号５２～１２４２の塩基配列を含む新規ＤＮＡが提供される。このＤＮＡは、配列番号：２（アミノ酸１～３９７）で示される本発明の新規β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするものである。したがって、新規β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素は、典型的には、配列番号：２で示されるアミノ酸配列からなる。

【００１３】

配列番号：１に記載の塩基配列の塩基番号５２～１２４２の塩基配列を含むＤＮＡにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡも、上記（ａ）と同様の構造、機能等を有していると考えられることから、上記（ａ）に代えて上記（ｂ）のＤＮＡを用いることができる。ストリンジェントな条件とは、６Ｘ　ＳＳＣ、５Ｘ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ　ｒｅａｇｅｎｔおよび０．５％　ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ　サケ精子ＤＮＡを含む溶液中で４２℃にてハイブリダイダイズさせる条件が例示される。

【００１４】
上記のＤＮＡは、例えば、実施例に示すように、既知のヒトあるいはマウス由来のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素ｃＤＮＡの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ブタ組織由来のｃＤＮＡから、ＰＣＲによりクローニングすることができる。また、ブタ組織から抽出したトータルＲＮＡあるいはポリ（Ａ）＋ＲＮＡからＰＣＲにより、上記のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、クローニングすることもできる。
【００１５】
本発明はもう１つの態様において、配列番号：２のアミノ酸配列（アミノ酸１～３９７）からなる新規ブタ由来β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を提供する。上記のごとく、典型的には、本酵素は配列番号：２で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質であるが、配列番号：２のアミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる変異蛋白質であってもよい。ただし、かかる変異蛋白であっても、配列番号：２で示されるアミノ酸配列からなる新規β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素と実質的に同じ活性を有している。本明細書において、本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素および実質的に同じ活性を有する変異蛋白をまとめてβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素と称することがある。
【００１６】
本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素は後で説明するように組換え法により製造することができる。さらに、当業者に公知の方法、例えば部位特異的突然変異誘発法等を用いて本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素中の所望位置のアミノ酸を変化させることもでき、かくして変異β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を得ることもできる。
【００１７】
本発明において製造されるβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素は、糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にβ１，３結合によりＮ－アセチルグルコサミンを転移する活性を有するものが好ましい。また、Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃの非還元末端に存在するガラクトース残基もしくは（Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３）ｎの繰り返し構造を有するポリＮ－アセチルラクトサミンにβ１，３結合によりＮ－アセチルグルコサミンを転移する活性を有するものが好ましい。
【００１８】
Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性は、例えば、Ｎ－アセチルグルコサミン供与体としてウリジン－５’－ジホスホ－Ｎ－アセチルグルコサミン（以下、ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃと略することがある）を用い、ＬＮｎＴへのＮ－アセチルグルコサミンの転移反応を利用した活性測定法により測定できる。
【００１９】
本発明は、もう１つの態様において、上記β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素あるいはその変異蛋白をコードするＤＮＡを提供する。本明細書において、上記β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素あるいはその変異蛋白をコードするＤＮＡをまとめて本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素コードするＤＮＡと称することがある。当業者は公知の方法を用いて本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素コードするＤＮＡ中の所望位置のヌクレオチドを変化させることができ、かかるＤＮＡは変異β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするものである。また、元々変異したβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を有する個体から変異β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素および／または変異β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡを得ることもできる。
【００２０】
本発明はさらなる態様において、上記ＤＮＡに対して相補的なＲＮＡも提供する。
【００２１】
さらに本発明は、もう１つの態様において、上記ＤＮＡを含む組換えベクターを提供する

。
【００２２】
本発明の組換えベクターは、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等において、前記のＤＮＡを発現させるためのベクターであり、特に限定されない。具体的には、形質転換する宿主に応じて、様々なものが使用できる。例えば、大腸菌では、ｐＭＡＬ系、ｐＵＣ１９、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ、ｐＥＴ系等、酵母では、ｐＹＥＵｒａ３ＴＭ等、昆虫細胞では、ｐＢＬＵＥ　Ｂａｃ４等、動物細胞では、ｐＳＶＫ３等、植物細胞では、ｐＢＩ１２１等が挙げられる。
【００２３】
上記宿主細胞に前記ＤＮＡまたはＲＮＡを導入して本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素あるいはその変異蛋白を発現する形質転換体を作製することができる。かかる形質転換体は、前記組換えベクターにより形質転換されて作製されたものである。形質転換の宿主は、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等が例示される。形質転換体は、公知のコンピテント細胞、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リポソーム法、ＤＥＡＥデキストラン法等を用いて、細胞に組換えベクターを導入することによって作製される。
【００２４】
本発明はさらなる態様において、本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡあるいはそれらに相補的なＲＮＡあるいは本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡを担持するベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養し、該形質転換体からβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を採取することを特徴とする、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の製造方法を提供する。上記形質転換体を適切な条件下で培養・増殖させて本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素あるいはその変異蛋白を生成せしめ、これを適当な単離・精製手段により培地から取り出すことができる。
形質転換体の培養ならびに生成蛋白の単離・精製等の詳細については、後述する本発明の融合蛋白質の製造に関する説明を参照すれば当業者に明らかである。
【００２５】
本発明は、もう１つの態様において、上記のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素と異種蛋白質との融合蛋白質を提供する。本発明の融合蛋白は本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素と実質的に同じ活性を有している。本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の活性およびその測定方法については前記したとおりである。かかる融合蛋白において、本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素部分は実質的に同じ活性を有する変異蛋白であってもよく、該変異蛋白については前記説明を参照のこと。
【００２６】
前記融合蛋白質の異種蛋白質としては、マルトース結合性蛋白質（以下、ＭＢＰと示すこともある。）等の糖結合性蛋白質、ＧＳＴ、Ｈｉｓ、ＦＬＡＧ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ等が例示される。
【００２７】
本発明において、糖結合性蛋白質とは、糖もしくは糖残基を有する少糖類及び多糖類に対して高い親和性を保持する蛋白質である。該糖結合性蛋白質は、いかなる生物種に由来するものでもよい。具体的には、マルトース結合性蛋白質、セルロース結合性蛋白質、キチン結合性蛋白質、各種レクチン等が例示される。なかでも、マルトース結合性蛋白質（ＭＢＰ）は、以下の点から、特に好ましい。ＭＢＰをコードするＤＮＡを含む発現ベクターを用いて大腸菌で発現させることにより、ｉｎｃｌｕｓｉｏｎ　ｂｏｄｙの形成が低減し、大量の可溶性の融合蛋白質を容易に得ることができる。目的の融合蛋白質は、マルトース結合性蛋白質と特異的に結合する各種糖残基を含むリガンドを結合した不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製することができる。さらに、このような担体に結合させた融合蛋白質は、高純度の固定化酵素としても利用可能である。

【００２８】
ＭＢＰは、マルトース又はマルトース残基を有する少糖類（例えば、マルトトリオース等）もしくは多糖類（例えば、アミロース等）に対して特異的親和性を有する部位を有していれば、必ずしもその全配列を含む必要はなく、該配列の一部を含むものであってもよい。したがって、公知のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列からなり、マルトース又はマルトース残基を有する少糖類（例えば、マルトトリオース等）もしくは多糖類（例えば、アミロース等）に対して特異的親和性を有する部位を有する蛋白質も、本発明におけるＭＢＰに含めることができる。
【００２９】
また、本発明はさらなる態様において、上記融合蛋白をコードするＤＮＡ、かかるＤＮＡを含む組換えベクター、ならびにかかる組換えベクターにより宿主を形質転換して得られる形質転換体を提供する。
【００３０】
本発明において、ＭＢＰをコードするＤＮＡは、マルトース又はマルトース残基を有する少糖類もしくは多糖類に対して特異的親和性を有する翻訳産物をコードする限り、必ずしもコード領域の全てを含む必要はなく、該コード領域の一部を含むものであってもよい。その由来は特に限定されるものではないが、ｐＭＡＬ－ｐ２、ｐＭＡＬ－ｃ２（いずれも、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）等のｐＭＡＬ系ベクターに由来するものが挙げられる。
【００３１】
本発明において、上記の融合蛋白質をコードするＤＮＡは、異種蛋白質をコードするＤＮＡと、Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするＤＮＡを、結果的に上記の性質を有する融合蛋白質として翻訳されるように、イン・フレームに連結したキメラＤＮＡである。
【００３２】
また本発明の融合蛋白質において、本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素のアミノ酸配列の膜貫通領域の一部または全部が欠失されていることも、膜蛋白質であるβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素を、精製工程において取扱いの容易な可溶性画分の蛋白質として発現させることが可能になるという点から好ましい。
したがって、本発明は、本発明のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素のアミノ酸配列の膜貫通領域の一部または全部が欠失されている融合蛋白質ならびにそれをコードするＤＮＡも包含する。
【００３３】
上記の融合蛋白質の製造方法としては、組換え法が一般的であり、これについて以下に説明する。
上記の融合蛋白質をコードするＤＮＡを含む組換えベクターは、Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質として翻訳されるように、前記のＤＮＡを発現させるためのベクターであり、特に限定されない。具体的には、形質転換する宿主に応じて、様々なものが使用できる。例えば、Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするｃＤＮＡをｐＭＡＬ－ｐ２に挿入することにより、目的の組換えベクターを得ることができる。
【００３４】
前記の組換えベクターは、上記の糖結合性蛋白質－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするキメラＤＮＡが、大腸菌で機能し得るプロモーターの制御下におかれた、任意の発現ベクターである。該プロモーター領域には、ＲＮＡポリメラーゼの結合位置を決定するコンセンサス配列である－３５領域及び－１０領域が含まれる。所望の組換え蛋白質を大量に発現させる系として、誘導酵素のプロモーター領域を使用することがより好ましい。このようなプロモーター領域として、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、ｌｐｐプロモーター、ｔａｃプロモーター等が挙げられる。これらのプロモーター領域は、リプレッサー蛋白質が結合するオペレーターをさらに含む。誘導物質（例えば、ｌａｃプロモーターではラクトースやＩＰＴＧ）を添加するとリプレッサ

ー蛋白質のオペレーターへの結合が抑制され、プロモーターの制御下におかれた遺伝子が大量に発現する。また、該組換えベクターは、翻訳開始コドンの上流にコンセンサスなＳｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ（ＳＤ）配列を含む。さらに、該発現ベクターは、糖結合性蛋白質－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするキメラＤＮＡの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然又は合成のターミネーターを用いることができる。本発明の組換えベクターは、上記のプロモーター領域及びターミネーター領域に加えて、宿主大腸菌内で自律複製し得る複製起点を含む必要がある。このような複製起点としては、ＣｏｌＥｌ　ｏｒｉ、Ｍ１３　ｏｒｉ等が挙げられる。

【００３５】

形質転換体は、公知の方法を用いて前記組換えベクターにより形質転換されて作製されたものを包含する。形質転換の宿主は、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等が例示される（上記参照）。なかでも、大腸菌が特に好ましい。大腸菌の場合、その菌株は特に限定されず、例えば、市販のＸＬ１－Ｂｌｕｅ株、ＢＬ－２１株、ＪＭ１０７株、ＴＢ１株、ＪＭ１０９株、Ｃ６００株、ＤＨ５α株、ＨＢ１０１株等が挙げられる。

【００３６】

本発明は、もう１つの態様において、上記融合蛋白質をコードするＤＮＡあるいは上記融合蛋白質をコードするＤＮＡを担持するベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養し、該形質転換体からβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質を採取することを特徴とする、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する融合蛋白質の製造方法を提供する。形質転換の宿主は、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等が例示される。形質転換体は、公知のコンピテント細胞、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リポソーム法、ＤＥＡＥデキストラン法等を用いて、細胞に組換えベクターを導入することによって作製される。

【００３７】

例えば、上述のｐＭＡＬ－ｐ２から得られた組換えベクターにより形質転換した大腸菌ＪＭ１０９株を用いる場合、用いられる培地としては、炭素源としてグルコース、フルクトース、グリセロール、スターチなどの炭水化物を含有するものである。また無機もしくは有機窒素源（例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物等）を含んでいてもよい。これらの炭素源及び窒素源は、純粋な形で使用する必要はなく、純度の低いものも微量の生育因子や無機栄養素を豊富に含んでいるので有利である。さらに所望により、他の栄養源（例えば、無機塩（例えば、二リン酸ナトリウム又は二リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンＢ１）、抗生物質（例えば、アンピシリン、カナマイシン）など）を培地中に添加してもよい。

【００３８】

形質転換体の培養は、通常ｐＨ５．５～８．５、好適には６～８、通常１８～４０℃、好適には２０～３５℃で１～１５０時間行われるが、これらは培養条件及び培養規模により適宜変更することができる。

【００３９】

融合蛋白質の発現が、誘導蛋白質遺伝子のプロモーター系により制御される場合、誘導物質は培養開始時から添加しておいてもよいが、対数増殖期初期に添加するのがより好ましい。誘導物質の添加時期や添加濃度は、培養条件、培養規模、誘導物質の種類等によって適宜変更することができる。

【００４０】

本発明の方法では、融合蛋白質の精製は、該融合蛋白質の存在する画分を、その糖結合性蛋白質と特異的に結合する各種糖残基を含むリガンドを結合した不溶性担体を用いたアフィニティクロマトグラフィに供することにより達成することができる。また。リガンドとして該糖結合性蛋白質に特異的な抗体（モノクロナール抗体もしくはポリクロナール抗体

）を用いてもよい。精製方法としては、例えば、硫酸アンモニウムによる塩析、遠心分離、透析、限外濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、電気泳動法等が挙げられ、これらを組み合わせることにより、該融合蛋白質を精製することができる。

【００４１】

上記方法で得られる融合蛋白質において該β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質の膜貫通領域の一部または全部が欠失していてもよい。

また、上記方法で得られる融合蛋白質において糖結合性蛋白質がマルトース結合性蛋白質であるのが好ましい。

【００４２】

【実施例】

以下、実施例を挙げることにより、本発明をより具体的に説明する。なお、本発明は実施例に特に限定されるものではない。

【００４３】

実施例１：β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素　ｃＤＮＡのクローニング

ブタ肝臓トータルＲＮＡ（フナコシ）から、ＰｏｌｙＡＴｒａｃｔ　ｍＲＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ＳｙｓｔｅｍＩＶ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を用い、ｍＲＮＡを抽出した。得られたｍＲＮＡを鋳型として、ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）を用い、添付のプロトコルに従い、ｃＤＮＡを調製した。

続いて、β１，３－ガラクトース転移酵素と共通のモチーフをコードする、ヒトおよびマウス由来β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素ｃＤＮＡ（Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ，　９６，　４０６－４１１，　１９９９）の相同性を基に、数種類のＰＣＲプライマーを作製した。これらのＰＣＲプライマーを用いて、ＫＯＤ　Ｄａｓｈ　ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡績製）を用いて、上記のｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲ（９６℃・１２０秒の変性の後、９４℃・３０秒、６０℃・２秒、７４℃・６０秒を３０サイクル）を行った。このＰＣＲ反応液を１．５％アガロース電気泳動に供し、増幅断片を得た。ＰＣＲ産物を精製し、ＤＮＡシーケンサーＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ３１０　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（ＰＥ　Ａｐｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）により配列を決定した。その結果、５’プライマー（５’－ＡＴＣＣＴＧＡＴＧＡＴＧＧＣＡＡＡＴＧＴＣＴＴＣ－３’（配列番号：３））および３’プライマー（５’－ＡＴＣＡＡＡＴＧＴＣＣＴＧＡＡＧＣＣＴＴＴＧＴＧ－３’（配列番号：４））を用いたＰＣＲの結果、ヒトおよびマウス由来β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素ｃＤＮＡと相同性の高い配列が得られた。次に、ＬＡ　ＰＣＲ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（寶酒造製）を用い、５’上流側および３’下流側の未知領域の増幅を行い、単一のＯＲＦを有するｃＤＮＡ配列を得た。尚、ＤＮＡポリメラーゼによるミスリーディングを補正するため、複数のクローンから配列を決定した。

【００４４】

実施例２：β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素のＣＯＳ－１細胞における発現

上述のクローニングで得られた単一のＯＲＦを含むｃＤＮＡ断片をＰＣＲで増幅した。ＰＣＲプライマーは、ＫｐｎＩ部位を有する５’プライマー（５’－ＧＧＧＧＴＡＣＣＧＡＡＴＧＡＧＴＧＴＴＧＧＡＣＣＴＣ－３’（配列番号：５））およびＸｂａＩ部位を有するプライマー（５’－ＧＣＴＣＴＡＧＡＣＴＴＡＧＡＧＧＣＣＣＴＣＡＡＡＴＧＧＡＣＡＣＴ－３’（配列番号：６））を用いた。これらのＰＣＲプライマーを用いて、ＫＯＤ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、上記のｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲ（９４℃・１２０秒の熱変性の後、９４℃・１５秒、６０℃・３０秒、６８℃・９０秒を３０サイクル）を行った。得られた増幅断片を発現ベクターｐＳＶＫ３の制限酵素切断部位に挿入し、発現プラスミドｐＳＶＫ３－β１，３－ＧｎＴを作製した。ジーンパルサー（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社）を用いたエレクトロポレーションにより、発現プラスミドｐＳＶＫ３－β１，３－ＧｎＴをＣＯＳ－１細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を４

８時間培養した後、遠心分離により回収し、超音波破砕機で破砕した。得られた破砕物を遠心し、上清を粗抽出液として回収した。
上記粗抽出液を用いて、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性の確認を行った。活性測定の基質には、公知の方法（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０５，５４７－５５５，１９８９）により、２－アミノピリジンで蛍光標識したオリゴ糖鎖（ＰＡ化糖鎖）を用いた。受容体基質には、ＰＡ化ラクト－Ｎ－ネオテトラオース（Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃ－ＰＡ）を用いた。また、ＰＡ化ｐａｒａ－ラクトーＮ－ネオヘキサオース（Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃ－ＰＡ）をβガラクトシダーゼで処理して末端のガラクトース残基を除去して得られたＰＡ化５糖（ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４ＧｌｃＮＡｃβ１，３Ｇａｌβ１，４Ｇｌｃ－ＰＡ）を生成物の標準品として用いた。糖供与体としてＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃを用い、これを加えない系を対照とした。１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＮａＯＨ緩衝液（ｐＨ７．０）、１５ｍＭ $MnCl_2$、２０ｍＭ ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ、０．１ｍＭ ＬＮｎＴ－ＰＡおよび上記酵素液を含む反応液１０μｌを３７℃にて１２時間反応させた。反応液を３分間煮沸することにより反応を停止させた後、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）に供した。コントロールとしてｍｏｃｋ ｐＳＶＫ３を導入したＣＯＳ－１細胞の破砕物のβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。発現プラスミドｐＳＶＫ３－β１，３－ＧｎＴを導入されたＣＯＳ－１細胞粗抽出液のＨＰＬＣの結果は図１に示す通りである。図１より明らかなように、糖供与体が共存する場合にのみ、反応生成物のピークが確認された。反応時間の経過と共に、そのピーク強度が強くなることも確認された。コントロールでは、反応生成物のピークはほとんど検出されなかったのに対し、該β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を含む発現プラスミドを導入されたＣＯＳ－１細胞では１６．８ｐｍｏｌ／ｈ／ｍｇ蛋白質の活性値を示した。この結果から、上述のクローニングで得られた遺伝子はβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素をコードするｃＤＮＡであることが示された。

【００４５】

実施例３：β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の大腸菌における発現

Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の膜貫通領域を含むＮ末端側のアミノ酸（配列番号：２のアミノ酸番号１から５５まで）を欠損させたｃＤＮＡ断片をＰＣＲで増幅した。ＰＣＲプライマーは、ＢａｍＨＩ切断部位を有する５’プライマー（５’－ＣＣＧＧＡＴＣＣＡＡＧＧＣＡＴＡＴＴＧＧＡＡＣＡＧＧ－３’（配列番号：７））およびＸｂａＩ切断部位を有する３’プライマー（５’－ＣＧＴＣＴＡＧＡＣＴＴＡＧＡＧＧＣＣＣＴＣＡＡＡＴＧＧＡＣＡＣＴ－３’（配列番号：８））を用いた。これらのＰＣＲプライマーを用いて、ＫＯＤ Ｐｌｕｓ ＤＮＡポリメラーゼを用いて、上記のｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲ（９４℃・１５秒、５５℃・３０秒、６８℃・９０秒を３０サイクル）を行った。得られた増幅断片を発現ベクターｐＭＡＬ－ｐ２の制限酵素切断部位に挿入し、発現プラスミドｐＭＡＬ－ｐ２－β１，３－ＧｎＴを作製した。
発現プラスミドｐＭＡＬ－ｐ２－β１，３－ＧｎＴを有する大腸菌ＪＭ１０９をアンピシリン（５０μｇ／ｍｌ）および０．２％グルコースを含むＬＢ培地１０ｍｌ中にて、３７℃で終夜培養を行い、さらにこの培養液２５０μｌを、同培地２５ｍｌに接種して３７℃、３時間の培養を行い、２５℃に温度を下げた後、イソプロピルチオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を最終濃度０．３ｍＭとなるように加えて、組換え蛋白質の発現誘導を行った。菌体を遠心分離により集め、２００ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ２－メルカプトエタノールを含む２０ｍＭ トリス緩衝液（ｐＨ７．５）で懸濁し、超音波処理により菌体を破砕した。懸濁液を遠心分離し、上清を無細胞抽出液として回収した。この無細胞抽出液のウエスタンブロッティングを抗ＭＢＰウサギ抗血清を用いて行った結果、ＭＢＰとβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の融合蛋白質と推定される分子量約８５，０００のバンドが検出された（図２）。

【００４６】

上記無細胞抽出液を、Ａｍｙｌｏｓｅ ｒｅｓｉｎ ｃｏｌｕｍｎ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂ社）を用いて精製し、得られた溶出画分について、実施例２と同様に、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を測定した。

【００４７】

ＨＰＬＣの結果は図３に示す通りである。図３より明らかなように、糖供与体が共存する場合にのみ、反応生成物のピークが確認された。反応時間の経過と共に、そのピーク強度が強くなることも確認された。したがって、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を確認することができた。

【００４８】

【発明の効果】

上述したように、本発明により、新規ブタβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素およびその組換え法による製造方法が提供される。また、β１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素活性を有する蛋白質と異種蛋白質との融合蛋白質およびその製造方法が提供される。本発明の方法は組換え法によるので、糖鎖工学用試薬、糖鎖合成、糖鎖構造解析等に有用な酵素を大量に得ることができる。

【００４９】

【配列表フリーテキスト】

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．１
Ａ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｅｎｃｏｄｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．２
Ａｎ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．３
Ａ ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｃＤＮＡ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．４
Ａ ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｃＤＮＡ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．５
Ａ ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｃＤＮＡ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．６
Ａ ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｃＤＮＡ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．７
Ａ ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｃＤＮＡ．
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ．８
Ａ ｐｒｉｍｅｒ ｆｏｒ ａｍｐｌｉｆｙｉｎｇ ｂｅｔａ－１，３－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｃＤＮＡ．

【００５０】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Toyo Boseki Kabushiki Kaisha

〈120〉 Beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase

〈130〉

〈140〉
〈141〉

〈160〉8

〈170〉 PatentIn Ver.2.1

〈210〉 1
〈211〉 1356
〈212〉 DNA
〈213〉 Sus scrofa

〈220〉
〈223〉Inventor: Shibatani, Shigeo; Toda, Atsushi; Nishimura, Shin-ichiro

〈400〉 1

aatgatctaa ttaatacagt gctcctgtct tttttgtttc agatatgaga aatgagtgtt 60
ggacgtcgaa gaataaagtt gttgggaatc ctgatgatgg taaatgtctt catttatctg 120
attgtggaag tctccaaaag cagtagccaa gagaaaaatg gaaaggggga agtaataata 180
cccaaagaaa agttctggaa gatatctgaa ccccccaagg catattggaa cagggaacaa 240
gaaaagctca acaggaggta caatcccatc ttgaacatgt tagccaacca gacgggggag 300

gcgtatggat tttccaacat aagccatctg aattattgtg aacctgacct gagggtcacg 360
tccgtcgttt ccgattttga cagtttgcca gacagattta aagactttct gttgtatttg 420
agatgtcgga attattcact gcttatcgac caaccagata agtgtgcaaa gaagcccttc 480
ttactgctgg caattaagtc ccttacttca cacttcgata gaaggcaagc gattcgggaa 540
tcttggggca aagagaccaa tgtnaggaac cagacagtgg tgcgtgtctt cttactgggc 600
cagacgcccc ccgaggacaa ccatcctgac ctttcagata tgctgaaatt tgagagtgag 660
aagcaccaag acattctcat gtggaactac agagacactt tcttcaactt gtctctgaaa 720
gaagtgctct ttctcaggtg ggtgagcact tcttgcccaa acgctgaatt cgttttcaag 780
ggcgacgacg atgtctttgt gaacacccac cacatcctga attacttgaa cagcttgtcc 840
aagaacaaag ccaaagattt gtttataggc gatgtgattc acaatgccgg acctcatcga 900
gataagaaac tcaaatacta catcccagaa gttgtttaca ctggcgtcta cccgccttat 960
gcaggggggcg gtggattcct ctactccggc cacctggccc tgaggctgta caatgtcact 1020
gaccaggtcc ttctctaccc catcgacgac gtctatactg gaatgtgcct tcagaaactc 1080
ggcctcgttc cagagaaaca caaaggcttc aggacctttg atatagaaga gaaaaacagg 1140
aataacattt gttcctacct aggtttgatg ctagtacaca gtagaaaacc gcaagagatg 1200
attgatattt ggtctcgact gcaaaatgct catttaagtt gctaaattat gtacaaactc 1260
cgttttgcat agaaagacat agctaacata gttcccatgt tgtgtgttct ctcacattag 1320
gggtaatttc tgtgttcaac catcaaaatt gccttt 1356

〈210〉 2
〈211〉 397
〈212〉 PRT
〈213〉 Sus scrofa

〈400〉 2

Met Ser Val Gly Arg Arg Arg Ile Lys Leu Leu Gly Ile Leu Met Met
1 5 10 15

Val Asn Val Phe Ile Tyr Leu Ile Val Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Glu Lys Asn Gly Lys Gly Glu Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe
35 40 45

Trp Lys Ile Ser Glu Pro Pro Lys Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu
50 55 60

Lys Leu Asn Arg Arg Tyr Asn Pro Ile Leu Asn Met Leu Ala Asn Gln
65 70 75 80

Thr Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Ser Asn Ile Ser His Leu Asn Tyr Cys
85 90 95

Glu Pro Asp Leu Arg Val Thr Ser Val Val Ser Asp Phe Asp Ser Leu
100 105 110

Pro Asp Arg Phe Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr
115 120 125

Ser Leu Leu Ile Asp Gln Pro Asp Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu
130 135 140

Leu Leu Ala Ile Lys Ser Leu Thr Ser His Phe Asp Arg Arg Gln Ala
145 150 155 160

Ile Arg Glu Ser Trp Gly Lys Glu Thr Asn Val Arg Asn Gln Thr Val
165 170 175

Val Arg Val Phe Leu Leu Gly Gln Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro
180 185 190

Asp Leu Ser Asp Met Leu Lys Phe Glu Ser Glu Lys His Gln Asp Ile
195 200 205

Leu Met Trp Asn Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu
210 215 220

Val Leu Phe Leu Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asn Ala Glu Phe
225 230 235 240

Val Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu
245 250 255

Asn Tyr Leu Asn Ser Leu Ser Lys Asn Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile
260 265 270

Gly Asp Val Ile His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys
275 280 285

Tyr Tyr Ile Pro Glu Val Val Tyr Thr Gly Val Tyr Pro Pro Tyr Ala
290 295 300

Gly Gly Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Gly His Leu Ala Leu Arg Leu Tyr
305 310 315 320

Asn Val Thr Asp Gln Val Leu Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr
325 330 335

Gly Met Cys Leu Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly
340 345 350

Phe Arg Thr Phe Asp Ile Glu Glu Lys Asn Arg Asn Asn Ile Cys Ser
355 360 365

Tyr Leu Gly Leu Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile
370 375 380

Asp Ile Trp Ser Arg Leu Gln Asn Ala His Leu Ser Cys
385 390 395

〈210〉 3
〈211〉
〈212〉 DNA
〈213〉

〈400〉 3
atcctgatga tggcaaatgt cttc 24

〈210〉 4
〈211〉
〈212〉 DNA
〈213〉

〈400〉 4
atcaaatgtc ctgaagcctt tgtg 24

〈210〉 5
〈211〉
〈212〉 DNA
〈213〉

〈400〉 5
ggggtaccga aatgagtgtt ggacctc 27

〈210〉 6
〈211〉
〈212〉 DNA
〈213〉

〈400〉 6
gctctagact tagaggccct caaatggaca ct 32

〈210〉 7
〈211〉
〈212〉 DNA
〈213〉

〈400〉 7
ccggatccaa ggcatattgg aacagg 26

〈210〉 8
〈211〉
〈212〉 DNA
〈213〉

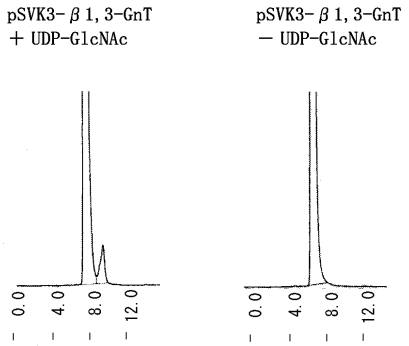
〈400〉 8
cgtctagact tagaggccct caaatggaca ct 32

【図面の簡単な説明】
【図１】図１はＨＰＬＣにより、ＣＯＳ－１細胞において発現させたβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の活性を確認した結果を示す。

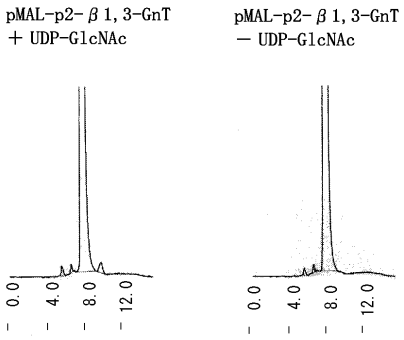
【図２】図２は、発現プラスミドｐＭＡＬ－ｐ２－β１，３－ＧｎＴを有する大腸菌ＪＭ１０９株の無細胞抽出液のウエスタンブロッティングの結果を示す。レーン１、２、３および４は、ＩＰＴＧの添加による発現誘導開始０、３、７および２０時間後の無細胞抽出液の結果をそれぞれ示す。

【図３】図３はＨＰＬＣにより、大腸菌ＪＭ１０９株において発現させたβ１，３－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素の活性を確認した結果を示す。

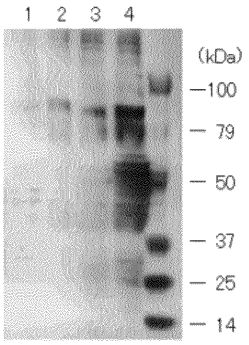
【図１】



【図３】



【図２】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	5/10	Ｃ１２Ｎ	9/10		
Ｃ１２Ｎ	9/10	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ａ	

(72)発明者　西村　紳一郎
北海道札幌市中央区北九条西１６丁目１－１－３０２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA10 BA63 BA80 CA04 DA01 DA02 DA06 DA11
EA04 GA11 HA08 HA11
4B050 CC03 CC05 DD11 EE10 LL01 LL02 LL05
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA91Y AB01 CA29 CA44 CA60
4H045 AA10 AA20 BA09 BA41 CA40 DA89 EA01 EA20 EA60 FA74