(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 195 36 506 B4** 2006.02.16

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **195 36 506.2**
(22) Anmeldetag: **29.09.1995**
(43) Offenlegungstag: **04.04.1996**
(45) Veröffentlichungstag der Patenterteilung: **16.02.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/78*** (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten(§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:
235737/94 29.09.1994 JP

(73) Patentinhaber:
Kikkoman Corp., Noda, Chiba, JP

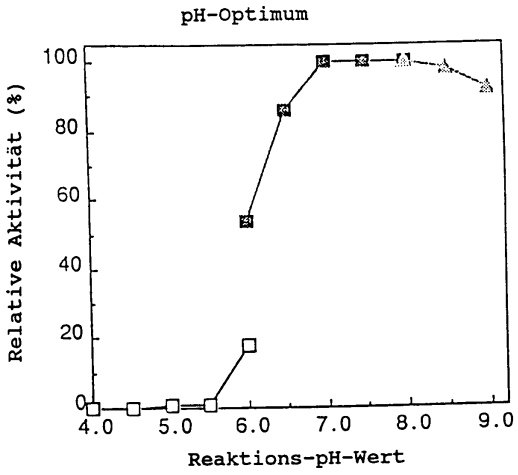
(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Furukawa, Keisuke, Noda, Chiba, JP; Ichikawa, Toshio, Noda, Chiba, JP; Suzuki, Masaru, Noda, Chiba, JP; Koyama, Yasuji, Noda, Chiba, JP

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Die somatische Gentherapie: Entwicklung und Anwendung aus ethischer Sicht. GRAUMANN, S., A. Francke Verlag, Tübingen und Basel (2000), S. 94-97 (gutachtlich);
Pat. Abstr. of Jp., zu JP 55034029 A vom vom 10.03.1980;
Pat. Abstr. of Jp., zu JP 62208281 A vom 12.09.1987;

(54) Bezeichnung: **Neues Creatin-Amidinohydrolase-Gen, neue rekombinante DNA und Verfahren zur Herstellung von Creatin-Amidinohydrolase**

(57) Hauptanspruch: DNA-Molekül, das ein Protein mit Creatin-Amidinohydrolase-Aktivität codiert,
wobei das Protein die folgenden Merkmale umfasst:
(a) die codierte N-terminale Aminosäuresequenz ist Met Thr Asp Asp Met Leu His Val Met Lys;
(b) die codierte C-terminale Aminosäuresequenz ist Phe Gly Pro Glu His Asn Ile Ile Arg Asn; und
(c) es hat die von dem DNA-Molekül, das in die HpaI-Insertionsstelle des E. coli Transformanten hinterlegt als FERM BP-4803, inseriert ist, codierten 404 Aminosäuren;
und wobei das DNA-Molekül unter stringenten Bedingungen zum Komplementärstrang der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Nucleotidsequenz hybridisiert.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein DNA-Molekül, das ein Protein mit der enzymatischen Aktivität der Creatin-Amidinohydrolase codiert, die für den quantitativen Nachweis von Creatin nützlich ist, einen das DNA-Molekül enthaltenden Vektor und ein Verfahren zur Herstellung von Creatin-Amidinohydrolase durch Züchtung eines den Vektor enthaltenden Mikroorganismus.

[0002] Creatin-Amidinohydrolase ist ein Enzym, das die Hydrolyse von Creatin zu Sarcosin und Harnstoff katalysiert. Dieses Enzym kann als diagnostisches Reagens für eine Vielzahl von Krankheiten, einschließlich Nierenkrankheiten, verwendet werden, um die Menge von Creatin in menschlichem Serum oder Urin zu bestimmen.

[0003] Die herkömmliche Creatin-Amidinohydrolase ist jedoch ungünstig, da der pH-Bereich, in dem sie stabil ist, auf pH 4,5 bis 8,5 beschränkt ist, so daß eine Reinigung bei pH-Werten, die über pH 8,5 liegen, schwierig ist. Außerdem führt ihr hoher Km-Wert dazu, daß die Messung einer Probe eine lange Zeit in Anspruch nimmt.

Stand der Technik

[0004] Unter diesen Umständen fanden die Erfinder, daß eine neue Creatin-Amidinohydrolase mit niedrigem Km-Wert, die in einem großen pH-Bereich stabil ist, aus Alcaligenes sp. KS-85 (FERM BP-4487) erhalten werden kann, der in Creatin enthaltendem Medium gezüchtet wird, und reichten eine Patentanmeldung für dieses Enzym ein (Japanische Patentanmeldung Nr. 318675/1993).

Aufgabenstellung

[0005] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines ein Protein mit der enzymatischen Aktivität der Creatin-Amidinohydrolase codierenden DNA-Moleküls, mit dem Creatin-Amidinohydrolase gentechnisch hergestellt werden kann, eines das DNA-Molekül enthaltenden Vektors und eines Verfahrens zur Herstellung von Creatin-Amidinohydrolase unter Verwendung des Vektors.

[0006] Zur Lösung der Aufgabe isolierten die Erfinder erfolgreich ein Creatin-Amidinohydrolase-Gen aus Alcaligenes und ermittelten dessen Struktur. Außerdem erhielten die Erfinder durch Einfügen des Creatin-Amidinohydrolase-Gens in eine Vektor-DNA eine rekombinante DNA, mit der sie einen zur Gattung Escherichia gehörenden Stamm transformierten, wobei sie zu dem Ergebnis kamen, daß die resultierende Transformante die Creatin-Amidinohydrolase effizient herstellen kann, ohne daß dem Medium Creatin zugesetzt werden muß.

[0007] Die Aufgabe wird somit durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Moleküle, die Creatin-Amidinohydrolase mit der unter Seq ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren.

[0009] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung DNA-Moleküle, die eine DNA-Sequenz mit der unter Seq ID NO. 1 angegebenen Nucleotidsequenz umfassen.

[0010] Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls DNA-Moleküle, die mit den oben genannten erfindungsgemäßen DNA-Molekülen hybridisieren. Solche DNA-Moleküle umfassen beispielsweise Fragmente, Modifikationen, Derivate und allele Varianten der vorstehend beschriebenen DNA-Moleküle. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter stringenten Hybridisierungsbedingungen wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Diese DNA-Moleküle, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Molekülen hybridisieren; können prinzipiell aus jedem beliebigen Organismus (d.h. Prokaryonten oder Eukaryonten, insbesondere aus Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen oder tierischen Organismen) stammen, der derartige DNA-Moleküle besitzt. Sie stammen vorzugsweise aus dem Mikroorganismus Alcaligenes, insbesondere Alcaligenes sp. KS-85.

[0011] DNA-Moleküle, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Organismen isoliert werden.

[0012] Die Identifizierung und Isolierung derartiger DNA-Moleküle kann dabei unter Verwendung der erfin-

dungsgemäßen DNA-Moleküle oder Teile dieser DNA-Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

[0013] Als Hybridisierungsprobe können z.B. DNA-Moleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID NO. 2 angegebene DNA-Sequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten DNA-Fragmenten kann es sich auch um synthetische DNA-Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen DNA-Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

[0014] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung DNA-Moleküle, deren Sequenzen aufgrund des genetischen Codes degeneriert sind im Vergleich zu den Sequenzen der obengenannten DNA-Moleküle und die Creatin-Amidinohydrolase codieren.

[0015] Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen DNA-Moleküle enthalten.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen DNA-Moleküle verknüpft mit DNA-Elementen, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

[0017] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische Zellen, die ein oben beschriebenes erfindungsgemäßes DNA-Molekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Zellen der Gattung Escherichia.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität der Creatin-Amidinohydrolase durch die Züchtung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen, die bevorzugt zur Gattung Escherichia gehören und befähigt sind, mit Hilfe der rekombinanten DNA Creatin-Amidinohydrolase herzustellen, und die anschließende Gewinnung eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität der Creatin-Amidinohydrolase aus der Kultur.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0019] Fig. 1 zeigt das pH-Optimum der Creatin-Amidinohydrolase, die gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde.

Bedingungen der Messung:

[0020] Bei jedem pH-Wert wurde im entsprechenden Puffer 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Menge des durch die Enzymreaktion erzeugten Harnstoffs wurde gemessen.

Puffer für die Reaktionslösung

—□— 50 mmol/l Natriumacetat-Salzsäure-Puffer
—■— 50 mmol/l Phosphatpuffer
—▲— 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer

[0021] Fig. 2 zeigt das Temperatur-Optimum der Creatin-Amidinohydrolase, die gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde.

Bedingungen der Messung:

[0022] In 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,7, wurde 10 Minuten bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Die Menge des durch die Enzymreaktion erzeugten Harnstoffs wurde gemessen.

[0023] Fig. 3 zeigt den pH-Bereich, in welchem die Creatin-Amidinohydrolase, die gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, stabil ist.

Bedingungen der Behandlung:

[0024] Die Behandlung beim jeweiligen pH-Wert erfolgte für 17 Stunden bei 25°C
—□— 50 mM Natriumacetat-Salzsäure-Puffer
—●— 50 mM Phosphatpuffer
—△— 50 mM Tris-HCl-Puffer
—×— 50 mM Glycin-NaOH-Puffer
---◇--- 50 mM CAPS-Puffer

[0025] Fig. 4 zeigt die thermische Stabilität der Creatin-Amidinohydrolase, die gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erhalten wurde.

Bedingungen der Behandlung:

[0026] In 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, wurde 30 Minuten bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert.

Bedingungen der Messung:

[0027] In 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,7, wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Menge des durch die Enzymreaktion erzeugten Harnstoffs wurde gemessen.

[0028] Das erfindungsgemäße Creatin-Amidinohydrolase-Gen kann z.B. folgendermaßen erhalten werden. Alcaligenes sp. KS-85 wird gezüchtet, wie z.B. in "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley Interscience, 1989) beschrieben. Die auf diese Weise gezüchteten Bakterien werden einer Extraktion unterworfen, wodurch genomische DNA erhalten wird.

[0029] Alcaligenes sp. KS-85 ist ein Stamm, der aus Bodenproben in der Kyoto-Präfektur, Japan, durch Absuchverfahren erhalten wurde, seine mikrobiologischen Eigenschaften werden nachstehend beschrieben. Die meisten mikrobiologischen Eigenschaften wurden gemäß den Verfahren identifiziert, die von Takeharu Hasegawa in "Biseibutsu no Bunrui to Doutei" (Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien), Tokyo University Press (1975), beschrieben werden. Als Referenz für die Klassifizierung und Identifizierung verwendeten die Erfinder außerdem "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", B. Aufl. (1974).

Mikrobiologische Eigenschaften von Alcaligenes sp KS-85

(A) Morphologische Eigenschaften

[0030] Beobachtet unter einem Mikroskop (nach 24- bis 48-stündiger Züchtung bei 30°C auf Fleischbrühe-Agarmedium, pH 9,0)

(1) Zellform und -größe: 0,5 bis 1,0 × 0,5 bis 4,0 μm, stäbchenförmiges Bakterium
(2) Beweglichkeit: beweglich durch umgebende Flagellen
(3) Spore: fehlt
(4) Gram-Färbbarkeit: negativ
(5) Säurefestigkeit: negativ

(B) Wachstumszustand in verschiedenen Medien (pH 8 0)

(1) Fleischbrühe-Agarplattenkultur:

[0031] Blaßgelbe und weißliche runde Kolonien von 2 bis 3 mm Durchmesser erscheinen nach fünf Tagen Züchtung bei 30°C. Die Oberfläche ist glatt und fettartig glänzend mit einem transparenten Rand.

(2) Fleischbrühe-Agarschrägkultur:

[0032] Der Mikroorganismus wächst in neun Tagen stationärer Kultur bei 30°C, wobei er sich auf dem Medium ausbreitet. Der Mikroorganismus ist beige und erzeugt kein Pigment.

(3) Fleischbrühe-Flüssigkultur:

[0033] Der Mikroorganismus wächst in neun Tagen stationärer Kultur bei 30°C, wobei an der Oberfläche des

Flüssigmediums eine Membran entsteht und am Boden Niederschläge erzeugt werden.

(4) Fleischbrühe-Gelatine-Kultur:

[0034] Der Mikroorganismus wächst in 30 Tagen stationärer Kultur bei 20°C nur oben auf dem Medium, wobei die Gelatine nicht verflüssigt wird.

(5) Lackmus-Milch:

[0035] Lackmus-Milch wird in neun Tagen stationärer Kultur bei 30°C nicht verfestigt oder verflüssigt, während im Medium Alkali produziert wird, wodurch der ursprüngliche pH-Wert des Mediums ansteigt.

(C) Physiologische Eigenschaften:

[0036] Die meisten der folgenden Tests wurden in Medien durchgeführt, deren pH-Wert auf 6,5 eingestellt war.

(1) Nitratreduktion: nicht reduziert
(2) Denitrifikation: fehlt (Nitrit wird unter aeroben Bedingungen erzeugt.)
(3) MR-Test: negativs
(4) VP-Test: negativ
(5) Indolbildung: nicht gebildet
(6) Hydrogensulfidbildung: nicht gebildet
(7) Stärkehydrolyse: nicht hydrolysiert
(8) Citronensäureverwertung: nicht verwertet
(9) Verwertung anorganischer Stickstoffquellen: nicht verwertet (Nitrat und Ammoniumsalz)
(10) Pigmentbildung: nicht gebildet
(11) Urease: negativ
(12) Oxidase: positiv
(13) Katalase: positiv
(14) Temperatur- und pH-Bereich für das Wachstum: 15 bis 45°C und pH 6,0 bis 9,0
(15) Verhalten gegenüber Sauerstoff: aerob
(16) O-F-Test (Hugh-Leifson-Verfahren): weder Oxidation noch Fermentation finden statt.
(17) Bildung von Säure und Gas aus Zucker: keine

[0037] (Die getesteten Zucker sind: L-Arabinose, D-Xylose, D-Glucose, D-Mannose, D-Fructose, D-Galactose, Maltose, Saccharose, Lactose, Trehalose, D-Sorbit, D-Mannit, Inosit, Glycerin und Stärke.)

[0038] Der vorliegende Stamm wurde nach den vorstehend beschriebenen mikrobiologischen Eigenschaften identifiziert, er wurde der Gattung Alcaligenes zugeordnet und mit Alcaligenes sp. KS-85 bezeichnet. Dieser Stamm wurden als FERM BP-4487 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, hinterlegt.

[0039] Die wie vorstehend beschrieben hergestellte genomische DNA wird sodann mit einem Restriktionsenzym, wie z.B. EcoRI, partiell gespalten und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, wodurch DNA-Fragmente als EcoRI-Spaltprodukte erhalten werden, die vorzugsweise eine Länge von 2 bis 5 kb aufweisen. Diese können gegebenenfalls, z.B. mit alkalischer Phosphatase, weiter behandelt werden, ferner können sie nach Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Phenolextraktion, gereinigt werden und außerdem nach bestimmten Verfahren, einschließlich Ethanolfällung, eingeengt werden, wodurch gereinigte DNA-Fragmente erhalten werden, die das gewünschte Creatin-Amidinohydrolase-Gen enthalten.

[0040] Als Vektor-DNA, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann eine Bakteriophagenvektor-DNA, Plasmidvektor-DNA und dergleichen erwähnt werden, wobei vorzugsweise insbesondere Plasmid pUC118 (Takara Shuzo Co., Ltd.) und dergleichen eingesetzt werden. Zur Ligierung des vorstehend hergestellten EcoRI-Spaltproduktes ist die Spaltung des Plasmidvektors mit EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) erforderlich, gegebenenfalls kann das Spaltprodukt mit Ethanol gefällt werden.

[0041] Anschließend wird das vorstehende genomische DNA-Fragment, das das aus Alcaligenes stammende, gewünschte Gen enthält, in Gegenwart einer Ligase, wie z.B. T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim), an den vorstehenden, mit EcoRI gespaltenen Plasmidvektor ligiert, wodurch eine rekombinante Plasmid-DNA erhalten wird.

[0042] Diese rekombinante DNA kann verwendet werden, um Wirte, wie z.B. E. coli K12, vorzugsweise E. coli JM109 (erhältlich von Toyobo), XL-Blue (erhältlich von Funakoshi) und dgl., zu transformieren, wodurch Kolonien erhalten werden können, die rekombinante DNAs mit verschiedenen Genfragmenten umfassen.

[0043] Die resultierenden Kolonien können nach solchen Kolonien abgesucht werden, die eine rekombinante DNA mit dem gewünschten Creatin-Amidinohydrolase-Gen enthalten, hierfür wird eine Koloniehybridisierung eingesetzt, die in den vorstehend erwähnten "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley Interscience, 1989) beschrieben wird, wobei ein Oligonucleotid, das durch Endmarkierung des in Beispiel 1, Punkt (3), erhaltenen Genfragmentes mit Digoxigenin (Boehringer Mannheim) hergestellt wird, als Sonde eingesetzt werden kann.

[0044] Die resultierende rekombinante DNA, die das gewünschte Creatin-Amidinohydrolase-Gen enthält, kann durch Techniken, wie z.B. CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und dergleichen, gereinigt werden.

[0045] Die auf diese Weise gereinigte Plasmid-DNA wird für die Sequenzierung des Creatin-Amidinohydrolase-Gens verwendet, wie in Beispiel 1, Punkt (4), beschrieben, und die durch diese Nucleotidsequenz codierte Aminosäuresequenz bestimmt. Diese Aminosäuresequenz wird in SEQ ID NR. 2 gezeigt. Das Gen, das diese ermittelte Aminosäuresequenz codiert, ist das Creatin-Amidinohydrolase-Gen der vorliegenden Erfindung.

[0046] Da die das Gen enthaltende rekombinante DNA, die wie vorstehend erhalten wurde, keinen Promotor für die Expression in E. coli umfaßte, erzeugten Bakterien, die mit dieser rekombinanten DNA transformiert waren, keine Creatin-Amidinohydrolase. Aus diesem Grund müssen Transformanten, die die Creatin-Amidinohydrolase auch tatsächlich produzieren, gemäß der nachstehenden Beschreibung hergestellt werden.

[0047] Eine DNA, die ausschließlich aus einem Bereich besteht, der Creatin-Amidinohydrolase codiert, wird in der Polymerasekettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction", nachstehend abgekürzt PCR) erhalten, wobei das vorstehend gereinigte rekombinante Plasmid als Matrize eingesetzt wird und zwei synthetische Oligonucleotid-Primer verwendet werden, die aus 30 Nucleotiden bestehen, welche 10 Aminosäuren im N- bzw. C-Terminus des Creatin-Amidinohydrolase-Gens codieren (die C-terminale Seite ist die komplementäre Kette). Die auf diese Weise erhaltene DNA wird in eine Vektor-DNA eingefügt, die eine DNA-Sequenz enthält, die einen Promotor, Operator, eine Ribosomenbindungsstelle und dgl. umfaßt, hergeleitet vom E. coli-Lactose-Operon und dgl. (vgl. "The Operon", S. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980). Die verwendete Vektor-DNA umfaßt z.B. Plasmid-DNA, Bakteriophagen-DNA und dergleichen. Die auf diese Weise konstruierte rekombinante DNA wird zur Transformation oder Transduktion von Wirten, wie z.B. E. coli K12, vorzugsweise JM109 (Toyobo), XL-Blue (Funakoshi) und dgl., eingesetzt, wodurch jeweils eine Transformante erhalten wird.

[0048] Die Transformation kann auch nach dem Verfahren von D. M. Morrison (Methods in Enzymology 68 (1979), 326-331), die Transduktion nach dem Verfahren von B. Hohn (Methods in Enzymology 68 (1979), 299-309) durchgeführt werden.

[0049] Der zur Gattung Escherichia gehörende Stamm, auf den die Befähigung zur Herstellung von Creatin-Amidinohydrolase übertragen wurde, wie vorstehend beschrieben, kann eingesetzt werden, um die Creatin-Amidinohydrolase folgendermaßen zu produzieren.

[0050] Die Bakterien können nach herkömmlichen Züchtungsverfahren in festem Medium, vorzugsweise in flüssigem Medium, gezüchtet werden.

[0051] Zur Züchtung der Bakterien wird ein Medium verwendet, enthaltend eine oder mehrere Stickstoffquellen, wie z.B. Hefeextrakt, Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser und ein Soja- oder Weizenkleie-Exsudat, ein oder mehrere anorganische Salze, wie z.B. Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Eisen(III)-chlorid, Eisen(III)-sulfat und Mangansulfat, gegebenenfalls Zucker oder Kohlenhydrate und Vitamine.

[0052] Der anfängliche pH-Wert des Mediums wird vorzugsweise auf einen Wert im Bereich von pH 7 bis 9 eingestellt, sodann werden die Bakterien 6 bis 24 Stunden bei 30 bis 42°C, vorzugsweise bei etwa 37°C, in Submerskultur unter Belüftung mit Rühren, in Schüttelkultur, in stationärer Kultur und dergleichen gezüchtet. Nach Beendigung der Züchtung können herkömmliche Verfahren zur Gewinnung eingesetzt werden, um die Creatin-Amidinohydrolase aus der Kultur zu erhalten.

[0053] Die Bakterien werden aus der Kultur durch Filtration, Zentrifugation oder dergleichen abgetrennt. Die

Bakterien können zwar auch nach dem Waschen direkt anstelle des Enzyms verwendet werden, vorzusweise wird jedoch die Creatin-Amidinohydrolase gewonnen, indem z.B. die Bakterien in einer Ultraschallapparatur, French Press, Mühle oder dergleichen aufgeschlossen werden, die Zellwand mit lytischen Enzymen, wie z.B. Lysozym, lysiert wird oder das Enzym mit einem oberflächenaktiven Mittel, wie z.B. Triton X-100, extrahiert wird.

[0054] Die auf diese Weise erhaltene rohe Enzymlösung kann sodann herkömmlichen Verfahren unterworfen werden, vorzugsweise einer geeigneten Kombination aus Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Fällung mit organischem Lösungsmittel, Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltrations-Chromatographie, Adsorptions-Chromatographie, Elektrophorese und dergleichen, wodurch die Creatin-Amidinohydrolase isoliert wird.

[0055] Die physikalisch-chemischen, enzymatischen Eigenschaften der resultierenden Creatin-Amidinohydrolase sehen folgendermaßen aus:

(1) Wirkung

[0056] 1 Mol Creatin wird hydrolysiert, wobei 1 Mol Sarcosin und 1 Mol Harnstoff erzeugt werden.

(2) Substratspezifität:

[0057] Spezifisch für Creatin

(3) pH-Optimum:

[0058] Die Aktivität des vorliegenden Enzyms wurde bei verschiedenen pH-Werten in 50 mmol/l Natriumacetat-Salzsäure-Puffer (pH 4,0 bis 6,0), 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0 bis 7,5) und 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5 bis 9,0) bestimmt. Das Ergebnis zeigte, wie aus **Fig. 1** ersichtlich ist, daß das pH-Optimum des vorliegenden Enzyms im Bereich von pH 7,0 bis 9,0 liegt.

(4) Temperatur-Optimum:

[0059] Die Aktivität des vorliegenden Enzyms wurde bei verschiedenen Temperaturen in den gleichen Reaktionslösun gen wie im nachstehenden Punkt (7) bestimmt. Das Ergebnis zeigte, wie aus **Fig. 2** ersichtlich ist, daß das Temperatur-Optimum des vorliegenden Enzyms im Bereich von 35 bis 45°C liegt.

(5) pH-Bereich, in dem das Enzym stabil ist:

[0060] Die Aktivität des vorliegenden Enzyms wurde nach einer 17-stündigen Behandlung bei 25°C mit verschiedenen pH-Werten von 4,0 bis 11,0 in 50 mM Natriumacetat-Salzsäure-Puffer (pH 4,0 bis 6,0), 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0 bis 8,0), 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0 bis 9,0), 50 mM Glycin-NaOH-Puffer (pH 9,0 bis 10,0) und 50 mM CAPS-Puffer (pH 10,0 bis 11,0) ermittelt. Das Ergebnis zeigte, wie aus **Fig. 3** ersichtlich ist, daß der pH-Bereich, in welchem das vorliegende Enzym stabil ist, der Bereich von pH 5,0 bis 10,5 ist.

(6) Hitzestabilität:

[0061] Das Enzym wurde 30 Minuten bei den vorher ermittelten Temperaturen in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, behandelt. Das Ergebnis zeigte, wie aus **Fig. 4** ersichtlich ist, daß das Enzym bei Temperaturen bis zu etwa 45°C stabil ist.

(7) Verfahren zur Messung der Enzymaktivität:

[0062] Die Messung der Enzymaktivität wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. 1 U Enzymaktivität ist als die Menge definiert, die die Erzeugung von 1 µMol Harnstoff pro Minute bewirkt.

Herstellung der Reagentien

Lösung 1 (Substratlösung)

[0063] 6,63 g Creatin werden in 500 ml 50 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,7, gelöst.

Lösung 2 (Lösung, die eine Färbung erzeugt)

[0064] 10 g ρ-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 500 ml Ethanol (Reagens mit garantierter Qualität) gelöst und anschließend mit einem Gemisch aus 575 ml entionisiertem Wasser und 75 ml konzentrierter Salzsäure gemischt.

Meßverfahren

1) 0,9 ml von Lösung 1 werden als Substrat 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert.
2) 0,1 ml Enzymlösung (eingestellt auf etwa 1 bis 2 U/ml) werden mit dem Substrat gemischt und 10 Minuten bei 37°C umgesetzt.
3) Sodann werden 2 ml von Lösung 2 mit der Reaktionslösung gemischt.
4) Anschließend wird das Gemisch 20 Minuten bei 25°C stehengelassen und die Absorption bei 435 nm gemessen (OD Probe).
5) Als Blindprobe werden 0,9 ml von Lösung 1 10 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend 2 ml von Lösung 2 und 0,1 ml Enzymlösung mit der Lösung 1 gemischt und das Gemisch 20 Minuten bei 25°C stehengelassen, sodann wird die Absorption bei 435 nm gemessen (OD Blindwert).

Berechnung der Aktivität

U/ml = Δ OD × 18,06* × Verdünnungsstufe

(18,06* ist ein Koeffizient, der aus einer Harnstoff-Eichkurve errechnet wurde.)

(8) Inhibitoren:

[0065] Die Wirkung der Metallsalze in Tabelle 1 wurde untersucht, indem das jeweilige Salz zur Reaktionslösung im vorstehenden Punkt (7) zugesetzt wurde. Das Ergebnis zeigte, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, daß das vorliegende Enzym durch $AgNO_3$, $HgCl_2$ und $CuSO_4$ stark gehemmt wurde.

Tabelle 1

Ergebnis der Hemmung

(Zugesetzt zum Substrat)

Inhibitor	Endkonzentration (~~mM~~)	relative Aktivität (%)
keiner	0	100
$AgNO_3$	1	1
$HgCl_2$	1	1,9
$CuSO_4$	1	3,3

(Zugesetzt zur Enzymlösung)

Inhibitor	Endkonzentration (mM)	relative Aktivität (%)
keiner	0	100
$AgNO_3$	1	1
$HgCl_2$	1	1,7
$CuSO_4$	1	3,4

(9) Km-Wert:

[0066] Der Km-Wert wurde aus Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt, er betrug $1,3 \times 10^{-2}$ mol/l (für Creatin).

(10) Molekulargewicht:

[0067] Die Gelfiltration durch eine TSK Gel G3000SWXL-Säule ergab ein Molekulargewicht von 80 000 ± 5 000.

Wirkung der Erfindung

[0068] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann Creatin-Amidinohydrolase effizient hergestellt werden, ohne daß dem Medium Creatin zugesetzt werden muß.

Beispiel

[0069] Die vorliegende Erfindung wird anhand des folgenden Beispiels genauer beschrieben, dieses Beispiel soll jedoch den Umfang der Patentansprüche in keiner Weise einschränken.

(1) Herstellung von genomischer DNA aus Alcaligenes sp. KS-85

[0070] Alcaligenes sp. KS-85 (FERM BP-4487) wurde in 200 ml TY-Medium (1 % Bacto-Pepton, 0,5 % Pepton, 0,25 % NaCl) geimpft und 20 Stunden bei 30°C unter Schütteln gezüchtet. Die Bakterien wurden geerntet, indem die Kultur 10 Minuten bei 6000 UpM zentrifugiert wurde, und anschließend in 25 ml Sorbitlösung (0,9 mol/l Sorbit, 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 0,1 mol/l EDTA) suspendiert. Gemäß "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley Interscience, 1989) wurden 500 µg genomische DNA aus der Suspension erhalten.

(2) Herstellung einer DNA-Genbank

[0071] 100 µg der vorstehenden genomischen DNA wurden mit EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd:) partiell gespalten und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, wobei 10 µg Fragmente mit einer Größe von 2 bis 5 kb als EcoRI-Spaltprodukte erhalten wurden. 1 µg der Plasmidvektor-pUC118-DNA (Takara Shuzo Co., Ltd.) wurde mit EcoRI gespalten und durch 1 Einheit T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) mit 2 µg des vorstehenden EcoRI-Spaltproduktes der genomischen DNA ligiert. Das resultierende Plasmid wurde gemäß dem Verfahren von D. M. Morrison (Methods in Enzymology 68 (1979), 326-331) in E. coli JM109 transformiert, wodurch 600 Kolonien erhalten wurden, die sodann auf ein Nylon-Membranfilter Hybond-N^+ (Produkt von Amersham) geblottet wurden, wobei die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden.

(3) Isolierung des Creatin-Amidinohydrolase-Gens mittels Koloniehybridisierung

[0072] Der Plasmidvektor pLK501, der ein Creatin-Amidinohydrolase-Gen enthielt, hergeleitet aus der Gattung Flavobacterium (Japanische offengelegte Patentveröffentlichung Nr. 205786/1987), wurde mit den zwei Restriktionsenzymen SpII und SmaI partiell gespalten und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Ein Teil des Creatin-Amidinohydrolase-Gens mit einer Länge von 1,2 kb wurde aus dem Gel eluiert und mit "GENECLEAN II" (Funakoshi) weiter gereinigt. Dieses Genfragment wurde mit Digoxigenin endmarkiert, wobei ein "DIG Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) verwendet wurde, und als Sonde für die Koloniehybridisierung eingesetzt. Durch die Koloniehybridisierung gemäß "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley Interscience, 1989) wurden zwei positive Kolonien nachgewiesen.

(4) Analyse des Creatin-Amidinohydrolase-Gens

[0073] Eine Plasmid-DNA, die das gewünschte Creatin-Amidinohydrolase-Gen enthielt, wurde aus einer der vorstehenden zwei positiven Kolonien durch Ultrazentrifugation abgetrennt und anschließend mit EcoRI gespalten. Es wurde gefunden, daß dieses EcoRI-Spaltprodukt ein genomisches DNA-Fragment mit einer Länge von etwa 2,5 kb enthielt, das aus Alcaligenes stammte. Sodann wurde die Nucleotidsequenz dieser Plasmid-DNA mit einem "Kilo Sequence Deletion Kit" (Takara Shuzo Co., Ltd.) und "370 DNA Sequencing System" (Applied Biosystems) ermittelt. Die auf diese Weise ermittelte Nucleotidsequenz ist in SEQ ID NR. 1 dargestellt, die hierdurch codierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NR. 2 wiedergegeben. Das Creatin-Amidinohydrolase-Gen besitzt eine codierende Region, die aus 1215 Nucleotiden besteht, welche 404 Aminosäuren codieren.

(5) Herstellung des transformierten E. coli JM109 (pUCE100)

[0074] Der Expressionsvektor pUTE100 wurde folgendermaßen konstruiert, wie in der Japanischen offenge-

legten Patentveröffentlichung Nr. 317055/1993 beschrieben. Die DNA des Plasmidvektors pBR322 wurde mit EcoRI und NruI gespalten sodann unter Verwendung eines "DNA Blunting Kits" (Takara Shuzo Co., Ltd.) mit glatten Enden versehen, durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit "GENECLEAN II" (Funakoshi) gereinigt, wodurch ein etwa 3,4 kb großes DNA-Fragment erhalten wurde, das einen Replikationsursprung enthielt. Dieses DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase cyclisiert und mit EcoRI gespalten, wodurch ein lineares Fragment als EcoRI-Spaltprodukt erhalten wurde. Unabhängig davon wurde eine DNA-Sequenz, welche die folgende Expressions-Regulations-Region, umfassend einen Promotor, Operator, eine Ribosomenbindungsstelle und dgl., hergeleitet vom E. coli-Lactose-Operon und dgl., und eine HpaI-Restriktionsstelle (vgl. "The Operon", S. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980) enthielt,

```
AATTCGGTACCGGATCCGCTAGCTTTACATTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGATGGAA
    GCCATGGCCTAGGCGATCGAAATGTAATACGAAGGCCGAGCATATTACACTACCTT

    TTGTGAGCGGATAACAATTCCATCGTTAGGAGGTTTTAGTTAACTAAACTAGTAGA
    AACACTCGCCTATTGTTAAGGTAGCAATCCTCCAAAATCAATTGATTTGATCATCT

    TCTGGTACCG
    AGACCATGGCTTAA
```

im DNA-Synthesizer Modell 392 (Applied Biosystems) synthetisiert und sodann an das vorstehende EcoRI-Spaltprodukt ligiert, wodurch der Expressionsvektor pUTE100 erhalten wurde.

[0075] Anschließend wurde durch PCR eine Region synthetisiert, die ausschließlich die Creatin-Amidinohydrolase codiert, wobei das "Geneamp DNA Amplification Reagent Kit" mit AmpliTaq (Takara Shuzo Co., Ltd.) verwendet wurde, hierfür wurden die Oligonucleotide SEQ ID NR. 3 und 4, die die N- bzw. C-terminalen Aminosäuresequenzen der Creatin-Amidinohydrolase codieren und die im DNA Synthesizer Modell 392 (Applied Biosystems) synthetisiert wurden, als Primer eingesetzt und das im vorstehenden Punkt (4) erhaltene EcoRI-Spaltprodukt als Matrize verwendet. Das resultierende Fragment wurde in eine HpaI-Stelle der vorstehend erhaltenen Expressionsplasmidvektor-pUTE100-DNA eingefügt, wodurch die rekombinante Plasmid-DNA pUCEl00 erhalten wurde.

[0076] Die Transformation von E. coli JM109 (Toyobo) mit der rekombinanten Plasmid-DNA pUCE100 nach dem Verfahren von D. M. Morrison (Methods in Enzymology 68 (1979), 326-331) ergab eine Transformante (pUCE100) von E. coli JM109. Diese Transformante wurde als FERM BP-4803 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, hinterlegt. Dieser transformierte E. coli JM109 (pUCE100) wurde unter Schütteln 16 Stunden in TY-Medium (1 % Bacto-Pepton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,0), das 1 mmol/l Isopropyl-β-D-galactosid enthielt, gezüchtet. Die Aktivität der Creatin-Amidinohydrolase, die gemäß dem vorstehend beschriebenen Meßverfahren unter Verwendung einer Harnstoff-Eichkurve bestimmt wurde, betrug 1,1 U/ml.

Sequenzprotokoll

SEQ ID NO.:	1
Länge:	1215
Art der Sequenz:	Nucleinsäuren
Strangform:	Doppelstrang
Topologie:	linear
Art:	genomische DNA
Ursprungs-Organismus:	Alcaligenes sp. KS-85
Stamm:	FERM BP-4487

Sequenz:

54

ATG ACT GAC GAC ATG TTG CAC GTG ATG AAA TGG CAC AAC GGC GAA AAA GAT TAT

108

TCG CCG TTT TCG GAT GCC GAG ATG ACC CGC CGC CAA AAC GAC GTT CGC GGC TGG

162

ATG GCC AAG AAC AAT GTC GAT GCG GCG CTG TTC ACC TCT TAT CAC TGC ATC AAC

216

TAC TAT TCC GGC TGG CTG TAC TGC TAT TTC GGA CGC AAG TAC GGC ATG GTC ATC

270

GAC CAC AAC AAC GCC ACG CCG ATT TCG GCC GGC ATC GAC GGC GGC CAG CCC TGG

324

CGC CGC AGC TTC GGC GAC AAC ATT ACC TAC ACC GAC TGG CGC CGC GAC ATT TTC

378

TAT CGC GCC GTG GCG CAG CTG ACC ACG GGC GCC AAG CGC ATC GGC ATC GAG TTC

432

GAC CAC GTC AAT CTC GAC TTC CGC CGC CAG CTC GAG GAA AAC CTA CCG GGC GTC

486

GAG TTC GTC GAC ATC AGC CAG CCC TCG ATG TGG ATG CGC ACC ATC AAG TCG CTC

540

GAA GAG CAG AAG CTG ATC CGC GAA GGC GCC CGC GTG TGT GAC GTC GGC GGC GCG

594

GCC TGC GCG GCT GCC ATC AAG GCC GGC GTG CCC GAG CAT GAC ATG GCG ATC GCC

648

ACC ACC AAT GCG ATG ATC CGC GAG ATC GCC AAA TCG TTC CCC TTC GTG GAG CTG

702

ATG GAC ACC TGG ACC TGG TTC CAG TCG GGC ATC AAC ACC GAC GGC GCG CAC AAT

756

CCG GTC ACC AAC CGC ATC GTG CAA TCC GGC GAC ATC CTT TCG CTC AAC ACC TTC

810

CCG ATG ATC TTC GGC TAC TAC AAC CCG CTG GAG CGC ACG CTG TTC TGC GAC CAT

864

GTC GAT GAC GCC AGC CTC GAC ATC TGG GAG AAG AAC GTG GCC GTG CAT CGC CGC

918

GGG CTC GAG CTG ATC AAG CCG GGC GCG CGC TGC AAG GAC ATC GCC ATC GAG CTC

972

AAC GAG ATG TAC CGC GAG TGG GAC CTG CTG AAG TAC CGC TCC TTC GGC TAT GGC

1026

CAC TCC TTC GGC GTG CTG TGC CAC TAC TAC GGT CGC GAG GCG GGC GTG GAG CTG

1080

CGC GAG GAC ATC GAC ACC GAG CTG AAG CCC GGC ATG GTG GTC TCC ATG GAG CCG

1134

ATG GTG ATG CTG CCG GAG GGC ATG CCC GGT GCC GGC GGC TAT CCC GAG CAC GAC

1188

ATC CTG ATC GTC GGG GAG GAC GGT GCC GAG AAC ATC ACC GGC TTC CCG TTC GGT

1215

CCG GAA CAC AAC ATC ATC CGC AAC TGA

SEQ ID NO.: 2
Länge: 404
Artder Sequenz: Aminosäuren
Topologie: linear
Art: Protein
Sequenz:

5	10	15
Met Thr Asp Asp Met Leu His Val Met Lys Trp His Asn Gly Glu		
20	25	30
Lys Asp Tyr Ser Pro Phe Ser Asp Ala Glu Met Thr Arg Arg Gln		
35	40	45
Asn Asp Val Arg Gly Trp Met Ala Lys Asn Asn Val Asp Ala Ala		
50	55	60
Leu Phe Thr Ser Tyr His Cys Ile Asn Tyr Tyr Ser Gly Trp Leu		
65	70	75
Tyr Cys Tyr Phe Gly Arg Lys Tyr Gly Met Val Ile Asp His Asn		
80	85	90
Asn Ala Thr Pro Ile Ser Ala Gly Ile Asp Gly Gly Gln Pro Trp		
95	100	105
Arg Arg Ser Phe Gly Asp Asn Ile Thr Tyr Thr Asp Trp Arg Arg		
110	115	120
Asp Asn Phe Tyr Arg Ala Val Ala Gln Leu Thr Thr Gly Ala Lys		
125	130	135
Arg Ile Gly Ile Glu Phe Asp His Val Asn Leu Asp Phe Arg Arg		
140	145	150

Gln Leu Glu Glu Asn Leu Pro Gly Val Glu Phe Val Asp Ile Ser
155 160 165

Gln Pro Ser Met Trp Met Arg Thr Ile Lys Ser Leu Glu Glu Gln
170 175 180

Lys Leu Ile Arg Glu Gly Ala Arg Val Cys Asp Val Gly Gly Ala
185 190 195

Ala Cys Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gly Val Pro Glu His Asp Met
200 205 210

Ala Ile Ala Thr Thr Asn Ala Met Ile Arg Glu Ile Ala Lys Ser
215 220 225

Phe Pro Phe Val Glu Leu Met Asp Thr Trp Thr Trp Phe Gln Ser
230 235 240

Gly Ile Asn Thr Asp Gly Ala His Asn Pro Val Thr Asn Arg Ile
245 250 255

Val Gln Ser Gly Asp Ile Leu Ser Leu Asn Thr Phe Pro Met Ile
260 265 270

Phe Gly Tyr Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Thr Leu Phe Cys Asp His
275 280 285

Val Asp Asp Ala Ser Leu Asp Ile Trp Glu Lys Asn Val Ala Val
290 295 300

His Arg Arg Gly Leu Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala Arg Cys Lys
305 310 315

Asp Ile Ala Ile Glu Leu Asn Glu Met Tyr Arg Glu Trp Asp Leu
320 325 330

Leu Lys Tyr Arg Ser Phe Gly Tyr Gly His Ser Phe Gly Val Leu
335 340 345

Cys His Tyr Tyr Gly Arg Glu Ala Gly Val Glu Leu Arg Glu Asp
350 355 360

```
Ile Asp Thr Glu Leu Lys Pro Gly Met Val Val Ser Met Glu Pro
                365                 370                 375
Met Val Met Leu Pro Glu Gly Met Pro Gly Ala Gly Gly Tyr Pro
                380                 385                 390
Glu His Asp Ile Leu Ile Val Gly Glu Asp Gly Ala Glu Asn Ile
                395                 400                 405
Thr Gly Phe Pro Phe Gly Pro Glu His Asn Ile Ile Arg Asn  *
```

SEQ ID NO.: 3
Länge: 30
Art der Sequenz: Nucleinsäuren
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear
Art: andere Nucleinsäure
Merkmal: synthetischer DNA-Primer
Sequenz:

ATG ACT GAC GAC ATG TTG CAC GTG ATG AAA

SEQ ID NO.: 4
Länge: 30
Art der Sequenz: Nucleinsäuren
Strangform: Einzelstrang
Topologie: linear
Art: andere Nucleinsäure
Merkmal: synthetischer DNA-Primer
Sequenz:

TCA GTT GCG GAT GAT GTT GTG TTC CGG ACC

Patentansprüche

1. DNA-Molekül, das ein Protein mit Creatin-Amidinohydrolase-Aktivität codiert,
wobei das Protein die folgenden Merkmale umfasst:
(a) die codierte N-terminale Aminosäuresequenz ist Met Thr Asp Asp Met Leu His Val Met Lys;
(b) die codierte C-terminale Aminosäuresequenz ist Phe Gly Pro Glu His Asn Ile Ile Arg Asn; und
(c) es hat die von dem DNA-Molekül, das in die HpaI-Insertionsstelle des E. coli Transformanten hinterlegt als FERM BP-4803, inseriert ist, codierten 404 Aminosäuren;
und wobei das DNA-Molekül unter stringenten Bedingungen zum Komplementärstrang der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Nucleotidsequenz hybridisiert.

2. Vektor, umfassend ein DNA-Molekül nach Anspruch 1.

3. Vektor nach Anspruch 2, in dem das DNA-Molekül verknüpft ist mit regulatorischen DNA-Elementen, die die Expression der Creatin-Amidinohydrolase in prokaryontischen Wirtszellen erlauben.

4. Wirtszelle, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 2 oder 3.

5. Wirtszelle nach Anspruch 4, die ein Mikroorganismus ist, der zur Gattung Escherichia gehört.

6. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität der Creatin-Amidinohydrolase, umfassend die Züchtung einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 4 oder 5 in einem Medium und die Gewinnung des Proteins mit der enzymatischen Aktivität der Amidinohydrolase aus der Kultur.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

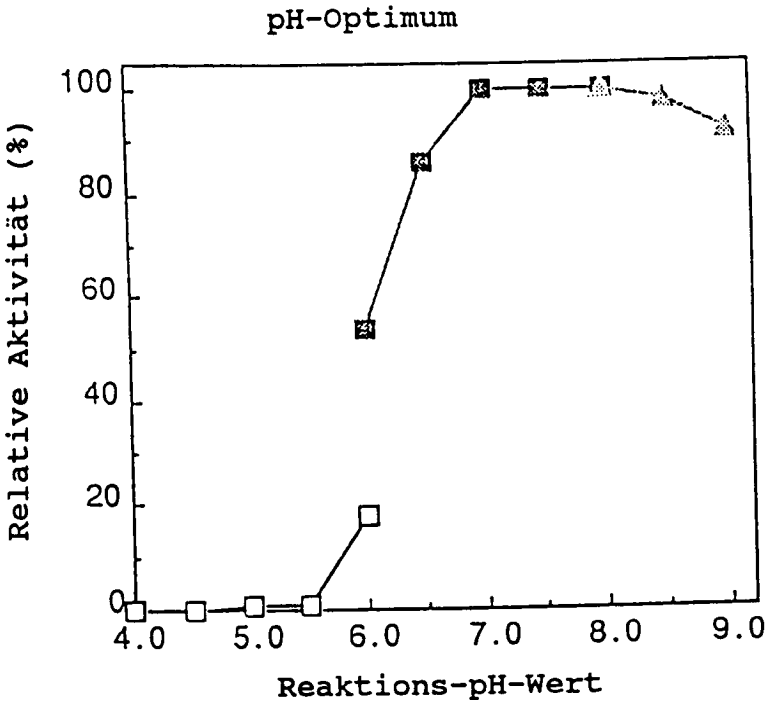


FIG. 2

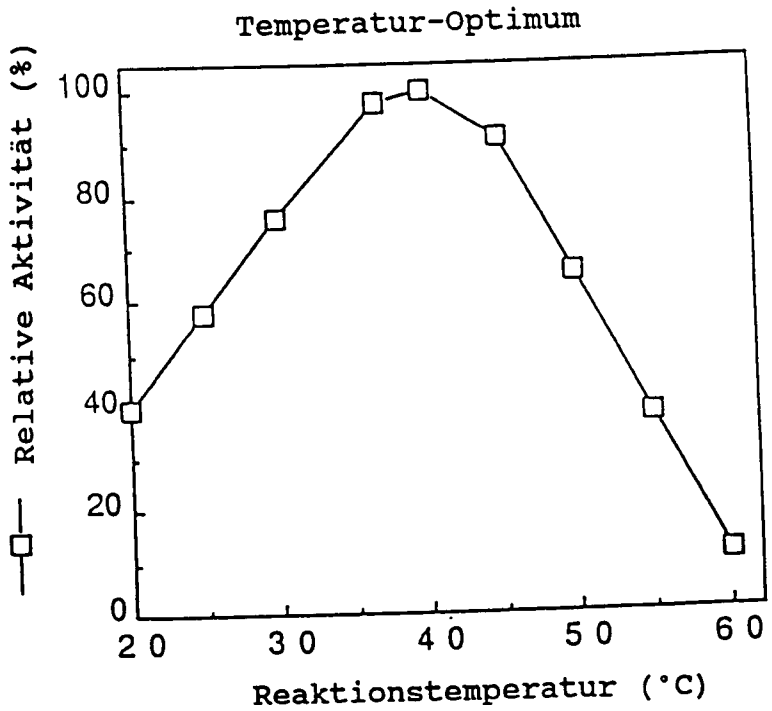

Temperatur-Optimum
Relative Aktivität (%)
100
80
60
40
20
0
20
30
40
50
60
Reaktionstemperatur (°C)

FIG. 3

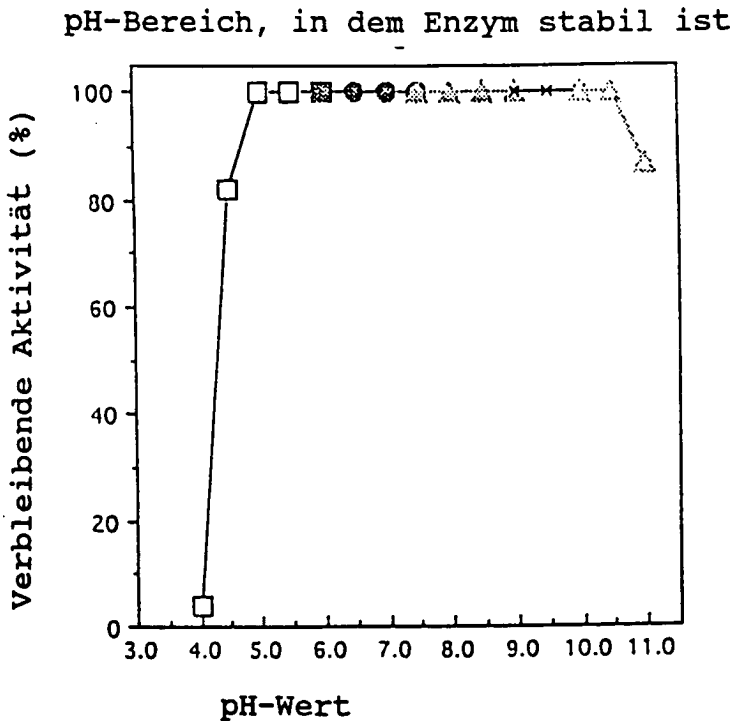
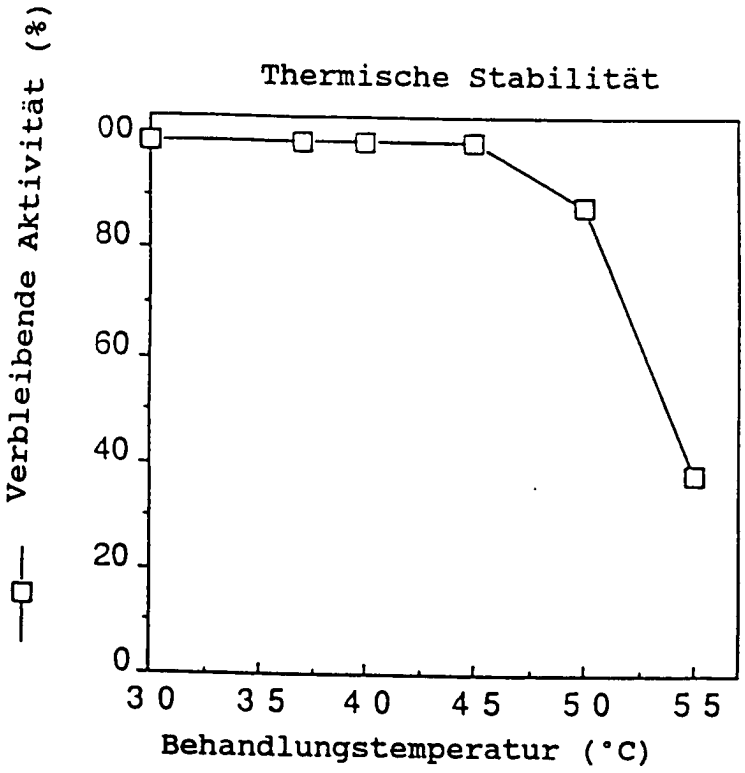

pH-Bereich, in dem Enzym stabil ist
Verbleibende Aktivität (%)
100
80
60
40
20
0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
pH-Wert

FIG. 4


Thermische Stabilität
Verbleibende Aktivität (%)
00
80
60
40
20
0
30
35
40
45
50
55
Behandlungstemperatur (°C)