世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7
C12N 9/90, 15/61, 1/21, C12P 19/24 //
(C12N 15/61, C12R 1:01)

A1

(11) 国際公開番号 WO00/47730

(43) 国際公開日 2000年8月17日(17.08.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00702

(22) 国際出願日 2000年2月9日(09.02.00)

(30) 優先権データ
特願平11/31035 1999年2月9日(09.02.99) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
協和醗酵工業株式会社
(KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP]
〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
小泉聡司(KOIZUMI, Satoshi)[JP/JP]
田畑和彦(TABATA, Kazuhiko)[JP/JP]
遠藤徹夫(ENDO, Tetsuo)[JP/JP]
〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号
協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP)
尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP]
〒747-8522 山口県防府市協和町1番1号
協和醗酵工業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **N-ACETYLGLUCOSAMINE 2-EPIMERASE AND DNA ENCODING THE ENZYME**

(54)発明の名称 Nーアセチルグルコサミン2ーエピメラーゼおよび該酵素をコードするDNA

(57) Abstract

A novel protein having an N-acetylglucosamine 2-epimerase activity; a DNA encoding this protein; a recombinant vector containing this DNA; a transformant obtained by transferring this recombinant vector into a host cell; and a process for producing the above protein or N-acetylmannosamine by using this transformant.

(57)要約

本発明は、Ｎ－アセチルグルコサミン２―エピメラーゼ活性を有する新規蛋白質、該蛋白質をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含有してなる組換えベクター、該組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いた上記蛋白質あるいはＮ－アセチルマンノサミンの製造法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AG アンティグア・バーブーダ
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
DM ドミニカ
DZ アルジェリア
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GR ギリシャ
GW ギニア・ビサオ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
MZ モザンビーク
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
TZ タンザニア
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴースラヴィア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明　細　書

Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼおよび該酵素をコードするＤＮＡ

技術分野

本発明は、Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含有する組換え体ＤＮＡ、該組換え体ＤＮＡを保有する形質転換体、該形質転換体を用いたＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼの製造法、および該形質転換体を用いたＮ－アセチルマンノサミンの製造法に関する。Ｎ－アセチルマンノサミンはＮ－アセチルノイラミン酸生合成の前駆体として重要な化合物である。

背景技術

Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼに関してはブタやラットにその存在が知られており、ブタ由来の酵素についてはその性質が調べられている〔Biochemistry, 17, 3363 (1970)〕。また、その遺伝子に関してはブタ由来の遺伝子〔J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)〕が取得されている。しかしながら今まで、微生物におけるその活性については知られていない。

ラン藻の１種であるSynechocystis sp.(PCC6803)においては、そのゲノムの全配列は決定されている〔DNA Research, 3, 109 (1996)、Nucleic Acids Research, 26, 63 (1998)〕が、Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ遺伝子は特定されていない。

発明の開示

本発明の目的は、Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを用いたＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質の製造法、および該蛋白質を用いたＮ－アセチルマンノサミンの製造法を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ゲノムＤＮＡの全配列が決定されているSynechocystis sp.(PCC6803)の配列情報からブタ由来のＮ－

アセチルグルコサミン２―エピメラーゼのアミノ酸配列と相同性のある配列を検索した結果、これまで特定されていなかった新規Ｎ－アセチルグルコサミン２―エピメラーゼをコードするＤＮＡを微生物から初めて見出し、該ＤＮＡを取得することにより、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の（１）～（１０）に関する。

（１） 以下の(a)または(b)の蛋白質：

(a) 配列番号１記載のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) (a)の蛋白質の有するアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＮ－アセチルグルコサミン２―エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

上記の１以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＮ－アセチルグルコサミン２―エピメラーゼ活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第２版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号１で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするＤＮＡに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、１個から数十個、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個である。

（２） 上記（１）記載の蛋白質をコードするＤＮＡ。

（３） 以下の(a)または(b)のＤＮＡからなるＤＮＡ：

(a) 配列番号２記載の塩基配列を有するＤＮＡ。

(b) (a)のＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＮ－

アセチルグルコサミン２―エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡからなるＤＮＡ。

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡ」とは、配列番号２で表される塩基配列を有するＤＮＡをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるＤＮＡを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のＤＮＡを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0mol/lの塩化ナトリウム存在下、６５℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０mmol/l 塩化ナトリウム、１５mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるＤＮＡをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なＤＮＡとして具体的には、ＢＬＡＳＴ〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕やＦＡＳＴＡ〔Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)〕等を用いて計算したときに、配列番号２で表される塩基配列と少なくとも80％以上の相同性を有するＤＮＡ、好ましくは95％以上の相同性を有するＤＮＡをあげることができる。

（４）　ＤＮＡがラン藻(Cyanobacteria)に属する微生物由来のＤＮＡである、上記（２）または（３）記載のＤＮＡ。

（５）　ラン藻に属する微生物由来のＤＮＡがシネコシスティス(Synechocystis)属に属する微生物由来のＤＮＡである、上記（２）～（４）いずれかに記載のＤＮＡ。

（６）　上記（２）～（５）いずれかに記載のＤＮＡから選ばれるＤＮＡをベクターに組み込んで得られる組換え体ＤＮＡ。

（７）　上記（６）記載の組換え体ＤＮＡを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

（８）　形質転換体がエシェリヒア・コリである、上記（７）記載の形質転換体。

（９）　上記（７）または（８）記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質の製造方法。

（１０）　上記（７）または（８）記載の形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびＮ－アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でＮ－アセチルマンノサミンを生成蓄積させ、該水性媒体中からＮ－アセチルマンノサミンを採取することを特徴とするＮ－アセチルマンノサミンの製造法。

以下に本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明のＤＮＡの調製

(1) データベース上での遺伝子の特定

Synechocystis sp.(PCC6803)のゲノムは全て決定されており〔DNA Research, 3, 109 (1996)、Nucleic Acids Research, 26, 63 (1998)〕、CyanoBase(http://www.kazusa.or.jp/cyano/)などのデータベースにより相同性検索が可能である。

相同性検索に用いるQueryとしてはＮ－アセチルグルコサミン２―エピメラーゼ遺伝子の配列であればいかなるものも用いることができるが、具体的には、ブタ由来のＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼのアミノ酸配列〔J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)〕などをあげることができる。

検索方法は利用できるものはどのような方法でも構わないが、Genbankあるいは CyanoBaseでのホモロジー検索などを例示することができる。

(2) 本発明のＤＮＡの調製

本発明のＤＮＡはラン藻に属する微生物より調製することができる。ラン藻に属する微生物としては、例えばシネコシスティスをあげることができ、具体的にはSynechocystis sp. PCC6803株等をあげることができる。

ラン藻に属する微生物を公知の方法〔例えば、J. Gen. Microbiol., 111, 1 (1979)〕により培養する。

培養後、公知の方法〔例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)〕により、該微生物の染色体ＤＮＡを単離精製する。

本発明のＤＮＡを含む断片の取得は、上記(1)で特定されたゲノムの塩基配列に基づいたプライマーを調製し、ゲノムＤＮＡを鋳型として、ＰＣＲ法 (PCR Protocols, Academic Press (1990)〕により行うことができる。

また、ゲノムの塩基配列に基づいて設計された合成ＤＮＡをプローブとしたハイブリダイゼイション法などにより目的とするＤＮＡを取得することもできる。

取得したＤＮＡをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後、常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A･ＤＮＡシークエンサー（パーキン・エルマー社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定することができる。

該ＤＮＡを組み込むベクターとしては、pBluescript KS(+)（ストラタジーン社製）、pDIRECT〔Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)〕、pCR-Script Amp SK(+)（ストラタジーン社製）、pT7Blue（ノバジェン社製）、pCR II（インビトロジェン社製）、pCR-TRAP（ジーンハンター社製）およびpNoTA T 7（５プライム→３プライム社製）などをあげることができる。

上記のようにして取得された新規な塩基配列を有するＤＮＡとして、例えば、配列番号２で表される配列を有するＤＮＡ等をあげることができる。

配列番号２で表される配列を有するＤＮＡを保有するプラスミドを保有する大腸菌として、例えばEscherichia coli NM522/pYP16をあげることができる。

更に、決定されたＤＮＡの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型ＤＮＡ合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするＤＮＡを調製することもできる。

大腸菌としては、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522等をあげることができる。

組換え体ＤＮＡの導入方法としては、上記宿主細胞へＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-2483942）、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。

[2] 本発明の蛋白質の調製

本発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、上記[1]に記載の方法により取得した本発明のＤＮＡを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

本発明のＤＮＡをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を調製する。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることができる。

該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のＤＮＡを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明の蛋白質遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のＤＮＡ、転写終結配列、より構成された組換え体ＤＮＡであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社製）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pGEX（ファルマシア社製）、pSE280

（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pET-3（ノバジェン社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescriptII SK+（ストラタジーン社製）、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pTrS30〔大腸菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)より調製〕、pTrS32〔大腸菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)より調製〕、pUC19〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pSTV28(宝酒造社製)、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）、pPAC31（WO98/12343）等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーター等をあげることができる。またPtrpを２つ直列させたプロモーター（Ptrp ｘ２）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば６～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換え体ＤＮＡにおいては、本発明のＤＮＡの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia

marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium ammoniagenes、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換え体ＤＮＡの導入方法としては、上記宿主細胞へＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-248394）、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MFα1 プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、キャンディダ属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris、Candida utilis等をあげることができる。

組換え体ＤＮＡの導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕等をあ

げることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pcDM8(フナコシ社より市販)、pAGE107(特開平3-22979)、pAS3-3(特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pcDNAI/Amp (インビトロジェン社製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103〔J. Biochem, 101, 1307 (1987)〕、pAGE210、pAMo、pAMoA等を用いることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NSO等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換え体ＤＮＡの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075) 、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Molecular Biology, A

Laboratory Manual、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）（特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（特許第2606856、特許第2517813）等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第２版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシ

ウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は１５～４０℃がよく、培養時間は、通常５時間～７日間である。培養中ｐＨは３．０～９．０に保持する。ｐＨの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６～８、２５～４０℃、５％CO_2存在下等の条件下で１～７日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン社製〕、Sf-900 II SFM培地（ライフ・テクノロジーズ社製）、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンシーズ社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６～７、２５～３０℃等の条件下で１～５日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ５～９、２０～４０℃の条件下で３～６０日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平05-336963、WO94/23021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明の蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて本発明の蛋白質を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

動物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば公知の方法〔American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)〕に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、βラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば本発明の蛋白質をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を生産する方法があげられる。

本発明の形質転換体により製造された蛋白質を単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離、精製法を用いることができる。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了

後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）－セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグ

ラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、WO94/23021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

また、本発明のポリペプチドをＦｌａｇペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗Ｆｌａｇ抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

上記で取得された蛋白質のアミノ酸情報を基に、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、ｔＢｏｃ法（ｔ－ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法により、本発明の蛋白質を製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[3] Ｎ－アセチルマンノサミンの調製

上記[2]記載の培養により得られた形質転換体の培養液および該培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中でＮ－アセチルマンノサミンを製造することができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

Ｎ－アセチルマンノサミンの生成において用いられる酵素源は、37℃で1分間に1mモルのＮ－アセチルマンノサミンを生成することのできる活性を1単位（Ｕ）として、1mＵ／ｌ～1,000Ｕ／ｌであり、好ましくは10mＵ／ｌ～100Ｕ／ｌの濃度で用いる。

Ｎ－アセチルマンノサミンの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

Ｎ－アセチルマンノサミンの生成において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミーンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、Ｎ－アセチルマンノサミンの生成を促進するものであればいずれでもよく、１種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50ｇ／ｌの濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50ｍｌ／ｌの濃度で用いられる。

Ｎ－アセチルマンノサミンの生成反応は水性媒体中、ｐＨ５～１０、好ましくはｐＨ６～８、２０～５０℃の条件で１～９６時間行う。該生成反応において、必要に応じてＡＴＰ、$MgCl_2$等の無機塩等を添加することができる。

水性媒体中に生成したＮ－アセチルマンノサミンの定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる〔Anal. Biochem., 189, 151 (1990)〕。

反応液中に生成したＮ－アセチルマンノサミンの採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。

図面の簡単な説明

第1図　１はＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ発現プラスミドｐＹＰ１６の造成工程を示す。

Ａｍｐ^r：アンピシリン耐性遺伝子

P_L：P_Lプロモーター

ｃＩ８５７：ｃＩ８５７リプレッサー

ｓｌｒ１９７５：Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ遺伝子

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例１　データベース上での相同性検索

ブタ由来のＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼのアミノ酸配列〔J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)〕をQueryとして、GenbankのBlast SearchおよびSynechocystis sp.(PCC6803)のゲノム配列のデータベースであるCyanoBase(http：//www.kazusa.or.jp/cyano/)において相同検索（Similarity Search）を行った。

その結果、該アミノ酸配列は、配列番号１記載のアミノ酸配列および配列番号２記載の塩基配列を有するrenin-binding proteinとの記載のあるSynechocystis sp.(PCC6803)由来の配列(slr1975)と高い相同性を示すことが明らかとなった。

実施例２　シネコシスティス由来の遺伝子発現株の造成

Synechocystis sp.(PCC6803)をJ. Gen. Microbiol., 111 1 (1979)に記載の方法で培養した。

培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により、該微生物の染色体ＤＮＡを単離精製した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型ＤＮＡ合成機を用いて合成した、配列番号３および４に記載のＤＮＡを用いて、実施例１で選択された遺伝子を含むＤＮＡ断片を、下記方法で増幅した。

上記合成ＤＮＡをプライマーとして用い、Synechocystis sp.(PCC6803)の染色体ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行った。ＰＣＲは染色体ＤＮＡ　０．１μｇ、プライマー各０．５μmol/l、Ｐｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ(STRATAGENE社製)　２．５ｕｎｉｔｓ、Ｐｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ用×１０緩衝液(STRATAGENE社製)　４μｌ、deoxyNTP各２００μmol/lを含む反応液４０μｌを用い、９４℃-１分、４２℃-

２分、７２℃-３分の工程を３０回繰り返すことにより行った。

該反応液の１／１０量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のＴＥ〔１０mmol/l Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１mmol/l ＥＤＴＡ〕飽和フェノール／クロロホルム（１ｖｏｌ／１ｖｏｌ）を添加し、混合した。

該混合液を遠心分離後、得られた上層に２倍容量の冷エタノールを加えて混合し、－８０℃に３０分放置した。該放置液を遠心分離しＤＮＡの沈殿を得た。

該ＤＮＡの沈殿を２０μｌのＴＥに溶解した。

該溶解液５μｌを用い、ＤＮＡを制限酵素ＣｌａＩおよびＢａｍＨＩで切断し、アガロースゲル電気泳動によりＤＮＡ断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより１．０ｋｂのＤＮＡ断片を回収した。

ｐＰＡＣ３１（WO98/12343）ＤＮＡ０．２μｇを制限酵素ＣｌａＩおよびＢａｍＨＩで切断後、アガロースゲル電気泳動によりＤＮＡ断片を分離し、同様に５．５ｋｂのＤＮＡ断片を回収した。

該１．０ｋｂおよび５．５ｋｂの断片をライゲーションキットを用いて、１６℃、１６時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌ＮＭ５２２株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬＢ寒天培地に塗布後、３０℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドであるｐＹＰ１６を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第１図）。

実施例３．Ｎ－アセチルグルコサミンの生産

実施例２で得たEscherichia coli NM522/pYP16株をアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬＢ培地８ｍｌの入った太型試験管に接種し２８℃で１７時間培養した。該培養液をアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬＢ培地８ｍｌの入った太型試験管に１％接種し３０℃で４時間培養した後、４０℃で３時間培養した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて－２０℃で保存するこ

とが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

終濃度６０ｍｇ／ｍｌの該湿菌体、１００mmol/l Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１０mmol/l $MgCl_2$、４０mmol/l Ｎ－アセチルマンノサミン、４mmol/l ＡＴＰ、０．４％ナイミーンＳ－２１５からなる０．１ｍｌの反応液中、３７℃で２時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に13.7mmol/lのＮ－アセチルグルコサミンが生成蓄積していることを確認した。

ベクターのみを含むE. coli NM522/pPAC31株ではＮ－アセチルグルコサミンの生成は認められなかった。

実施例４．Ｎ－アセチルマンノサミンの生産

実施例２で得たEscherichia coli NM522/pYP16株をアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬＢ培地８ｍｌの入った太型試験管に接種し２８℃で１７時間培養した。

該培養液をアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬＢ培地８ｍｌの入った太型試験管に１％接種し２８℃で４時間培養した後、４０℃で３時間培養した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて－２０℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

終濃度６０ｍｇ／ｍｌ該湿菌体、１００mmol/l Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１０mmol/l $MgCl_2$、５００mmol/l Ｎ－アセチルグルコサミン、４mmol/l ＡＴＰ、０．４％ナイミーンＳ－２１５からなる０．１ｍｌの反応液中、３７℃で２時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に７０mmol/lのＮ－アセチルマンノサミンが生成蓄積していることを確認した。

ベクターのみを含むE. coli NM522/pPAC31株ではＮ－アセチルグルコサミンの生成は認められなかった。

産業上の利用可能性

本発明により、Ｎ－アセチルグルコサミン２―エピメラーゼを遺伝子組換え手法により大量に生産することが可能となる。また、該酵素を用いることにより効率的にＮ－アセチルマンノサミンを製造できる。

配列表フリーテキスト

配列番号３：合成ＤＮＡ

配列番号４：合成ＤＮＡ

請求の範囲

1. 以下の(a)または(b)の蛋白質。

(a) 配列番号１記載のアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) (a)の蛋白質の有するアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質

2. 請求項１記載の蛋白質をコードするＤＮＡ。

3. 以下の(a)または(b)のＤＮＡ。

(a) 配列番号２記載の塩基配列を有するＤＮＡ

(b) (a)のＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ

4. ＤＮＡがラン藻(Cyanobacteria)に属する微生物由来のＤＮＡである、請求項２または３記載のＤＮＡ。

5. ラン藻に属する微生物由来のＤＮＡがシネコシスティス(Synechocystis)属に属する微生物由来のＤＮＡである、請求項２～４いずれかに記載のＤＮＡ。

6. 請求項２～５いずれかに記載のＤＮＡから選ばれるＤＮＡをベクターに組み込んで得られる組換え体ＤＮＡ。

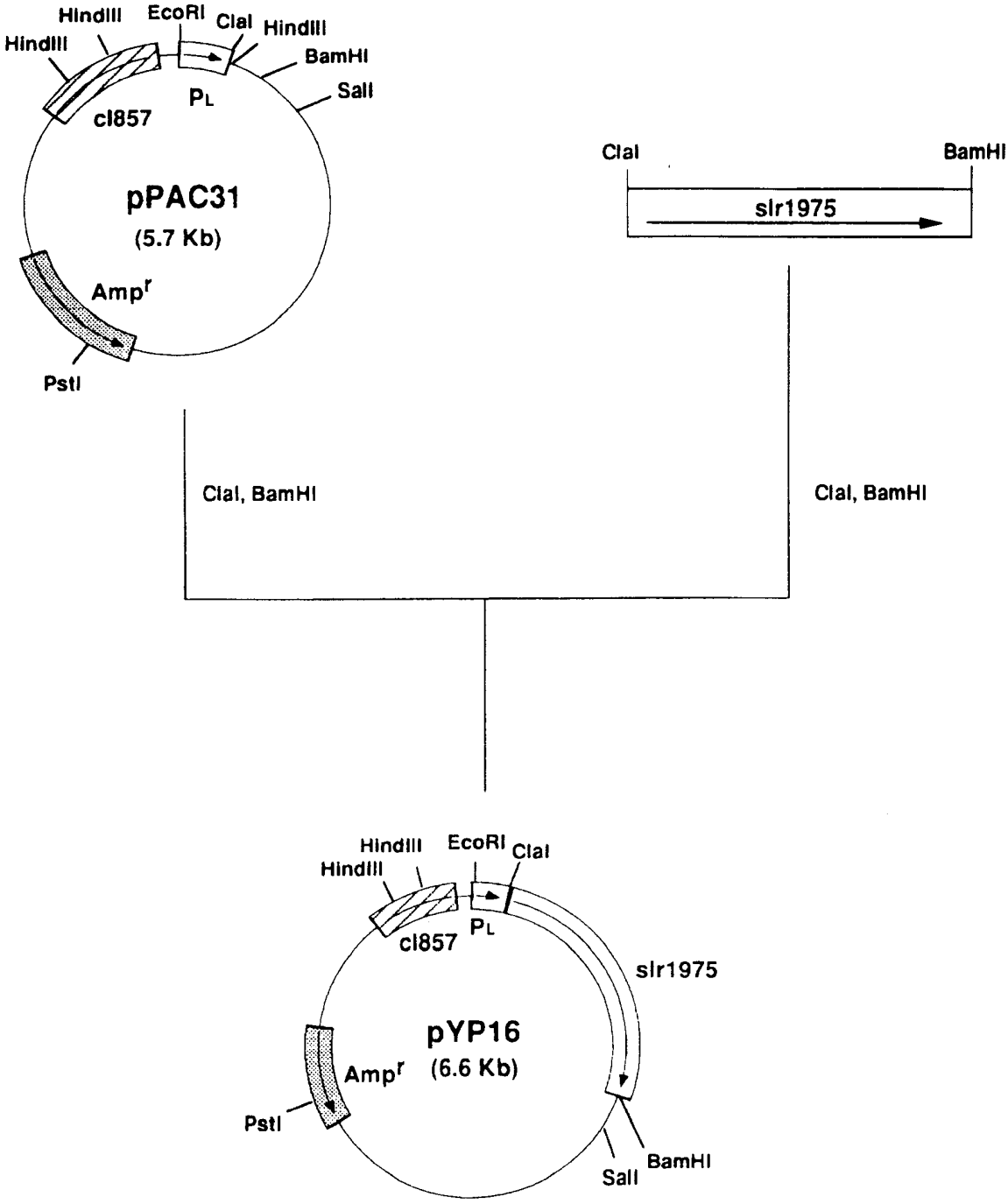
7. 請求項６記載の組換え体ＤＮＡを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

8. 宿主細胞がエシェリヒア・コリである、請求項７記載の形質転換体。

9. 請求項７または８記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にＮ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、Ｎ－アセチルグルコサミン２－エピメラーゼ活性を有する蛋白質の製造方法。

10. 請求項７または８記載の形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびＮ－アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でＮ－アセチルマンノサミンを生成蓄積させ、該水性媒体中からＮ－アセチルマンノサミンを採取することを特徴とするＮ－アセチルマンノサミンの製造法。

図 1


HindIII
EcoRI
ClaI
HindIII
HindIII
BamHI
SalI
cI857
PL
pPAC31
(5.7 Kb)
Ampr
PstI
ClaI
BamHI
slr1975
ClaI, BamHI
ClaI, BamHI
HindIII
EcoRI
ClaI
HindIII
cI857
PL
slr1975
pYP16
(6.6 Kb)
Ampr
PstI
SalI
BamHI

配 列 表
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Novel N-acetyl glucosamine 2-epimerase and a DNA coding for said enzyme

<130> 11184W01

<140>
<141>

<150> JP99-031035
<151> 1999-02-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 391
<212> PRT
<213> Synechocystis sp.(PCC6803)

<400> 1

Met Ile Ala His Arg Arg Gln Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Ala
1 5 10 15

Leu His Gln Asp Val Leu Pro Phe Trp Glu Lys Tyr Ser Leu Asp Arg
20 25 30

Gln Gly Gly Gly Tyr Phe Thr Cys Leu Asp Arg Lys Gly Gln Val Phe
35 40 45

Asp Thr Asp Lys Phe Ile Trp Leu Gln Asn Arg Gln Val Trp Gln Phe
50 55 60

Ala Val Phe Tyr Asn Arg Leu Glu Pro Lys Pro Gln Trp Leu Glu Ile
65 70 75 80

Ala Arg His Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg His Gly Arg Asp Gln Asp
85 90 95

Gly Asn Trp Tyr Phe Ala Leu Asp Gln Glu Gly Lys Pro Leu Arg Gln
100 105 110

Pro Tyr Asn Val Phe Ser Asp Cys Phe Ala Ala Met Ala Phe Ser Gln
115 120 125

Tyr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Gln Glu Ala Lys Ala Ile Ala Leu Gln
130 135 140

Ala Tyr Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln His Asn Pro Lys Gly Gln Tyr
145 150 155 160

Glu Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Arg Pro Leu Lys Ser Leu Ala Val Pro
165 170 175

Met Ile Leu Ala Asn Leu Thr Leu Glu Met Glu Trp Leu Leu Pro Pro
180 185 190

Thr Thr Val Glu Glu Val Leu Ala Gln Thr Val Arg Glu Val Met Thr
195 200 205

Asp Phe Leu Asp Pro Glu Ile Gly Leu Met Arg Glu Ala Val Thr Pro
210 215 220

Thr Gly Glu Phe Val Asp Ser Phe Glu Gly Arg Leu Leu Asn Pro Gly
225 230 235 240

His Gly Ile Glu Ala Met Trp Phe Met Met Asp Ile Ala Gln Arg Ser
245 250 255

Gly Asp Arg Gln Leu Gln Glu Gln Ala Ile Ala Val Val Leu Asn Thr
260 265 270

Leu Glu Tyr Ala Trp Asp Glu Glu Phe Gly Gly Ile Phe Tyr Phe Leu
275 280 285

Asp Arg Gln Gly His Pro Pro Gln Gln Leu Glu Trp Asp Gln Lys Leu
290 295 300

Trp Trp Val His Leu Glu Thr Leu Val Ala Leu Ala Lys Gly His Gln
305 310 315 320

Ala Thr Gly Gln Glu Lys Cys Trp Gln Trp Phe Glu Arg Val His Asp
325 330 335

Tyr Ala Trp Ser His Phe Ala Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly
340 345 350

Tyr Leu Asn Arg Arg Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Lys Gly Gly Lys
355 360 365

Trp Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Glu
370 375 380

Thr Leu Gln Leu Pro Val Ser
385 390

<210> 2
<211> 1173
<212> DNA
<213> Synechocystis sp.(PCC6803)

<400> 2
atg att gcc cat cgc cgt cag gag tta gcc cag caa tat tac cag gct 48
Met Ile Ala His Arg Arg Gln Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Ala
1 5 10 15

tta cac cag gac gta ttg ccc ttt tgg gaa aaa tat tcc ctc gat cgc 96
Leu His Gln Asp Val Leu Pro Phe Trp Glu Lys Tyr Ser Leu Asp Arg
20 25 30

cag ggg ggc ggt tac ttt acc tgc tta gac cgt aaa ggc cag gtt ttt 144
Gln Gly Gly Gly Tyr Phe Thr Cys Leu Asp Arg Lys Gly Gln Val Phe
35 40 45

gac aca gat aaa ttc att tgg tta caa aac cgt cag gta tgg cag ttt 192

Asp Thr Asp Lys Phe Ile Trp Leu Gln Asn Arg Gln Val Trp Gln Phe
50 55 60

gcc gtt ttc tac aac cgt ttg gaa cca aaa ccc caa tgg tta gaa att 240
Ala Val Phe Tyr Asn Arg Leu Glu Pro Lys Pro Gln Trp Leu Glu Ile
65 70 75 80

gcc cgc cat ggt gct gat ttt tta gct cgc cac ggc cga gat caa gac 288
Ala Arg His Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg His Gly Arg Asp Gln Asp
85 90 95

ggt aat tgg tat ttt gct ttg gat cag gaa ggc aaa ccc ctg cgt caa 336
Gly Asn Trp Tyr Phe Ala Leu Asp Gln Glu Gly Lys Pro Leu Arg Gln
100 105 110

ccc tat aac gtt ttt tcc gat tgc ttc gcc gcc atg gcc ttt agt caa 384
Pro Tyr Asn Val Phe Ser Asp Cys Phe Ala Ala Met Ala Phe Ser Gln
115 120 125

tat gcc tta gcc agt ggg gcg cag gaa gct aaa gcc att gcc ctg cag 432
Tyr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Gln Glu Ala Lys Ala Ile Ala Leu Gln
130 135 140

gcc tac aat aac gtc cta cgc cgt cag cac aat ccc aaa ggt caa tac 480
Ala Tyr Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln His Asn Pro Lys Gly Gln Tyr
145 150 155 160

gag aag tcc tat cca ggt act aga ccc ctc aaa tcc ctg gcg gtg ccg 528
Glu Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Arg Pro Leu Lys Ser Leu Ala Val Pro
165 170 175

atg att tta gcc aac ctc acc ctg gag atg gaa tgg tta tta ccg cct 576
Met Ile Leu Ala Asn Leu Thr Leu Glu Met Glu Trp Leu Leu Pro Pro
180 185 190

act acc gtg gaa gag gtg ttg gcc caa acc gtc aga gaa gtg atg acg 624
Thr Thr Val Glu Glu Val Leu Ala Gln Thr Val Arg Glu Val Met Thr
195 200 205

gat ttc ctc gac cca gaa ata gga tta atg cgg gaa gcg gtg acc ccc 672
Asp Phe Leu Asp Pro Glu Ile Gly Leu Met Arg Glu Ala Val Thr Pro
210 215 220

aca gga gaa ttt gtt gat agt ttt gaa ggg cgg ttg ctc aac cca gga 720
Thr Gly Glu Phe Val Asp Ser Phe Glu Gly Arg Leu Leu Asn Pro Gly
225 230 235 240

cac ggc att gaa gcc atg tgg ttc atg atg gac att gcc caa cgc tcc 768
His Gly Ile Glu Ala Met Trp Phe Met Met Asp Ile Ala Gln Arg Ser
245 250 255

ggc gat cgc cag tta cag gag caa gcc att gca gtg gtg ttg aac acc 816
Gly Asp Arg Gln Leu Gln Glu Gln Ala Ile Ala Val Val Leu Asn Thr
260 265 270

ctg gaa tat gcc tgg gat gaa gaa ttt ggt ggc ata ttt tat ttc ctt 864
Leu Glu Tyr Ala Trp Asp Glu Glu Phe Gly Gly Ile Phe Tyr Phe Leu
275 280 285

gat cgc cag ggc cac cct ccc caa caa ctg gaa tgg gac caa aag ctc 912

```
Asp Arg Gln Gly His Pro Pro Gln Gln Leu Glu Trp Asp Gln Lys Leu
    290                 295                 300

tgg tgg gta cat ttg gaa acc ctg gtt gcc cta gcc aag ggc cac caa   960
Trp Trp Val His Leu Glu Thr Leu Val Ala Leu Ala Lys Gly His Gln
305                 310                 315                 320

gcc act ggc caa gaa aaa tgt tgg caa tgg ttt gag cgg gtc cat gat   1008
Ala Thr Gly Gln Glu Lys Cys Trp Gln Trp Phe Glu Arg Val His Asp
                325                 330                 335

tac gcc tgg agt cat ttc gcc gat cct gag tat ggg gaa tgg ttt ggc   1056
Tyr Ala Trp Ser His Phe Ala Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly
            340                 345                 350

tac ctg aat cgc cgg gga gag gtg tta ctc aac cta aaa ggg ggg aaa   1104
Tyr Leu Asn Arg Arg Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Lys Gly Gly Lys
        355                 360                 365

tgg aaa ggg tgc ttc cac gtg ccc cga gct ctg tgg ctc tgt gcg gaa   1152
Trp Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Glu
    370                 375                 380

act ctc caa ctt ccg gtt agt                                      1173
Thr Leu Gln Leu Pro Val Ser
385                 390
```

<210> 3

<211> 36

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 3
taaatcgata tttgtatgat tgcccatcgc cgtcag 36

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 4
aaaggatcct taactaaccg gaagttggag agtttc 36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/00702

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N 9/90, C12N 15/61, C12N 1/21, C12P 19/24 //
(C12N 15/61, C12R 1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N 9/90, C12N 15/61, C12N 1/21, C12P 19/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq,Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takakazu Kaneko et al.,"Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp.strain PCC6803. · .sequence determination of the entrie genome and assignment of potential protein-coding regions", DNA Research (1996) , VOl.3 , No.3 , p.109-136	1-10
A	Isafumi Maru et al.,"Molecular cloning and identification of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney as a renin-binding protein", The Journal of Biological Chemistry (1996), Vol.271, No.27, p.16294-16299	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 April, 2000 (21.04.00)	02 May, 2000 (02.05.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告	国際出願番号　PCT／JP00／00702

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl[7]　C12N 9／90, C12N 15／61, C12N 1／21, C12P 19／24 //
(C12N 15／61, C12R 1：01)

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl[7]　C12N 9／90, C12N 15／61, C12N 1／21, C12P 19／24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

SwissProt／PIR／GeneSeq, Genbank／EMBL／DDBJ／GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Takakazu Kaneko et al., "Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. sequence determination of the entrie genome and assignment of potential protein-coding regions", DNA Research (1996), V01.3, No.3, p.109-136	1－10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
21.04.00	02.05.00

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4N	9162
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	新見　浩一　印		
	電話番号　03－3581－1101　内線　3488		

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Isafumi Maru et al., "Molecular cloning and identification of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney as a renin-binding protein", The Journal of Biological Chemistry (1996), Vol.271, No.27, p.16294-16299	１－１０