(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年2月21日(21.02.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/035482 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/90 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/030497

(22) 国際出願日： 2018年8月17日(17.08.2018)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2017-157664 2017年8月17日(17.08.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP). 日本食品化工株式会社(**NIHON SHOKUHIN KAKO CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内１丁目６番５号（丸の内北口ビル２０階） Tokyo (JP).

(72) 発明者: 佐分利 亘(**SABURI Wataru**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 森 春英(**MORI Haruhide**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 飯塚 貴久(**IIZUKA Takahisa**); 〒4178530 静岡県富士市田島３０番地 日本食品化工株式会社内 Shizuoka (JP). 藤本 佳則(**FUJIMOTO Yoshinori**); 〒4178530 静岡県富士市田島３０番地 日本食品化工株式会社内 Shizuoka (JP). 高木 宏基(**TAKAGI Hiroki**); 〒4178530 静岡県富士市田島３０番地 日本食品化工株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(**SIKS & CO.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** PROTEIN EXHIBITING EPIMERIZATION ACTIVITY

(54) 発明の名称： エピメリ化活性を有するタンパク質

(57) **Abstract:** The present invention pertains to: a protein comprising a given specific insertion sequence and exhibiting glucose-mannose epimerization activity, and a method for producing mannose using said protein; a protein comprising a given specific insertion sequence and exhibiting galactose-talose epimerization activity, and a method for producing talose using said protein; production methods for the proteins; and an enzyme preparation containing the proteins. The present invention provides a method by which it is possible to respectively produce mannose and talose efficiently, and an enzyme or enzyme preparation which can be used in the method.

(57) 要約：本発明は、特定の特異的な挿入配列を含む、グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質及びこのタンパク質を用いるマンノースの製造方法；特定の特異的な挿入配列を含む、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質及びこのタンパク質を用いるタロースの製造方法；これらタンパク質の製造方法並びにこれらタンパク質を含む酵素剤に関する。本発明は、マンノース及びタロースをそれぞれ効率よく製造できる方法及びその方法に用いることができる酵素又は酵素剤を提供する。

WO 2019/035482 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： エピメリ化活性を有するタンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、エピメリ化活性を有するタンパク質に関する。

関連出願の相互参照

本出願は、２０１７年８月１７日出願の日本特願２０１７－１５７６６４号の優先権を主張し、それらの全記載は、ここに特に開示として援用される。

背景技術

[0002] マンノースは、グルコースの異性体であり、コンニャクなどから抽出されるグルコマンナン、ヘミセルロース、あるいは細胞表面などに存在する糖鎖の構成糖として良く知られている。また、マンノースそのものとしてはクランベリーに含まれることが知られている。

[0003] マンノースの生体利用性は低く、経口摂取したマンノースの殆どは速やかに尿中に排出される。尿路感染症の原因菌は、当該菌が有するマンノース結合タンパク質（レクチン）と、尿路表面細胞表面に存在する糖鎖の結合を介して尿路表面細胞へ付着し感染する、というメカニズムが提唱されている。先述の通り、経口摂取したマンノースは尿中に速やかに排出されるため、排出されたマンノースは当該菌のマンノースレクチンと細胞表面糖鎖への結合を阻害するため、尿路感染症を予防する効果が期待されている。

[0004] 特許文献１にはマンノース含有糖組成物を有効成分とする有害菌感染抑制剤または有害菌感染防止用飼料に関わる技術が開示されている。特許文献２にはマンノースを有効成分とする飲食品の食感改良剤についての記述がある。

[0005] マンノースの調製法としては、化学反応法及び酵素法が知られている。

[0006] 第一の化学反応法は、フラクトースを還元することでソルビトールとマンニトールを生成し、マンニトールを分取し、さらにマンニトールを酸化する

ことでマンノースを調製する方法である。しかし、この方法は多段階のステップおよび高温高圧での触媒反応を必要とするため、効率面で問題がある。

[0007] 第二の化学反応法は、グルコマンナンやマンナンを加水分解することでマンノースを調製する方法である。しかし、この方法は、基質が高価でありかつ基質の調整に労力を要するという問題がある。

[0008] 第三の化学反応法は、コプラミールなどのヘミセルロースを加水分解する手法である。しかし、この方法は、構成糖が多様であるためマンノースの収率が悪く、酸加水分解の場合はさらに収率が悪化し精製負荷が大きくなるという問題がある。

[0009] 第四の化学反応法は、グルコースをアルカリ条件下で異性化することでマンノースを調製する方法である。しかし、この方法は、糖の分解が生じるため収率が悪く、精製負荷が大きいという問題がある。

[0010] 第五の化学反応法は、同じくフルクトースをアルカリ条件下で異性化することでマンノースを調製する方法である。しかし、この方法は、第四の化学反応法と同様に収率および精製負荷の点で問題があり、またフルクトースがグルコースに比べ比較的高価である点およびフルクトースが反応系に残存してしまいマンノースとの分離が困難である点でも問題がある。

[0011] 第一の酵素法としては、フルクトースにマンノースイソメラーゼを作用させることでマンノースを調製する方法である。しかし、原料となるフルクトースの価格面および反応系に残存するフルクトースの分離の点で問題がある。

[0012] 第二の酵素法としては、グルコースあるいはフルクトースに対してアルドース－ケトースイソメラーゼ（Ａｌｄｏｓｅ－ｋｅｔｏｓｅ　ｉｓｏｍｅｒａｓｅ、以下「ＡＫＩ」と記載する）を作用させることでマンノースを調製する方法である。しかし、この方法は、反応系に残存するフルクトースの分離の点でやはり問題がある。

[0013] また、セロビオースなどの還元末端糖残基がβ－１，４結合で結合している２つ以上の糖残基からなる糖について、前記還元末端糖残基の２位の水酸

基を２－エピメリ化（異性化）する反応、またはその逆反応を触媒する酵素として、セロビオース２－エピメラーゼ（Ｃｅｌｌｏｂｉｏｓｅ　２－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ、以下「ＣＥ」と記載する）が知られている（特許文献３、特許文献４）。当該酵素により、グルコースがβ－１，４結合されたセロビオースを４－Ｏ－β－グルコシルマンノースへ変換、またはその逆反応を触媒することができる。また、特許文献４には、当該セロビオース２－エピメラーゼをグルコースに作用させると、マンノースが得られたことが記載されている（第三の酵素法）。

[0014] 特許文献１：日本特開２００１－２１３７８１号

特許文献２：日本特開２００１－２７５５８３号

特許文献３：日本特開２０１２－１３０３３２号

特許文献４：ＷＯ２０１０／０９００９５

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] しかし、特許文献４に記載のＣＥを用いる第三の酵素法では、ＣＥがエピメリ化反応に加えアルドース－ケトース異性化反応も触媒する。そのため、マンノースと共にフルクトースも生成してしまい、副生するフルクトースの分離の点で問題がある。

また、これまで、ケトースを実質的に生成せずにアルドース間で異性化する酵素はＡＧＥやＣＥしか報告されておらず、非修飾単糖類にて同様の反応を行う酵素はこれまで全く知られていない。

[0016] 本発明は、より安価・簡便にマンノースを製造する手段を提供することを目的とする。より詳細には、比較的安価な原料を用いてマンノースを効率よく製造できる方法及びその方法に用いることができる酵素又は酵素剤を提供することが本発明の課題であり、目的である。タロースを効率よく製造できる方法及びその方法に用いることができる酵素又は酵素剤を提供することも本発明の課題であり、目的である。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、これまでにＣＥをはじめ、種々の糖の異性化酵素を探索してきた。

[0018] ルネラ・スリシフォルミス（Runella slithyformis）はゲノム上にＮ－アシルグルコサミン２－エピメラーゼ（Ｎ－ａｃｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ２－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ、以下「ＡＧＥと記載する」）をコードすると推定される遺伝子を３種類有していることが知られている（Gene Bank）。それぞれを発現解析した結果、３種のうち２種はＣＥ活性を有していたが、残る１種についてはＡＧＥ活性およびＣＥ活性を有しなかった。このＡＧＥ活性およびＣＥ活性を有しなかったタンパク質について、各種糖質に対する反応性を検討した。その結果、このＣＥ活性を有しないタンパク質は、驚くべきことに、グルコースおよびマンノースに対して作用し、それぞれマンノースおよびグルコースを生成した。すなわち、当該タンパク質はグルコースとマンノースを相互に変換するマンノース２－エピメラーゼ（Ｍａｎｎｏｓｅ２－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ、以下「ＭＥ」と記載する）であることが明らかとなった。

[0019] さらに、ディアドバクター ファーメンタンス（Ｄｙａｄｏｂａｃｔｅｒｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）からＡＧＥと推定されるタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、組換酵素の各種糖質に対する反応性を検討した。その結果、ＡＧＥと推定されるタンパク質の中に、ＭＥ活性を有するタンパク質があることが明らかとなった。

[0020] これらのタンパク質は、既知のＣＥ等の一次アミノ酸配列と比較すると特異的な挿入配列を有しており、当該挿入配列の存在がＭＥとしての機能上極めて重要であること、さらに当該挿入配列に類似する複数のＭＥを新たに見出し、本発明を完成するに至った。

[0021] 本発明は以下の通りである。

［１］

（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列

の挿入配列を有し、

前記挿入配列のＮ末端側に配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び

前記挿入配列のＣ末端側に配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質、又は

（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、

前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び

前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質（但し、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２または配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を除く）。

［２］

配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、

一般式（１）：

X^1ＡＰＱＩＫＦＤ$X^2$$X^3$ＷＧＷＤＲＦ$X^4$$X^5$$X^6$$X^7$$X^8$$X^9$$X^{10}$（但し、$X^1$はＶ又はＩであり、$X^2$はＩ又はＶであり、$X^3$はＶ又はＩであり、$X^4$はＮ、Ｔ又はＳであり、$X^5$はＰ又はＥであり、$X^6$はＤ又はＧであり、$X^7$はＧ又はＤであり、$X^8$はＬ、Ｖ、Ｑ又はＡであり、$X^9$はＫ又はＱであり、$X^{10}$はＳ、Ａ、Ｅ又はＫである）のアミノ酸配列、

配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号４に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［１］に記載のタンパク質。
［３］
配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号６に示されたアミノ酸配列の２６４～４２２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２６４～４２７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［１］又は［２］に記載のタンパク質。

［４］

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、
一般式（２）：
ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ
（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［１］に記載のタンパク質。

［５］

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［１］又は［４］に記載のタンパク質。

［６］

［１］～［５］のいずれか１項に記載のタンパク質を有効成分として含有する、グルコースとマンノースのエピメリ化剤。

［７］

ガラクトースとタロースのエピメリ化活性をさらに有する［１］～［５］のいずれか１項に記載のタンパク質。

［８］

（ｃ）配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列
の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質、
又は
（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質（

但し、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２または配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を除く）。

［９］

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［８］に記載のタンパク質。

［１０］

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、

一般式（２）：

ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ

（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は

配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸

配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［８］に記載のタンパク質。
［１１］
配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質または当該タンパク質のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分とするグルコースとマンノースのエピメリ化剤。
［１２］
グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びにガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有することが知られていないタンパク質から、（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有するタンパク質、または（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有するタンパク質を選択すること及び
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）で選択したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両

方を有するタンパク質を選択することを含む、
グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びに／又はガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法。
［１３］
（ｄ）アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列に、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列若しくは配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を挿入すること、または（ｅ）アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部の配列を、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列若しくは配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列に改変すること、及び
（ｆ）（ｄ）または（ｅ）で挿入又は改変したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質を選択することを含む、
エピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法。
［１４］
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、
一般式（１）：
X^1ＡＰＱＩＫＦＤ$X^2$$X^3$ＷＧＷＤＲＦ$X^4$$X^5$$X^6$$X^7$$X^8$$X^9$$X^{10}$（但し、$X^1$はＶ又はＩであり、$X^2$はＩ又はＶであり、$X^3$はＶ又はＩであり、$X^4$はＮ、Ｔ又はＳであり、$X^5$はＰ又はＥであり、$X^6$はＤ又はＧであり、$X^7$はＧ又はＤであり、$X^8$はＬ、Ｖ、Ｑ又はＡであり、$X^9$はＫ又はＱであり、$X^{10}$はＳ、Ａ、Ｅ又はＫである）のアミノ酸配列、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ

酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［１２］又は［１３］に記載の製造方法。
［１５］
（ａ）、（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質が、配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有し、かつ
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２６４～４２２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号８に示されたアミノ酸配列の２６４～４２７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有する、［１２］～［１４］のいずれか１項に記載の製造方法。

［１６］

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、
一般式（２）：
ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ
（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、［１２］又は［１３］に記載の製造方法。

［１７］

（ｂ）、（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質が、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有し、かつ
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有する、［１２］、［１３］又は［１６］に記載の製造方法。

［１８］

グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造である、［１２］～［１７］のいずれか１項に記載の製造方法。

［１９］

ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造である、［１２］～［１７］のいずれか１項に記載の製造方法。

［２０］

グルコースに、［１］～［５］のいずれか１項に記載のタンパク質、［６］若しくは［１１］に記載のエピメリ化剤又は［１２］～［１８］のいずれか１項に記載の方法で製造したタンパク質を作用させて、マンノースを生成させることを含む、マンノースの製造方法。

［２１］

配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質または当該タンパク質のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分とするガラクトースとタロースのエピメリ化剤。

［２２］

ガラクトースに、［７］～［１０］のいずれか１項に記載のタンパク質、［１２］～［１７］のいずれか１項に記載の方法で製造したタンパク質、または［２１］に記載のエピメリ化剤を作用させて、タロースを生成させることを含む、タロースの製造方法。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、安価なグルコースを原料とし、本発明者らが新たな基質特異性を有することを見出した複数のＭＥにより、グルコースをマンノースへそれぞれエピメリ化することでより、簡便かつ効率的にマンノースを製造することができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]Runsl_4512遺伝子産物(RsME)の各種基質に対する反応性試験結果を示す

。

[図2]RsMEのグルコース、マンノースおよびフルクトースに対する反応性試験結果を示す。

[図3]RsMEの最適pHを求める試験結果を示す。

[図4]RsMEのpH安定性試験結果を示す。

[図5]RsMEの熱安定性試験結果を示す。

[図6]RsMEのグルコースからのマンノース生成試験（温度依存性）結果を示す。

[図7]Dfer_5652遺伝子産物(DfME)の各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図8]DfMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図9]DfMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図10]DfMEの最適pHを求める試験結果を示す。

[図11]DfMEのpH安定性試験結果を示す。

[図12]DfMEの熱安定性試験結果を示す。

[図13]Emtol_1243遺伝子産物(EoME)の各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図14]EoMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図15]Slin_6381遺伝子産物(SlME)の各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図16]SlMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図17]Spirs_3060遺伝子産物(SsME)の各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図18]SsMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図19]Trebr_2067遺伝子産物(TbME)の各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図20]TbMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図21]Treaz_2550遺伝子産物(TaME)の各種基質に対する反応性試験結果を示

す。

[図22]TaMEの各種基質に対する反応性試験結果を示す。

[図23a]挿入配列付近のタンパク質Ｒｕｎｓｌ＿４５１２およびＤｆｅｒ＿５６５２のアミノ酸配列、機能未知及び既知のＣＥ等の一次アミノ酸配列との比較表。

[図23b]タンパク質Ｒｕｎｓｌ＿４５１２を含む、機能未知のタンパク質であって挿入配列付近の一次アミノ酸配列比較表。

[図23c]タンパク質Ｄｆｅｒ＿５６５２を含む、機能未知のタンパク質であって挿入配列付近の一次アミノ酸配列との比較表。

[図24]Ｒｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子の塩基配列（配列番号１）及びこの塩基配列がコードするＲｕｎｓｌ＿４５１２タンパク質のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

[図25]Ｄｆｅｒ＿５６５２遺伝子の塩基配列（配列番号３）及びこの塩基配列がコードするＤｆｅｒ＿５６５２タンパク質のアミノ酸配列（配列番号４）を示す。

[図26]Ｅｍｔｏｌ＿１２４３遺伝子の塩基配列（配列番号５）及びこの塩基配列がコードするＥｍｔｏｌ＿１２４３タンパク質のアミノ酸配列（配列番号６）を示す。

[図27]Ｓｌｉｎ＿６３８１遺伝子の塩基配列（配列番号７）及びこの塩基配列がコードするＳｌｉｎ＿６３８１タンパク質のアミノ酸配列（配列番号８）を示す。

[図28]Ｓｐｉｒｓ＿３０６０遺伝子の塩基配列（配列番号９）及びこの塩基配列がコードするＳｐｉｒｓ＿３０６０タンパク質のアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。

[図29]Ｔｒｅｂｒ＿２０６７遺伝子の塩基配列（配列番号１１）及びこの塩基配列がコードするＴｒｅｂｒ＿２０６７タンパク質のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。

[図30]Ｔｒｅａｚ＿２５５０遺伝子の塩基配列（配列番号１３）及びこの塩

基配列がコードするＴｒｅａｚ＿２５５０タンパク質のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。

発明を実施するための形態

[0024] 本明細書における糖質の記載について、特に明記しない場合はＤ体を表す。

[0025] ＜グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質＞

本発明は、下記（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列を有するグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質に関する。但し、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２または配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を除く。

（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質。

（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質。

[0026] 前述したように、ルネラ・スリシフォルミス（Ｒｕｎｅｌｌａ　ｓｌｉｔｈｙｆｏｒｍｉｓ）（ＤＳＭ１９５９４）はゲノム上にＮ－アシルグルコサミン２－エピメラーゼ（ＡＧＥ）をコードすると推定される遺伝子を３種類有していることが知られている（Gene Bank）。本発明者等はそれぞれを発現

解析した結果、３種のうち２種はＣＥ活性を有していたが、残る１種についてはＡＧＥ活性およびＣＥ活性を有しなかった。このＡＧＥ活性およびＣＥ活性を有しなかったタンパク質について、各種糖質に対する反応性を検討した（実施例１）。その結果、このＣＥ活性を有しないタンパク質は、驚くべきことに、グルコースおよびマンノースに対して作用し、それぞれマンノースおよびグルコースを生成した。すなわち、当該タンパク質はグルコースとマンノースを相互に変換するマンノース２－エピメラーゼ（ＭＥ）であることが明らかとなった。このＣＥ活性を有しないタンパク質が、配列番号２に示された１～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列を有するタンパク質（Ｒｕｎｓｌ＿４５１２）である。Ｒｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子の塩基配列は、配列番号１の塩基配列であり、またこの塩基配列からＲｕｎｓｌ＿４５１２は、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることがＧｅｎｅ Ｂａｎｋに公開されている（Ｇｅｎｅ Ｂａｎｋ ＩＤ：ＷＰ＿０１３９３０１２４）。但し、配列番号２に示された１～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列を有するタンパク質（Ｒｕｎｓｌ＿４５１２）は、本発明以前においては機能未知であった。

[0027] 本発明においては、さらに、ディアドバクター ファーメンタンス （Ｄｙａｄｏｂａｃｔｅｒ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）（ＤＳＭ１８０５３）からＡＧＥと推定されるタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、組換酵素の各種糖質に対する反応性を検討した（実施例２）。その結果、ＡＧＥと推定されるタンパク質の中に、ＭＥ活性を有するタンパク質（Ｄｆｅｒ＿５６５２）があることが明らかとなった。Ｄｆｅｒ＿５６５２遺伝子の塩基配列は、配列番号３の塩基配列であり、またこの塩基配列からタンパク質（Ｄｆｅｒ＿５６５２）は、配列番号４で表される１～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列からなることがＧｅｎｅ Ｂａｎｋに公開されている（Ｇｅｎｅ Ｂａｎｋ ＩＤ：ＷＰ＿０１５８１５０８２）。但し、タンパク質（Ｄｆｅｒ＿５６５２）本発明以前においては機能未知であった。

[0028] これら２つのタンパク質Ｒｕｎｓｌ＿４５１２およびＤｆｅｒ＿５６５２

は、既知のＣＥ等の一次アミノ酸配列と比較すると特異的な挿入配列（以下、単に挿入配列ということがある）を有しており（図２３ａ～ｃ）、この挿入配列の存在がＭＥとしての機能上極めて重要であろうと推定した。この挿入配列が、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列である。次いで、Ｎ－ａｃｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ２－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ　（ＡＧＥ）等とデータベース上で推定され、更にこの挿入配列と一定以上の同一性を有する配列を有する機能未知のタンパク質を探索し、追加で５種のタンパク質の機能を検討した。それらが、エムティシシア　オリゴトロフィカ（Ｅｍｔｉｃｉｃｉａ　ｏｌｉｇｏｔｒｏｐｈｉｃａ）、スピロソマ　リンガレ（Ｓｐｉｒｏｓｏｍａ　ｌｉｎｇｕａｌｅ）、セディミニスピロケータ　スマラジナエ（Ｓｅｄｉｍｉｎｉｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａ　ｓｍａｒａｇｄｉｎａｅ）、トレポネマ　ブレナボレンス（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ｂｒｅｎｎａｂｏｒｅｎｓｅ）およびトレポネマ　アゾトヌトリシウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ａｚｏｔｏｎｕｔｒｉｃｉｕｍ）のゲノム上にそれぞれ存在する、ＡＧＥ等とデータベース上で推定されている遺伝子にコードされたタンパク質であり、これらタンパク質の各種糖質に対する反応性を検討した。その結果、挿入配列を有するＡＧＥ等と推定されるタンパク質はいずれも、ＭＥ活性を有するタンパク質（Ｅｍｔｏｌ＿１２４３、Ｓｌｉｎ＿６３８１、Ｓｐｉｒｓ＿３０６０、Ｔｒｅｂｒ＿２０６７およびＴｒｅａｚ＿２５５０）であることが明らかとなった（実施例３～７）。Ｅｍｔｏｌ＿１２４３、Ｓｌｉｎ＿６３８１、Ｓｐｉｒｓ＿３０６０、Ｔｒｅｂｒ＿２０６７およびＴｒｅａｚ＿２５５０遺伝子の塩基配列は、それぞれ配列番号５、７、９、１１、１３の塩基配列であり、またこの塩基配列からタンパク質（Ｅｍｔｏｌ＿１２４３、Ｓｌｉｎ＿６３８１、Ｓｐｉｒｓ＿３０６０、Ｔｒｅｂｒ＿２０６７およびＴｒｅａｚ＿２５５０）は、それぞれ配列番号６、８、１０、１２及び１４で表されるアミノ酸配列からなることがＧｅｎｅ　Ｂａｎｋに公開されている（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　ＩＤ：それぞれ、ＷＰ＿０１５０２８０９２、ＡＤＢ４２３３９、ＷＰ＿０１３２５５６２０

、ＷＰ＿０１３７５９１８５およびＷＰ＿０１５７１２９７７）。但し、これらのタンパク質は、本発明以前においては機能未知であった。

[0029] （ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であることができる。さらに（ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、例えば、一般式（１）：X^1ＡＰＱＩＫＦＤ$X^2$$X^3$ＷＧＷＤＲＦ$X^4$$X^5$$X^6$$X^7$$X^8$$X^9$$X^{10}$（但し、$X^1$はＶ又はＩであり、$X^2$はＩ又はＶであり、$X^3$はＶ又はＩであり、$X^4$はＮ、Ｔ又はＳであり、$X^5$はＰ又はＥであり、$X^6$はＤ又はＧであり、$X^7$はＧ又はＤであり、$X^8$はＬ、Ｖ、Ｑ又はＡであり、$X^9$はＫ又はＱであり、$X^{10}$はＳ、Ａ、Ｅ又はＫである）のアミノ酸配列であることができる。

一般式（１）のアミノ酸配列は、配列番号２、４、６、８及び１０で表されるアミノ酸配列における挿入配列に基づき、かつX^1、X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7、X^8、X^9、X^{10}は、これらの挿入配列におけるバリエーションから決定されたものである。

[0030] （ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、例えば、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミ

ノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。これら２４１～２６３アミノ酸残基（配列番号２、４、６、８）又は２４１～２６４アミノ酸残基（配列番号１０）は、各タンパク質における挿入配列である。

[0031] （ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに（ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、

配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号４に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号６に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号８に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0032] （ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに（ａ）のタンパク質における配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、

配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、

配列番号４に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２６４～４２２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２６４～４２７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0033] （ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であることができる。さらに（ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、例えば、一般式（２）：
ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ
（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列であることができる。一般式（２）のアミノ酸配列は、配列番号１２及び１４で表されるアミノ酸配列における挿入配列に基づき、かつＸ^{11}、Ｘ^{12}、Ｘ^{13}、Ｘ^{14}、Ｘ^{15}は、これらの挿入配列におけるバリエーションから決定されたものである。

[0034] （ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることもできる。

[0035] （ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～

２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに（ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0036] （ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに（ｂ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0037] 尚、本願明細書においてアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列とは、好ましくは９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0038] 本発明において、タンパク質がグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質であることは、実施例にも記載された以下の活性測定方法により確認することができる。

活性測定

10 mMマンノース、40 mM HEPES-NaOH緩衝液（pH 8.0）、およびタンパク質（酵素）を含む反応液100μLを37℃に20分間保持し、80℃にて5分間加熱する

ことで酵素反応を停止する。12000 rpmにて10分間遠心分離して得られた上清50μLに含まれるグルコース量をThio-NAD^+を用いたヘキソキナーゼ法により定量する。ヘキソキナーゼ法は、0.5 mM Thio-NAD^+、7 mM ATP、0.1 M Tris-HCl（pH 7.5)、1.0 mM $MgCl_2$、1.0 U/mL ヘキソキナーゼ（パン酵母由来、ナカライテスク）および1.0 U/mL G6Pデヒドロゲナーゼ（ナカライテスク）を含む発色試薬を反応液に等量添加して37℃に20分間保持し、G6Pの酸化反応に伴い生成されたThio-NADHの最大吸光波長405 nmの吸光度を分光光度計により測定する。酵素活性1 Uを1分間に1μmolのグルコースを生成する酵素量と定義する。

[0039] 本発明のグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質には、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性をさらに有するタンパク質がある。ガラクトースとタロースのエピメリ化活性をさらに有するタンパク質であることは、実施例にも記載された以下の活性測定方法により確認することができる。

活性測定

10 mM ガラクトース、40 mM HEPES-Na緩衝液（pH 8.0）、およびタンパク質（酵素）を含む反応液100μLを37℃に20分間保持し、80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止する。この反応停止液をHPLC分析に供し、酵素反応によって生成したタロースを検出する。なお、HPLCは『HILICpak VG-50 4E』カラム（Shodex社製）を用い、カラム温度40℃、流速0.6 ml/min、溶媒は80% アセトニトリルとして行う。酵素活性1 Uを1分間に1μmolのタロースを生成する酵素量と定義する。

[0040] ＜エピメリ化剤＞

本発明は、上記本発明のタンパク質を有効成分として含有する、グルコースとマンノースのエピメリ化剤を包含する。エピメリ化剤は、グルコースとマンノースをエピメリ化することができればよく、上記本発明のタンパク質以外に、他の酵素、安定化剤、賦形剤など、通常の酵素製剤に用いる素材を含んでいてもよい。また、その形状も特に制限は無く、粉末状、液状でもよ

く、担体に固定化された固定化酵素であっても良い。本発明のエピメリ化剤は、例えば、基質であるグルコースの水溶液に添加することで使用することができる。

[0041] 本発明は、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質または当該タンパク質のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分とするグルコースとマンノースのエピメリ化剤を包含する。

[0042] 配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２及び配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質は、それぞれＲｕｎｓｌ＿４５１２、Ｄｆｅｒ＿５６５２、Ｅｍｔｏｌ＿１２４３、Ｓｌｉｎ＿６３８１、Ｓｐｉｒｓ＿３０６０、Ｔｒｅｂｒ＿２０６７およびＴｒｅａｚ＿２５５０のタンパク質であり、これらは、前述したように、ＭＥ活性を有する。

[0043] 本発明のエピメリ化剤は、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列と同一性が７０％以上、７５％以上、好ましくは、同一性が８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分として含有する。グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質であることは前述の活性測定方法にて確認できる。

[0044] ＜ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質＞

本発明は、下記（ｃ）又は（ｄ）のアミノ酸配列を有するガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質も包含する。但し、本発明のガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質から、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２

または配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を除かれる。

（ｃ）配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質。

（ｄ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質。

[0045] （ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列（１～４２８アミノ酸残基）を有するタンパク質は、Ｓｐｉｒｓ＿３０６０タンパク質であり、このタンパク質は、グルコースとマンノースのエピメリ化活性に加えて、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性も有する。

[0046] （ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であることができる。さらに、（ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0047] （ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに（ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0048] （ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに（ｃ）のタンパク質における配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0049] （ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であることができる。さらに、（ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、一般式（２）：

ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ

（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は

配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミ

ノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0050] （ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列（１～４１９アミノ酸残基）を有するタンパク質は、Ｔｒｅｂｒ＿２０６７タンパク質であり、配列番号１４に示されたアミノ酸配列（１～４３０アミノ酸残基）を有するタンパク質は、Ｔｒｅａｚ＿２５５０タンパク質であり、これらのタンパク質も、グルコースとマンノースのエピメリ化活性に加えて、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有する。

[0051] （ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに、（ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は

配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0052] （ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上であることができる。さらに、（ｄ）のタンパク質における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列は、例えば、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0053] 本発明のタンパク質は、その由来は特に限定されるものではない。例えば

、本発明のタンパク質は、各種遺伝子工学的技術により製造した組換えタンパク質であってもよいし、化学合成により製造した合成タンパク質であってもよい。

[0054] 遺伝子工学技術により本発明の組換えタンパク質を製造する場合には、上述の本発明のタンパク質をコードする核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）を作成し、各種発現ベクターに組み込むことにより、本発明のタンパク質を発現させることができる。本発明のタンパク質をコードする核酸を作製するに当たり、アミノ酸の欠失、置換及び／または付加を施すためには、例えば、エラープローンＰＣＲ法、ＤＮＡシャッフリング法、各種部位特異的変異導入法などにより、任意の塩基の欠失、置換及び／または挿入を行うことができる。このようにして作製した本発明のタンパク質をコードする核酸を適当な発現系に導入することにより、本発明のタンパク質を製造することができる。

[0055] 本発明のタンパク質を製造するために利用可能な発現系としては、特に限定させるものではないが、例えば各種生物種（ホスト）において組換えタンパク質の発現を可能とする発現ベクターを利用することができる。利用可能な発現ベクターとしては、細菌、菌類（例えば、酵母類）等の微生物、植物、昆虫細胞、哺乳類細胞などのホストにおいてタンパク質の発現を可能とする各種発現ベクターを用いることが可能であり、ウイルスベクター（ファージベクターを含む）でもプラスミドベクターであってもよい。或いは、ウサギ網状赤血球ライセート、小麦胚芽ライセート、大腸菌ライセート等を用いた無細胞タンパク質発現系を用いて、本発明のタンパク質を製造してもよい。

[0056] 特定の生物種をホストとして用いた発現系で本発明のタンパク質を発現させる場合には、上記本発明のタンパク質をコードする核酸をベクター上に搭載し、このベクターによって宿主細胞を形質転換した後、形質転換させた宿主細胞を培養して培養物中に前記遺伝子がコードするタンパク質を蓄積し、蓄積したタンパク質を収集することを含む、製造方法により調製することができる。

[0057] 本発明においては、本発明のタンパク質をコードする核酸、該核酸を含むベクター、該ベクターにより形質転換された形質転換体は本発明の一態様である。

[0058] 本発明のタンパク質をコードする核酸の取得方法は特に限定されない。例えば、以下の実施例に記載の通り、本発明のタンパク質をコードする核酸を材料として本発明のタンパク質をコードする核酸を取得してもよいし、或いは本発明のタンパク質をコードする核酸を調製して、それに適当な置換等を行って、本発明のタンパク質をコードする核酸を製造してもよい。また、本発明のタンパク質をコードする核酸は、化学合成、遺伝子工学的手法又は突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することができる。

[0059] 本発明のタンパク質は、アミノ酸配列又はそれをコードする塩基配列が分かれば既存の方法で適宜調製することができる。このような製造方法に加えて本発明は以下の製造方法（１）及び（２）も包含する。

[0060] ＜エピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法＞

本発明のグルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びに／又はガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法（１）は、グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びにガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有することが知られていないタンパク質から、（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有するタンパク質、または（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有するタンパク質を選択すること及び

（ｃ）（ａ）又は（ｂ）で選択したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質を選択することを含む。

[0061] 上記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質の選択は、アミノ酸配列が既知のタンパク質のアミノ酸配列情報に基づいて行うことができる。本製造方法に用い

るアミノ酸配列既知のタンパク質としては、後述の表５並びに図２３ｂ及び図２３ｃに示す、挿入配列を有するタンパク質を例示することができる。（ｃ）における選択したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質の選択は、選択したタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡを調製し、これを発現し、酵素活性を測定することで実施することができる。ＤＮＡ調製、発現は、前述の既存の方法で実施できる。酵素活性測定は、前述のとおりである。

[0062] 本発明のグルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びに／又はガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法（２）は、（ｄ）アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列に、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列若しくは配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を挿入すること、または（ｅ）アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部の配列を、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列若しくは配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列に改変すること、及び

（ｆ）（ｄ）または（ｅ）で挿入又は改変したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質を選択することを含む。

[0063] 上記（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質への配列挿入及び改変は、アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列情報に基づいて行うことができる。アミノ酸配列既知のタンパク質の例としては、図２３ａに示すタンパク質を挙げることができる。挿入及び改変したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又

はその両方を有するタンパク質の選択は、選択したタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡを調製し、これを発現し、酵素活性を測定することで実施することができる。上記（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質への配列挿入及び改変は、好ましくは、特許文献３及び４に記載のＣＥとアミノ酸配列の同一性が７０％以上のアミノ酸配列に対し実施するができる。グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質が選択される確率が高くなるという観点から、好ましくは、８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であるタンパク質のアミノ酸配列に対して配列挿入及び／又は改変を行うのよりこのましい。また、上記（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質への配列挿入及び改変は、図２３ａに示すアミノ酸配列既知のタンパク質に対して行うこともでき、アミノ酸配列既知のタンパク質は、機能既知であっても、機能未知であっても、本発明で特定する挿入配列を有さないアミノ酸配列であればよい。本発明で特定する挿入配列を挿入し、必要により、挿入配列部分またはその前後の配列の改変を行うこともできる。機能既知のタンパク質への、本発明で特定する挿入配列の挿入により、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質に改変される可能性がある。ＤＮＡ調製、発現は、前述の既存の方法で実施できる。酵素活性測定は、前述のとおりである。

[0064] グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びに／又はガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法（１）及び（２）では、

（ａ）、（ｄ）又は（ｅ）における配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であることができ、例えば、一般式（１）：

X^{1}ＡＰＱＩＫＦＤ$X^{2}X^{3}$ＷＧＷＤＲＦ$X^{4}X^{5}X^{6}X^{7}X^{8}X^{9}X^{10}$（但し、$X^{1}$はＶ又

はＩであり、X^2はＩ又はＶであり、X^3はＶ又はＩであり、X^4はＮ、Ｔ又はＳであり、X^5はＰ又はＥであり、X^6はＤ又はＧであり、X^7はＧ又はＤであり、X^8はＬ、Ｖ、Ｑ又はＡであり、X^9はＫ又はＱであり、X^{10}はＳ、Ａ、Ｅ又はＫである）のアミノ酸配列、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0065] エピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法（１）及び（２）では、
（ａ）、（ｄ）又は（ｅ）を経て、（ｃ）又は（ｆ）で調製されるタンパク質が、配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有し、かつ
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ

酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２６４～４２２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２６４～４２７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有するタンパク質であることができる。

[0066] エピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法（１）及び（２）では、（ｂ）、（ｄ）又は（ｅ）における配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列は、好ましくは、同一性が８０％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上であることができ、例えば、
一般式（２）：
ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ
（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であることができる。

[0067] エピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法（１）及び（２）では、（ｂ）、（ｄ）又は（ｅ）を経て、（ｃ）又は（ｆ）で調製されるタンパク質が、（ｂ）のタンパク質が、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有し、かつ

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有するタンパク質であることができる。

[0068] 本発明の製造方法（１）及び（２）は、グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造である。本発明の製造方法は、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造であることもできる。ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造においては、酵素活性の測定をガラクトースとタロースのエピメリ化活性について行えばよい。

[0069] ＜マンノースの製造方法＞

本発明は、マンノースの製造方法を包含し、本発明のマンノースの製造方法は、グルコースに、本発明のグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質、本発明のエピメリ化剤又は本発明の方法で製造したタンパク質を作用させて、マンノースを生成させることを含む。本発明のタンパク質等を用いるグルコースからマンノースの生成は、例えば、グルコースを含む固形分濃度１～５０％程度の糖質水溶液を調製し、必要応じて酸又はアルカリを用いてｐＨを６～１０程度に調整し、当該溶液に本発明のタンパク質を加え３０～６０℃に１～７２時間保持することでマンノース（マンノース含有糖質組成物）を製造することができる。上記酵素反応の後、必要に応じて常法を用いてマンノース含有糖質組成物に脱色・脱塩・精製処理などを施すことができる。さらに、得られたマンノース含有糖質組成物に樹脂分画処理等を施すことでマンノースと基質であるグルコース等を分離し、マンノース純度を高めることもできる。また、本発明のタンパク質を担体に固定して固定化酵素とし、当該固定化酵素に上記基質溶液を接触させることでマンノース（マンノース含有糖質組成物）を製造することもできる。

[0070] グルコースからマンノースを生成する際の基質としては、グルコース純品

を用いても良いが、コスト等の点から他の糖質が含まれる糖組成物を用いてもよく、例えば、水飴、粉飴、ハイドロール（結晶グルコース製造の際に生ずる分蜜液）などを用いることができる。さらに、例えばデキストリン、澱粉等のグルコースを構成糖として含む糖質を原料とし、本発明のタンパク質と共に加水分解酵素を添加し、原料より基質となるグルコースを生成しつつグルコースからマンノースを製造することもできる。

[0071] ＜ガラクトースとタロースのエピメリ化剤＞

本発明は、ガラクトースとタロースのエピメリ化剤を包含する。本発明のガラクトースとタロースのエピメリ化剤は、配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質または当該タンパク質のアミノ酸配列と同一性が７０％以上、７５％以上、好ましくは、同一性が８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上のガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分とする。

[0072] ＜タロースの製造方法＞

本発明は、タロースの製造方法を包含し、本発明のタロースの製造方法は、ガラクトースに、本発明のガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質、または本発明の方法で製造したガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質、または本発明のガラクトースとタロースのエピメリ化剤を作用させて、タロースを生成させることを含む。本発明のタンパク質等を用いるガラクトースからタロースの生成は、例えば、ガラクトースを含む固形分濃度１～５０％程度の糖質水溶液を調製し、必要に応じて酸又はアルカリを用いてｐＨを６～１０程度に調整し、当該溶液に本発明のタンパク質を加え３０～６０℃に１～７２時間保持することでタロース（タロース含有糖質組成物）を製造することができる。上記酵素反応の後、必要に応じて常法を用いてタロース含有糖質組成物に脱色・脱塩・精製処理などを施すことができる。さらに、得られたタロース含有糖質組成物に樹脂分画処理等を施すことでタロースと基質であるガラクトース等を分離し、タ

ロース純度を高めることもできる。また、本発明のタンパク質を担体に固定して固定化酵素とし、当該固定化酵素に上記基質溶液を接触させることでタロース（タロース含有糖質組成物）を製造することもできる。

[0073] ガラクトースからタロースを生成する際の基質としては、ガラクトース純品を用いても良いが、コスト等の点から他の糖質が含まれる糖組成物を用いてもよい。さらに、例えば乳糖等のガラクトースを構成糖として含む糖質を原料とし、本発明のタンパク質と共に加水分解酵素を添加し、原料より基質となるガラクトースを生成しつつガラクトースからタロースを製造することもできる。

実施例

[0074] 以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。但し、実施例は本発明の例示であって、本発明は実施例に限定される意図ではない。

[0075] ［実施例１］

本実施例では、ルネラ スリシフォルミス（Ｒｕｎｅｌｌａ ｓｌｉｔｈｙｆｏｒｍｉｓ）からＮ－ａｃｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ ２－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ（ＡＧＥ）と推定される機能未知のタンパク質（Ｒｕｎｓｌ＿４５１２）をコードする遺伝子をクローニングし、組換酵素の特性評価を行った。

[0076] （１）Ｒｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子のクローニング

Ｒ．ｓｌｉｔｈｙｆｏｒｍｉｓ（ＤＳＭ１９５９４）から、Ｒｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子をクローニングした。Ｒｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子の塩基配列は、配列番号１の塩基配列であること、また前記塩基配列からＲｕｎｓｌ＿４５１２は、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることがＧｅｎｅ Ｂａｎｋに公開されている。

[0077] （２）Ｒｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子産物の調製

配列番号１に示すＲｕｎｓｌ＿４５１２遺伝子から終止コドンを除いたものをｐＥＴ２３ａのＮｄｅ１－Ｘｈｏ１サイトに導入して、ヒスチジンタグを付与したＲｕｎｓｌ＿４５１２発現ベクターを構築した。前記発現ベクタ

ーを、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入して、形質転換体を調製した。前記形質転換体を、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを含むＬＢＡ培地３０ｍＬに植菌し、３７℃で一晩培養した。これを、ＬＢＡ培地１Ｌに入れ、波長６００ｎｍの吸光度（A_{600}）が０．５になるまで３７℃で培養した。培養液を氷冷した後、終濃度０．１ｍｍｏｌ／Ｌとなるように、０．１ｍｏｌ／Ｌイソプロピルβ－チオガラクトピラノシド１ｍＬを添加して、１６℃で２４時間培養した。培養液を７，０００×ｇ、４℃、１０分の条件で遠心分離し、菌体を回収した。菌体を０．５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌを含む３０ｍｍｏｌ／Ｌイミダゾール－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ　７）に懸濁し、超音波破砕により菌体を破砕した。得られた菌体破砕液を１０，０００×ｇ、４℃、１０分の条件で遠心分離し、上清を回収した。得られた無細胞抽出液をニッケルイオンをキレートしたＣｈｅｌａｔｉｎｇ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）　に供して組換Ｒｕｎｓｌ＿４５１２を精製した。すなわち，０．５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌを含む３０ｍｍｏｌ／Ｌイミダゾール－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ　７）で担体を洗浄後、０．５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌを含む２５０ｍｍｏｌ／Ｌ　イミダゾール－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ　７）により溶出した。得られた試料を１０ｍｍｏｌ／Ｌ　トリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ　７）に透析して以後の解析に用いた。試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより解析し、単一のバンドであることを確認した。

[0078] （３）反応生成物のＴＬＣ分析

５０ｍＭ各種基質、５０ｍＭ リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ　７）および０．１７２ｍｇ／ｍＬ　Ｒｕｎｓｌ＿４５１２からなる反応液５μＬを３７℃に４時間保持し、このうち１μＬを１－ブタノール／２－プロパノール／水＝２／２／１を展開溶媒としてＴＬＣに供した。糖をアニスアルデヒド／硫酸／酢酸＝１／２／９７をＴＬＣプレートに噴霧後，加熱することにより検出した。D-グルコース、D-マンノース、D-グルコサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、D-アロース、D-ガラクトース、D-キシロース、L-フコース、L-アラビノース、L-ラムノース、D-グルコース6-リン酸、D-マンノース6-リン

酸、D-フルクトース、D-リキソース、D-タガトース、D-キシルロース、L-ソルボース、D-タロース、D-アルトロース、β-1,4-マンノビオースおよびD-グルコン酸を基質とした。その結果を図１に示す。D-グルコースおよびD-マンノースからのみ反応生成物が検出された。

[0079] D-グルコース，D-マンノースおよびD-フルクトースに対する反応については，反応前後の試料をTLCにより分析した。上記と同様の組成の反応液20μLを同様に反応させ，TLCに供した。その結果を図２に示す。D-グルコースからのD-マンノースの生成，D-マンノースからのD-グルコースの生成が確認された。一方で、D-フルクトースからは反応生成物が検出されなかった。すなわち，Runsl_4512はD-グルコースとD-マンノースの相互変換を触媒するマンノース2-エピメラーゼであると判断された。

[0080] 活性測定

10 mMマンノース，40 mM トリス-HCl緩衝液（pH 7.8)および酵素を含む反応液0.1 mLを37℃に10分間保持し，80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。12000 rpmにて5分間遠心分離して得られた上清50μLに含まれるグルコース量をF-キットを用いたヘキソキナーゼ法により定量した。当該反応条件下で得られたRunsl_4512の比活性は，0.864 U/mgであった。酵素活性1 Uを1分間に1μmolのグルコースを生成する酵素量と定義した。

[0081] 最適pH

10 mMマンノース，80 mM ブリトン-ロビンソン緩衝液（pH 6-10)および酵素を含む反応液0.1 mLを37℃に10分間保持し，80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。上記と同様にグルコース生成量を求めた。その結果を図３に示す。最適pHは7.8であった。

[0082] pH安定性

酵素と0.1 Mブリトン-ロビンソン緩衝液(pH 3-12)からなる溶液0.1 mLを4℃に24時間保持した。この酵素活性を上記と同様に測定した。その結果を図４に示す。pH 6.3-9.8の範囲で安定であった。

[0083] 温度安定性

酵素溶液0.1 mLを30～60℃に15分間保持し，この活性を上記と同様に測定した。その結果を図５に示す。40℃以下で安定であった。

[0084] マンノースに対する速度パラメータ

10-100 mMマンノース，40 mM トリス-HCl緩衝液（pH 7.8)および酵素を含む反応液0.1 mLを37℃に10分間保持し，80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。得られた反応速度をミカエリスメンテンの速度式に回帰し，K_m 55.8 mM，k_{cat} 4.55 s^{-1}を得た。

[0085] マンノースに対する反応の経時変化

0.1 Mマンノース，40 mMトリス-HCl緩衝液（pH 7.8)，および酵素からなる反応液1 mLを37℃に保持し，適宜反応液50μLを採取して80℃に3分間保持して反応を停止した。このグルコース濃度を上記の方法で定量した。反応72時間でのグルコース濃度は72 mMであった。

[0086] グルコースからのマンノースの生成

4.2-16.6μM Runsl_4512，40 mM Tris-HCl (pH 7.8)および30%グルコースからなる反応液0.5 mLを35～55℃に保持し，24時間後に試料0.1 mLを採取して85℃にて10分間加熱して反応を停止した。これを6倍に希釈して10μLをHPLCに供した。HPLCではカラムにSugar D（ナカライ)を用い，カラム温度30℃，移動相80%アセトニトリル，流速1 mL/minとした。糖をRI検出器により検出した。その結果を図６に示した。酵素濃度8.3μM以上，50℃以下の反応条件では反応後のマンノース濃度はほぼ一定であり，7%となった。グルコースからのマンノースへの変換率は23%であった。

[0087] ［実施例２］

本実施例では、ディアドバクター　ファーメンタンス（Ｄｙａｄｏｂａｃｔｅｒ　ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）からＮ－ａｃｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ２－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ（ＡＧＥ）と推定されるタンパク質（Ｄｆｅｒ＿５６５２）をコードする遺伝子をクローニングし、組換酵素の特性評価を行った。

[0088] （１）Ｄｆｅｒ＿５６５２遺伝子のクローニング

Ｄ．ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ（ＤＳＭ１８０５３）から、Ｄｆｅｒ＿５６５２遺伝子をクローニングした。Ｄｆｅｒ＿５６５２遺伝子の塩基配列は、配列番号３の塩基配列であること、また前記塩基配列からＤｆｅｒ＿５６５２は、配列番号４で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることがＧｅｎｅ Ｂａｎｋに公開されている。

[0089] （２）Ｄｆｅｒ＿５６５２遺伝子産物の調製

配列番号３に示すＤｆｅｒ＿５６５２遺伝子から終止コドンを除いたものをｐＥＴ２３ａのＮｄｅ１－Ｘｈｏ１サイトに導入して、ヒスチジンタグを付与したＤｆｅｒ＿５６５２発現ベクターを構築した。前記発現ベクターを、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入して、形質転換体を調製した。前記形質転換体を、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを含むＬＢＡ培地３０ｍＬに植菌し、３７℃で一晩培養した。これを、ＬＢＡ培地１Ｌに入れ、波長６００ｎｍの吸光度（A_{600}）が０．５になるまで３７℃で培養した。培養液を氷冷した後、終濃度０．１ｍｍｏｌ／Ｌとなるように、０．１ｍｏｌ／Ｌイソプロピルβ－チオガラクトピラノシド１ｍＬを添加して、３７℃で４時間培養した。培養液を７，０００×ｇ、４℃、１０分の条件で遠心分離し、菌体を回収した。菌体を０．５ｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌを含む３０ ｍｍｏｌ／Ｌイミダゾール－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ ７）に懸濁し、超音波破砕により菌体を破砕した。得られた菌体破砕液を１０，０００×ｇ、４℃、１０分の条件で遠心分離し、上清を回収した。得られた無細胞抽出液をニッケルイオンをキレートしたＣｈｅｌａｔｉｎｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に供して組換Ｄｆｅｒ＿５６５２を精製した。すなわち，０．５ｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌを含む３０ｍｍｏｌ／Ｌ イミダゾール－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ ７）で担体を洗浄後、０．５ｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌを含む５００ｍｍｏｌ／Ｌ イミダゾール－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ ７）により溶出した。得られた試料を１０ｍｍｏｌ／Ｌ トリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ ７）に透析して以後の解析に用いた。試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより解析し、単一のバンドであることを確認した。

[0090] 反応生成物のTLC分析

50 mM 各種基質、5 mM Tris-HCl (pH 8.0)および、0.0410 mg/ml Dfer_5652からなる反応液5μLを37℃に一晩保持し、このうち1μLをTLCに供した。展開溶媒は以下に示す。展開後のTLCプレートにアニスアルデヒド/硫酸/酢酸=1/2/97を噴射し、加熱することによって糖を検出した。基質としてD-グルコース、D-マンノース、L-ラムノース、D-タロース、D-アルトロース、D-ガラクトース、L-フコース、L-フルクトース、D-タガトース、L-ソルボース、D-リキソース、L-アラビノース、D-キシロース、D-キシルロース、N-アセチル-D-グルコサミン、β-1,4-マンノビオース、D-グルコサミンおよびD-グルコン酸を用いたところ、D-グルコース、D-マンノースからのみ反応生成物が検出された。

[0091] 展開溶媒は基質ごとに異なるものを使った。

2-プロパノール/1-ブタノール/水＝2/2/1

D-グルコース、D-マンノース、D-ラムノース、D-タロース、D-アルトロース、D-ガラクトース、L-フコース、D-フルクトース、D-タガトース、L-ソルボース、D-リキソース、L-アラビノース、D-キシロース、D-キシルロース、N-アセチル-D-グルコサミン、β-1,4-マンノビオース

1-ブタノール/酢酸/水＝8/3/2 D-グルコサミン

2-プロパノール/1-ブタノール/水＝12/3/4 D-グルコン酸

[0092] その結果を図７、図８および図９に示した。基質試験の結果より、Ｄ－グルコースからＤ－マンノース、Ｄ－マンノースからＤ－グルコースが生成することが確認されたので、Dfer_5652はＤ－グルコースとＤ－マンノースの相互変換を触媒するマンノース 2-エピメラーゼであると判断された。

[0093] 活性測定

10 mMマンノース、40 mM HEPES-NaOH緩衝液（pH 8.0）、および酵素を含む反応液100μLを37℃に20分間保持し、80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。12000 rpmにて10分間遠心分離して得られた上清50μLに含まれるグルコース量をThio-NAD^+を用いたヘキソキナーゼ法により定量した。即ち

、0.5 mM Thio-NAD^+、7 mM ATP、0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)、1.0 mM $MgCl_2$、1.0 U/mL ヘキソキナーゼ(パン酵母由来、ナカライテスク)および1.0 U/mL G6Pデヒドロゲナーゼ(ナカライテスク)を含む発色試薬を反応液に等量添加して37℃に20分間保持し、G6Pの酸化反応に伴い生成されたThio-NADHの最大吸光波長405 nmの吸光度を分光光度計により測定することで反応液中のグルコースを定量した。当該反応条件下で得られたDfer_5652の比活性は0.688 U/mgであった。ここでは、酵素活性1 Uを、1分間に1μmolのグルコースを生成する酵素量と定義した。

[0094] 最適pH

10 mMマンノース、40 mMブリトンロビンソン緩衝液（pH 5.5-10.5）および酵素を含む反応液100μLを37℃に20 分間保持し、80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。上記と同様にグルコース生成量を求めた。その結果を図１０に示した。最適pHは8.1であった。

[0095] pH安定性

酵素と50 mMブリトン-ロビンソン緩衝液（pH 5.5-12.5）からなる溶液100μLを4℃に24時間保持した。この溶液を酵素液として上記と同様に活性を測定した。その結果を図１１に示した。pH 6.3-9.6の範囲で安定であった。

[0096] 温度安定性

酵素溶液60μLを20～55℃に20分間保持し、上記活性測定と同様の手順で活性を測定した。その結果を図１２に示した。45℃以下で80%以上の活性が保持されていた。

[0097] マンノースに対する速度パラメータ

4-150 mMマンノース、40 mM HEPES-NaOH緩衝液(pH 8.0)および酵素を含む反応液100 μLを37℃に保持し、反応7分、14分の時点で80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。得られた反応速度をプロットしたところ、飽和曲線が得られた。ミカエリスメンテンの速度式に回帰し、K_m 66.4 mM、k_{cat} 3.88 s^{-1}を得た。

[0098] 実施例１および実施例２において、MEであることが確認されたＲｕｎｓｌ

＿４５１２およびＤｆｅｒ＿５６５２について機能既知のAGE、CE、AKIとそのアミノ酸配列を比較したところ、上記２つのMEは、機能既知タンパクのアミノ酸配列と比べ特定部位に挿入配列を有していることが判明した（図２３ａ～ｃ）。この挿入配列がMEの機能に重要と考え、同様にＡＧＥ等とデータベース上で推定され挿入配列を有する機能未知のタンパク質５種について、その機能を確認した。

[0099] ［実施例３～７］

本実施例では、エムティシシア　オリゴトロフィカ（Ｅｍｔｉｃｉｃｉａ ｏｌｉｇｏｔｒｏｐｈｉｃａ）、スピロソマ　リンガレ（Ｓｐｉｒｏｓｏｍａ ｌｉｎｇｕａｌｅ）、セディミニスピロケータ　スマラジナエ（Ｓｅｄｉｍｉｎｉｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａ ｓｍａｒａｇｄｉｎａｅ）、トレポネマ　ブレナボレンス（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｂｒｅｎｎａｂｏｒｅｎｓｅ）およびトレポネマ　アゾトヌトリシウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ａｚｏｔｏｎｕｔｒｉｃｉｕｍ）のゲノム上にそれぞれ存在する、ＡＧＥ等とデータベース上で推定されている遺伝子（それぞれ、Ｅｍｔｏｌ＿１２４３、Ｓｌｉｎ＿６３８１、Ｓｐｉｒｓ＿３０６０、Ｔｒｅｂｒ＿２０６７およびＴｒｅａｚ＿２５５０をコードする）を、大腸菌のコドン使用頻度に最適化して合成し、組換酵素として生産し、遺伝子産物の特性評価を行った。

[0100] 目的遺伝子の合成

目的遺伝子は人工遺伝子合成を用い、ユーロフィンジェノミクス株式会社より購入した。目的遺伝子の設計は同社のHP上で行い、E. coli K12株のcodon usageに最適化した。合成された遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子を含むpEX-A2J1（pUC系、Amp耐性）に挿入された状態で納入された。

[0101] 発現プラスミドの調製

E. coliでの発現検討を行うため、購入した目的遺伝子をpET23aのNdeIサイトおよびヒスチジンタグの間にサブクローニングした。pET23a、あるいは目的遺伝子が挿入されたpEX-A2J1を鋳型としてPCRを行い、線状化pET23aおよび終始コドンを除いた目的遺伝子を増幅した。PCRにはPrimeSTAR Max DNA Poly

merase (Takara Bio) を用いた。得られたPCR反応液をアガロースゲル電気泳動し、泳動後のゲルより所望のサイズ付近に存在するバンドを切り出し、PCR増幅産物を切り出し後のゲルより抽出した。In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて目的遺伝子をpET23aに挿入した。In-Fusion反応後のプラスミド増幅にはE. coli DH5αを用いた。得られたプラスミドをシーケンス解析し、目的遺伝子が正常に挿入されていることを確認した。

[0102] E. coliでの発現

E. coli BL21(DE3)に発現プラスミドを導入した。100 mg/Lアンピシリンを含むLB培地30 mLにより形質転換体を37℃にて一晩培養し、同培地1 Lに植え継いだ。37℃で培養してA600が0.5-0.8になった段階で0.1 M IPTG 1 mLを添加し、18℃にて24時間培養した。これを遠心分離して菌体を回収し、-30℃にて保存した。

[0103] 組換え酵素の抽出

冷凍保存したペレットを0.5 M NaClを含む30 mMイミダゾール-HCl緩衝液(pH 7)に懸濁した。ソニケーションにより菌体を破砕した。遠心分離により得られた上清を0.45μmフィルターにてろ過したものを無細胞抽出液とし、沈殿は無細胞抽出液と同量の上記緩衝液に懸濁した。無細胞抽出液を、ニッケルイオンをキレートしたChelating Sepharose Fast Flow(GE Healthcare)に供して組換え酵素を精製した。すなわち、上記緩衝液で担体を洗浄後、0.5 M NaClを含む500 mMイミダゾール-HCl緩衝液 (pH 7) により溶出した。溶出画分を回収し、Amicon Ultraを用いて液量が15 mLとなるまで濃縮した。得られた試料を20 mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH 7)に透析した。0.45μmフィルターにてろ過し、ろ液を試料として以後の解析に用いた。試料のタンパク質濃度はアミノ酸配列から推定された比吸光度を測定したA280に乗じることで求めた。

[0104] SDS-PAGE

DWで10倍希釈した各試料7.5μLに対し、同量のサンプルバッファーを添加し、99.9℃で5分間加熱したもの全量をSDS-PAGEに供したところ、いずれも単一のバンドであることを確認した。

[0105] 活性測定

10 mMマンノース、40 mM HEPES-NaOH緩衝液（pH 8.0）、および酵素を含む反応液100μLを37℃に30分間あるいは60分間保持し、80℃にて5分間加熱することで酵素反応を停止した。12000 rpmにて10分間遠心分離して得られた上清50μLに含まれるグルコース量をThio-NAD^+を用いたヘキソキナーゼ法により定量した。即ち、1 mM Thio-NAD^+、7 mM ATP、0.1 M Tris-HCl（pH 7.5)、1.0 mM $MgCl_2$、2.0 U/mL ヘキソキナーゼ（パン酵母由来、ナカライテスク）および2.0 U/mL G6Pデヒドロゲナーゼ（ナカライテスク）を含む発色試薬を反応液に等量添加して37℃に20 分間保持し、G6Pの酸化反応に伴い生成されたThio-NADHの最大吸光波長405 nmの吸光度を分光光度計により測定することで反応液中のグルコースを定量した。1分間に1μmolのグルコースを生成する酵素量を1 Uと定義した。結果を表１に示した。

[0106] [表1]

酵素	総活性 (U)	総蛋白量 (mg)	比活性 (U/mg)
Emtol_1243	63.68	59.51	1.07
Slin_6381	3.97	21.54	0.18
Spirs_3060	6.24	29.92	0.21
Trebr_2067	3.97	64.36	0.06
Treaz_2550	1.00	43.16	0.02

[0107] Emtol_1243, Spirs_3060, Slin_6381, Trebr_2067, Treaz_2550の基質特異性の検討（TLC）

50 mm各種基質，5 mm HEPES-NaOH（pH 8.0）0.5 mg/mL BSAおよび酵素を含む反応液5μLを37℃にて24時間保持し、1μLをTLC板にスポットした。各展開溶媒で展開した後のTLC板にアニスアルデヒド/硫酸/酢酸=1/2/97を噴霧し、加熱して糖を検出した。反応液中の酵素濃度を以下に示す．8.0μm Emtol_1243, 9.5μm Spirs_3060, 9.5μm Slin_6381, 10μm Trebr_2067, 9.5μm Treaz_2550．基質として、Ｄ－グルコース、Ｄ－マンノース、Ｄ－フルクトース、Ｄ－ガラクトース、Ｄ－タロース、Ｄ－アロース、Ｄ－アルトロース、Ｌ

－ソルボース、Ｄ－タガトース、Ｌ－アラビノース、Ｄ－キシロース、Ｄ－リキソース、Ｌ－ラムノース、Ｌ－フコース，セロビオース、β-(1,4)グルコシルマンノース、β-(1,4)マンノシルグルコース、β-(1,4)マンノビオース、ラクトース、エピラクトース、ラクチュロース、スクロース、マルトース、Ｎ－アセチルＤ－グルコサミンを用いた。展開溶媒として、単糖およびN-アセチルd-グルコサミンには2-プロパノール/1-ブタノール/水＝2/2/1溶液を、二糖には2-プロパノール/1-ブタノール/水＝12/3/4溶液をそれぞれ用いた。

その結果を図１３～図２２に以下に示す。なお、いずれの図においてもＢ：Ｂｌａｎｋ（失活処理酵素添加区）、Ｒ：Ｒｅａｃｔｉｏｎ（酵素添加区）を意味する。

[0108] 各酵素の基質特異性について、表２に纏めた。いずれの酵素もグルコースからマンノース、マンノースからグルコースが生成することが確認されたので、グルコースとマンノースの相互変換を触媒するマンノース 2-エピメラーゼであると判断された。また、Spirs_3060、Trebr_2067 およびTreaz_2550の３つの酵素は、ガラクトースとタロースを相互に変換する触媒作用を有することも判明した。さらに、Treaz_2550は、ＣＥ活性等も有していた。

[0109]

[表2]

基質	Runsl_4512	Dfer_5652	Emtol_1243	Slin_6381	Spirs_3060	Trebr_2067	Treaz_2550
D-グルコース	+	+	+	+	+	+	+
D-マンノース	+	+	+	+	+	+	+
D-フルクトース	−	−	−	−	−	−	−
D-ガラクトース	−	−	−	−	+	+	+
D-タロース	−	−	−	−	+	+	+
D-タガトース	−	−	−	−	−	−	−
D-アロース	−		−	−	−	−	−
D-アルトロース	−	−	−	−	−	−	−
L-ソルボース	−	−	−	−	−	−	−
L-アラビノース	−	−	−	−	−	−	−
D-キシロース	−	−	−	−	−	−	−
D-リキソース	−	−	−	−	−	−	−
D-キシルロース	−	−					
L-ラムノース	−	−	−	−	−	−	−
L-フコース	−	−	−	−	−	−	−
セロビオース			−	−	−	−	+
β-(1,4)グルコシルマンノース			−	−	−	−	+
β-(1,4)マンノシルグルコース			−	−	−	−	+
β-(1,4)マンノビオース	−	−	−	−	−	−	+
ラクトース			−	−	−	−	+
エピラクトース			−	−	−	−	+
ラクチュロース			−	−	−	−	−
スクロース			−	−	−	−	−
マルトース			−	−	−	−	+
D-グルコサミン	−	−					
N-アセチル-D-グルコサミン	−	−	−	−	−	−	−
D-グルコース 6-リン酸	−						
D-マンノース 6-リン酸	−						
D-グルコン酸	−						

反応性生物が確認されたものを＋、確認されなかったものを－、試験していないものを空欄にて表記した。

[0110] 既知のＡＧＥやＣＥ等のアミノ酸配列とＭＥ活性を有することが確認された上記７酵素のアミノ酸配列および他の機能未知のAGE等と推定されるタンパクのアミノ酸配列を比較し、挿入配列部分の比較結果を図２３ａ～ｃに示した。なお、図２３ａに示された機能既知酵素に関する補足情報は下記通りである。

＊１：Porcine kidney 由来のAGE (FEBS Letters 587(2013) 840-846)

＊２：Anabaena sp.由来のAGE (FEBS Letters 587(2013) 840-846)

＊３：Rhodothermus marinus 由来のCE (特開2012-130332 号)

＊４：Ruminococcus albus 由来のCE (Appl. Microbiol. Biotechnol. (2008) 79, 433-441)

＊５：Caldicellulosiruptor saccharolyticus 由来のCE (国際公開2010/090095 号)

＊６：Escherichia coli 由来のAKI (J. Mol. Biol. (2008) 377, 1443-1459)

＊７：Salmonella enteritica 由来のAKI (J. Mol. Biol. (2008) 377, 1443-1459)

上記７酵素のアミノ酸配列の挿入配列を表３に示した。また、配列番号２に示されたＲｕｎｓｌ＿４５１２のアミノ酸配列とその他６酵素のアミノ酸配列の同一性及び配列番号１２に示されたＴｒｅｂｒ＿２０６７のアミノ酸配列とその他６酵素のアミノ酸配列の同一性を表４に示した。

[0111] [表3]

```
Runsl_4512 insert 1:VAPQIKFDIVWGWDRFNPDGLKS-                    23
Dfer_5652 insert  1:VAPQIKFDIIWGWDRFTEDGVKS-                    23
Emtol_1243 insert 1:VAPQIKFDIVWGWDRFTEDGQKA-                    23
Slin_6381 insert  1:VAPQIKFDVIWGWDRFTEDGAKE-                    23
Spirs_3060 insert 1:IAPQIKFDIIWGWDRFSEGDAQKP                    24
Trebr_2067 insert 1:KLPAINIKRTWNAEREAGEKID--                    22
Treaz_2550 insert 1:KIPAINIYRTWNAERETNERID--                    22
                        ..*.*.... *...*..... .
```

[0112]

[表4]

タンパク質名	同一性(%)							
	全長配列		N末端側配列		挿入配列		C末端側配列	
Runsl_4512	query	40	query	45	query	31	query	37
Dfer_5652	74	40	72	44	82	32	76	38
Emtol_1243	82	39	81	44	82	35	85	36
Slin_6381	75	40	76	43	77	32	73	39
Spirs_3060	56	38	54	41	70	31	59	37
Trebr_2067	40	query	45	query	30	query	37	query
Treaz_2550	39	57	45	54	-	77	34	58

「-」は、同一性が低すぎて算出不可であった。

[0113] Ｒｕｎｓｌ＿４５１２のアミノ酸配列と同一性が４０％を下回る酵素であっても、挿入配列を有しているものは同様にＭＥ活性を有することが明らかとなった。図２３ａ及び表５に示された機能既知及び未知のタンパクについても、同挿入配列を有するものはＭＥ活性を有する可能性があり、さらには、図２３ｂ及び２３ｃ並びに表６表７に示された機能未知のタンパクについても、同挿入配列を有するものはME活性を有するものと強く推認され、本発明のグルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びに／又はガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法における、グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びにガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有することが知られていないタンパク質として利用し、上記エピメリ化活性を有するタンパク質を製造することができる。

[0114]

[表5]

起源名	配列番号	RunsI_4512との同一性(%) 全長配列	N末端側配列	挿入配列	C末端側配列	Gene Bank ID
Paenibacillus sp. P22_1	47	33	35		33	WP_048746212
Paenibacillus sp. P22_2	48	33	35		33	CDN43389
Paenibacillus sp. D9	49	34	35		34	WP_049868394
Paenibacillus macerans	50	31	35		30	WP_036621236
Planctomycetes bacterium RBG_13_46_10	51	33	36		35	OHB62357
Natrialba aegyptia	52	29	36		30	WP_006667467
Natrialba taiwanensis	53	29	36		30	WP_006824042
Haloterrigena turkmenica	54	29	35		31	WP_012945686
Halosimplex carlsbadense	55	29	35		28	WP_006883512
Planctomycetes bacterium RBG_16_55_9	56	31	35		31	OHB80232
Phycisphaerae bacterium SG8_4	57	31	35		28	KPK41556

起源名	配列番号	Trebr_2067との同一性(%) 全長配列	N末端側配列	挿入配列	C末端側配列	Gene Bank ID
Paenibacillus sp. P22_1	47	31	31		34	WP_048746212
Paenibacillus sp. P22_2	48	31	31		34	CDN43389
Paenibacillus sp. D9	49	31	31		34	WP_049868394
Paenibacillus macerans	50	29	28		33	WP_036621236
Planctomycetes bacterium RBG_13_46_10	51	30	30		34	OHB62357
Natrialba aegyptia	52	33	34		36	WP_006667467
Natrialba taiwanensis	53	33	34		36	WP_006824042
Haloterrigena turkmenica	54	32	35		37	WP_012945686
Halosimplex carlsbadense	55	34	36		37	WP_006883512
Planctomycetes bacterium RBG_16_55_9	56	33	36		33	OHB80232
Phycisphaerae bacterium SG8_4	57	31	35		32	KPK41556

[0115]

[表6]

		RunsI_4512との同一性(%)				Gene Bank ID
起源名	配列番号	全長配列	N末端側配列	挿入配列	C末端側配列	
Treponema_socranskii	15	38	41	-	38	WP_021329519
uncultured_Ruminococcus_sp.	16	40	44	-	37	SCH33385
uncultured_Clostridium_sp._1	17	42	44	38	42	SCJ20974
uncultured_Clostridium_sp._2	18	40	44	33	39	SCH79632
Clostridium_sp._CAG_7	19	38	42	38	36	CCY42873
Sediminispirochaeta_bajacaliforniensis	20	56	53	70	59	WP_020614115
Bacteroidetes_bacterium_GWA2_40_15	21	69	70	77	67	OFX38587
Bacteroidetes_bacterium_RBG_13_43_22	22	68	70	69	65	OFY65009
Bacteroides_sp._SM23_62	23	66	69	68	63	KPL17143
Phycisphaerae_bacterium_SG8_4	24	66	66	81	65	KPK38578
Planctomycetes_bacterium_RBG_13_62_9	25	61	63	69	56	OHB63469
Planctomycetes_bacterium_GWF2_42_9	26	64	64	77	63	OHB59917
Runella_limosa	27	88	89	82	88	WP_028525565
Runella_zeae	28	87	85	86	89	WP_028665964
Spirosoma_radiotolerans	29	74	75	81	73	WP_046576623
Spirosoma_panaciterrae	30	77	78	81	77	WP_020600162
Spirosoma_spitsbergense	31	74	74	81	73	WP_041951948
Spirosoma_luteum	32	73	74	77	73	WP_018618427
Fibrisoma_limi	33	75	74	81	77	WP_009282605
Dyadobacter_sp._SG02	34	75	72	86	78	WP_090382434
Dyadobacter_soli	35	74	71	86	77	WP_090148701
Dyadobacter_beijingensis	36	75	73	82	76	WP_019944451
Dyadobacter_crusticola	37	73	72	82	74	WP_031529152
Dyadobacter_sp._Leaf189	38	73	72	82	75	WP_056284090
Dyadobacter_alkalitolerans	39	73	70	82	76	WP_026630425
Dyadobacter_koreensis	40	72	70	82	74	WP_090338659
Dyadobacter_tibetensis	41	72	71	82	73	WP_025762071
Flexithrix_dorotheae	42	67	66	78	67	WP_044240753
Kriegella_aquimaris	43	66	66	82	64	WP_089887216
Omnitrophica_bacterium_OLB16	44	48	46	63	54	KXK39315
Candidatus_Glassbacteria_bacterium	45	45	45	66	48	OGG01166
Spirochaetes_bacterium_RBG_16_67_19	46	50	52	61	50	OHD74244

[0116]

[表7]

		Trebr_2067との同一性(%)				Gene Bank ID
起源名	配列番号	全長配列	N末端側配列	挿入配列	C末端側配列	
Treponema_socranskii	15	80	82	81	77	WP_021329519
uncultured_Ruminococcus_sp.	16	60	59	80	61	SCH33385
uncultured_Clostridium_sp._1	17	47	48	57	47	SCJ20974
uncultured_Clostridium_sp._2	18	45	45	42	50	SCH79632
Clostridium_sp._CAG_7	19	46	45	60	48	CCY42873
Sediminispirochaeta_bajacaliforniensis	20	38	41	30	37	WP_020614115
Bacteroidetes_bacterium_GWA2_40_15	21	39	40	23	38	OFX38587
Bacteroidetes_bacterium_RBG_13_43_22	22	39	46	29	39	OFY65009
Bacteroides_sp._SM23_62	23	41	43	37	40	KPL17143
Phycisphaerae_bacterium_SG8_4	24	38	43	31	33	KPK38578
Planctomycetes_bacterium_RBG_13_62_9	25	35	39	12	37	OHB63469
Planctomycetes_bacterium_GWF2_42_9	26	41	57	23	42	OHB59917
Runella_limosa	27	40	44	31	38	WP_028525565
Runella_zeae	28	40	46	30	37	WP_028665964
Spirosoma_radiotolerans	29	41	43	21	42	WP_046576623
Spirosoma_panaciterrae	30	41	45	26	38	WP_020600162
Spirosoma_spitsbergense	31	39	42	31	39	WP_041951948
Spirosoma_luteum	32	38	41	31	38	WP_018618427
Fibrisoma_limi	33	41	50	21	40	WP_009282605
Dyadobacter_sp._SG02	34	41	45	30	39	WP_090382434
Dyadobacter_soli	35	40	44	30	38	WP_090148701
Dyadobacter_beijingensis	36	40	44	21	38	WP_019944451
Dyadobacter_crusticola	37	39	43	31	37	WP_031529152
Dyadobacter_sp._Leaf189	38	39	43	31	37	WP_056284090
Dyadobacter_alkalitolerans	39	39	43	31	38	WP_026630425
Dyadobacter_koreensis	40	41	45	31	39	WP_090338659
Dyadobacter_tibetensis	41	40	43	30	39	WP_025762071
Flexithrix_dorotheae	42	37	44	31	32	WP_044240753
Kriegella_aquimaris	43	37	39	26	36	WP_089887216
Omnitrophica_bacterium_OLB16	44	37	50	26	35	KXK39315
Candidatus_Glassbacteria_bacterium	45	41	45	37	38	OGG01166
Spirochaetes_bacterium_RBG_16_67_19	46	42	43	53	40	OHD74244

[0117] 挿入配列の意義

本発明の酵素は一次アミノ酸配列の相同性から、α/α-6バレル構造を有するセロビオース2-エピメラーゼと立体構造が類似すると推察される。本発明の酵素に共通する特有の配列はＣＥで言うところの、α7ヘリックスとα8ヘリックス間のループの一部を構成し、ＣＥと比較して当該ループが延長された形となっている。当該ループは活性部位の一部を構成すると考えられてお

り、当該ループに本酵素特有の配列が存在することで、ＣＥと比較して基質認識機構が変化し、グルコースおよびマンノースへの反応に好ましい活性部位の形状となっているものと推察される。

産業上の利用可能性

[0118] 本発明は、グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質及びガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質など、エピメリ化活性を有するタンパク質に関連する分野に有用である。

配列表フリーテキスト

[0119] 配列番号１：Ｒｕｎｓｌ＿４５１２塩基配列

配列番号２：Ｒｕｎｓｌ＿４５１２アミノ酸配列

配列番号３：Ｄｆｅｒ＿５６５２塩基配列

配列番号４：Ｄｆｅｒ＿５６５２アミノ酸配列

配列番号５：Ｅｍｔｏｌ＿１２４３塩基配列

配列番号６：Ｅｍｔｏｌ＿１２４３アミノ酸配列

配列番号７：Ｓｌｉｎ＿６３８１塩基配列

配列番号８：Ｓｌｉｎ＿６３８１アミノ酸配列

配列番号９：Ｓｐｉｒｓ＿３０６０塩基配列

配列番号１０：Ｓｐｉｒｓ＿３０６０アミノ酸配列

配列番号１１：Ｔｒｅｂｒ＿２０６７塩基配列

配列番号１２：Ｔｒｅｂｒ＿２０６７アミノ酸配列

配列番号１３：Ｔｒｅａｚ＿２５５０塩基配列

配列番号１４：Ｔｒｅａｚ＿２５５０アミノ酸配列

配列番号１５～４６：表６及び７に記載のタンパク質のアミノ酸配列

配列番号４７～５７：表５に記載のタンパク質のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] （ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列
の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質、又は
（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質（但し、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２または配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を除く）。

[請求項2] 配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、
一般式（１）：
X^1ＡＰＱＩＫＦＤ$X^2$$X^3$ＷＧＷＤＲＦ$X^4$$X^5$$X^6$$X^7$$X^8$$X^9$$X^{10}$（但し、
Ｘ１はＶ又はＩであり、X^2はＩ又はＶであり、X^3はＶ又はＩであり

、X^4はＮ、Ｔ又はＳであり、X^5はＰ又はＥであり、X^6はＤ又はＧであり、X^7はＧ又はＤであり、X^8はＬ、Ｖ、Ｑ又はＡであり、X^9はＫ又はＱであり、X^{10}はＳ、Ａ、Ｅ又はＫである）のアミノ酸配列、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項3] 配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、

配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２６４～４２２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２６４～４２７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項１又は２に記載のタンパク質。

[請求項4] 配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、
一般式（２）：
ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ
（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項5] 配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基のア

ミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項１又は４に記載のタンパク質。

[請求項6] 請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質を有効成分として含有する、グルコースとマンノースのエピメリ化剤。

[請求項7] ガラクトースとタロースのエピメリ化活性をさらに有する請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質。

[請求項8] （ｃ）配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列
の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び
前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質、又は
（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列の挿入配列を有し、
前記挿入配列のＮ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列、及び

前記挿入配列のＣ末端側に配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列を有し、かつガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質（但し、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２または配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質を除く）。

[請求項9] 配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、

配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項８に記載のタンパク質。

[請求項10] 配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、

一般式（２）：

ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ

（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、

配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は

配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列であり、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上のアミノ酸配列が、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項８に記載のタンパク質。

[請求項11] 配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質または当該タンパク質のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有し、かつグルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分とするグルコースとマンノースのエピメリ化剤。

[請求項12] グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びにガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有することが知られていないタンパク質から、（ａ）配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有するタンパク質、または（ｂ）配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を有するタンパク質を選択すること及び

（ｃ）（ａ）又は（ｂ）で選択したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質を選択することを含む、

グルコースおよびマンノースのエピメリ化活性並びに／又はガラクトースおよびタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法。

[請求項13] （ｄ）アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列に、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列若しくは配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列を挿入すること、または（ｅ）アミノ酸配列既知又は未知のタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部の配列を、配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列若しくは配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列に改変すること、及び

（ｆ）（ｄ）または（ｅ）で挿入又は改変したタンパク質から、グルコースとマンノースのエピメリ化活性、ガラクトースとタロースのエピメリ化活性又はその両方を有するタンパク質を選択することを含む、

エピメリ化活性を有するタンパク質の製造方法。

[請求項14] 配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、

一般式（１）：

X^1ＡＰＱＩＫＦＤ$X^2$$X^3$ＷＧＷＤＲＦ$X^4$$X^5$$X^6$$X^7$$X^8$$X^9$$X^{10}$（但し、

X^1はＶ又はＩであり、X^2はＩ又はＶであり、X^3はＶ又はＩであり、

X^4はＮ、Ｔ又はＳであり、X^5はＰ又はＥであり、X^6はＤ又はＧであ

り、X^7はＧ又はＤであり、X^8はＬ、Ｖ、Ｑ又はＡであり、X^9はＫ又はＱであり、X^{10}はＳ、Ａ、Ｅ又はＫである）のアミノ酸配列、
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２４１～２６３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２４１～２６４アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項１２又は１３に記載の製造方法。

[請求項15] （ａ）、（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質が、配列番号２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有し、かつ
配列番号２に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号４に示されたアミノ酸配列の２６４～４２３アミノ酸残基の

アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号６に示されたアミノ酸配列の２６４～４２２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、
配列番号８に示されたアミノ酸配列の２６４～４２７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１０に示されたアミノ酸配列の２６５～４２８アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有する、請求項１２～１４のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項16] 配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のアミノ酸配列が、
一般式（２）：
ＫＸ^{11}ＰＡＩＮＩＸ^{12}ＲＴＷＮＡＥＲＥＸ^{13}Ｘ^{14}ＥＸ^{15}ＩＤ
（但し、Ｘ^{11}はＬ又はＩであり、Ｘ^{12}はＫ又はＹであり、Ｘ^{13}はＡ又はＴであり、Ｘ^{14}はＧ又はＮであり、Ｘ^{15}はＫ又はＲである）のアミノ酸配列、
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２４１～２６２アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２４６～２６７アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列である、請求項１２又は１３に記載の製造方法。

[請求項17] （ｂ）、（ｄ）又は（ｅ）のタンパク質が、配列番号１２に示されたアミノ酸配列の１～２４０アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、又は
配列番号１４に示されたアミノ酸配列の１～２４５アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有し、かつ
配列番号１２に示されたアミノ酸配列の２６３～４１９アミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が５０％以上若しくは９０％以上のアミノ酸配列、又は配列番号１４に示されたアミノ酸配列の２６８～４３０ア

ミノ酸残基のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列をさらに有する、請求項１２、１３又は１６に記載の製造方法。

[請求項18] グルコースとマンノースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造である、請求項１２～１７のいずれか１項に記載の製造方法。

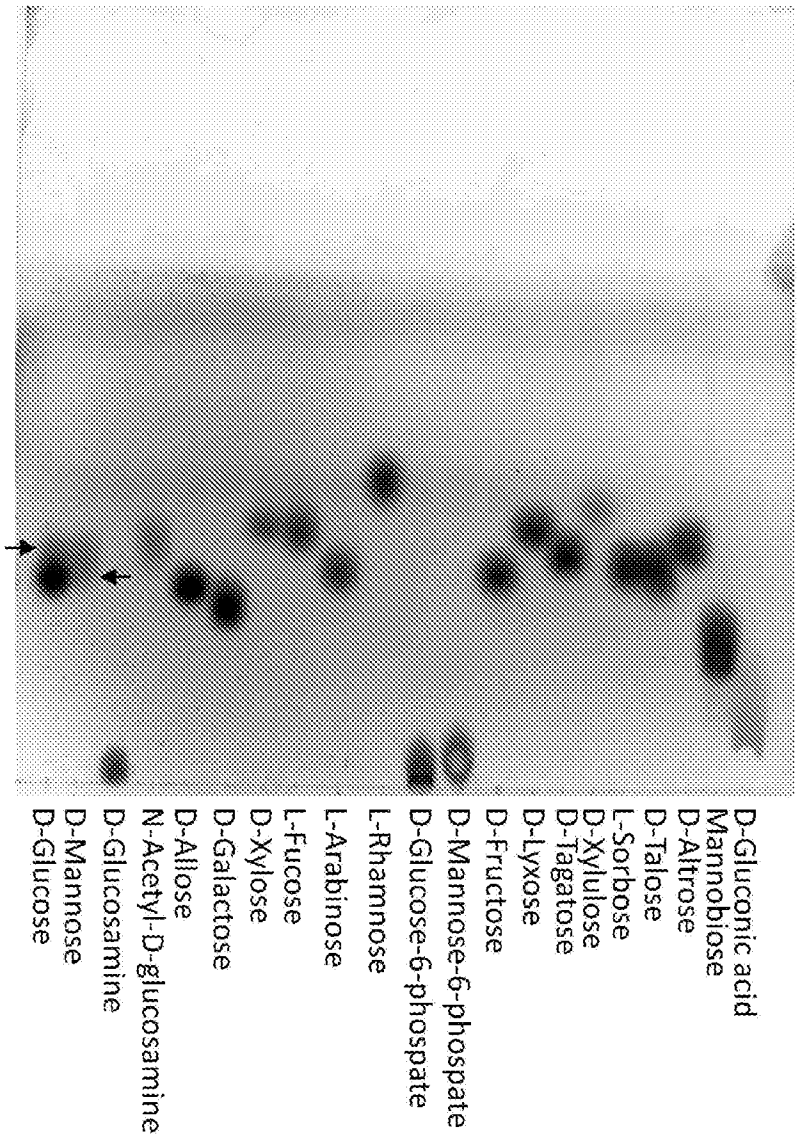
[請求項19] ガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質の製造である、請求項１２～１７のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項20] グルコースに、請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質、請求項６若しくは１１に記載のエピメリ化剤又は請求項１２～１８のいずれか１項に記載の方法で製造したタンパク質を作用させて、マンノースを生成させることを含む、マンノースの製造方法。

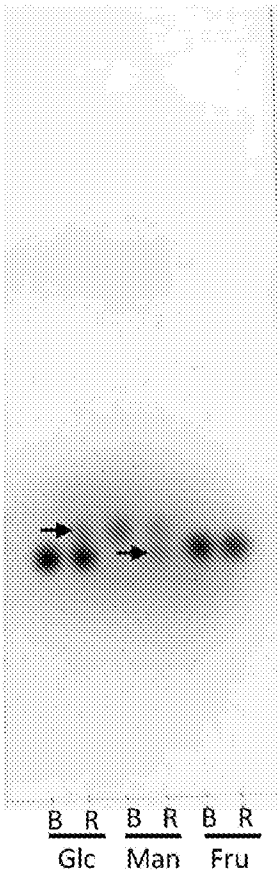
[請求項21] 配列番号１０、配列番号１２若しくは配列番号１４に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質または当該タンパク質のアミノ酸配列と同一性が７０％以上のガラクトースとタロースのエピメリ化活性を有するタンパク質を有効成分とするガラクトースとタロースのエピメリ化剤。

[請求項22] ガラクトースに、請求項７～１０のいずれか１項に記載のタンパク質、請求項１２～１７のいずれか１項に記載の方法で製造したタンパク質、または請求項２１に記載のエピメリ化剤を作用させて、タロースを生成させることを含む、タロースの製造方法。

[図1]


D-Glucose
D-Mannose
D-Glucosamine
N-Acetyl-D-glucosamine
D-Allose
D-Galactose
D-Xylose
L-Fucose
L-Arabinose
L-Rhamnose
D-Glucose-6-phospate
D-Mannose-6-phospate
D-Fructose
D-Lyxose
D-Tagatose
D-Xylulose
L-Sorbose
D-Talose
D-Altrose
Mannobiose
D-Gluconic acid

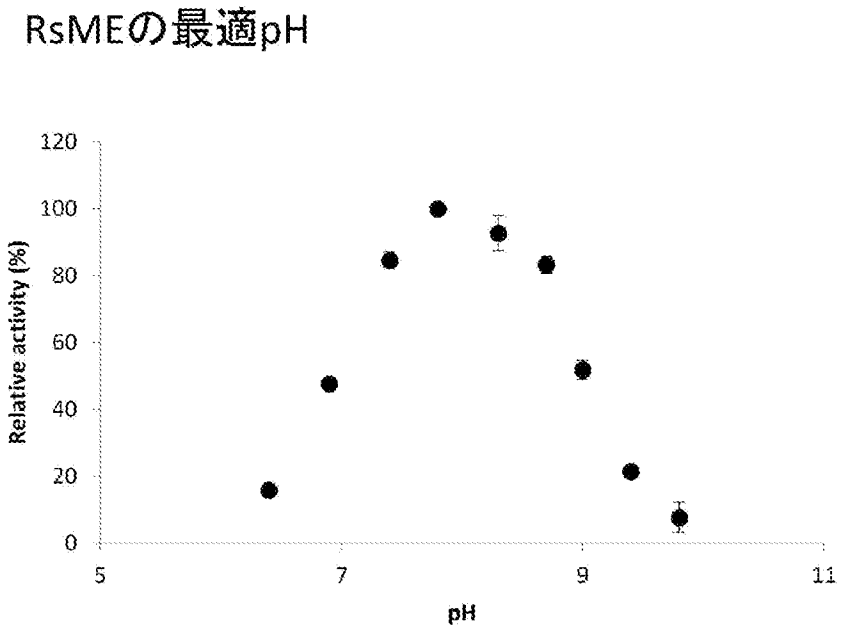
[図2]



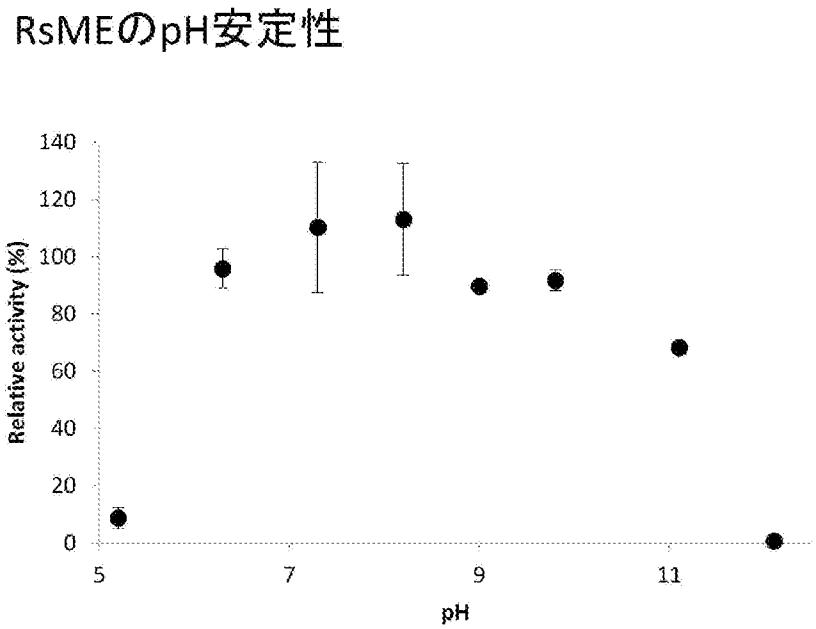
Glc: D-glucose
Man: D-mannose
Fru: D-fructose

B: Blank (反応前)
R: Reaction (反応後)

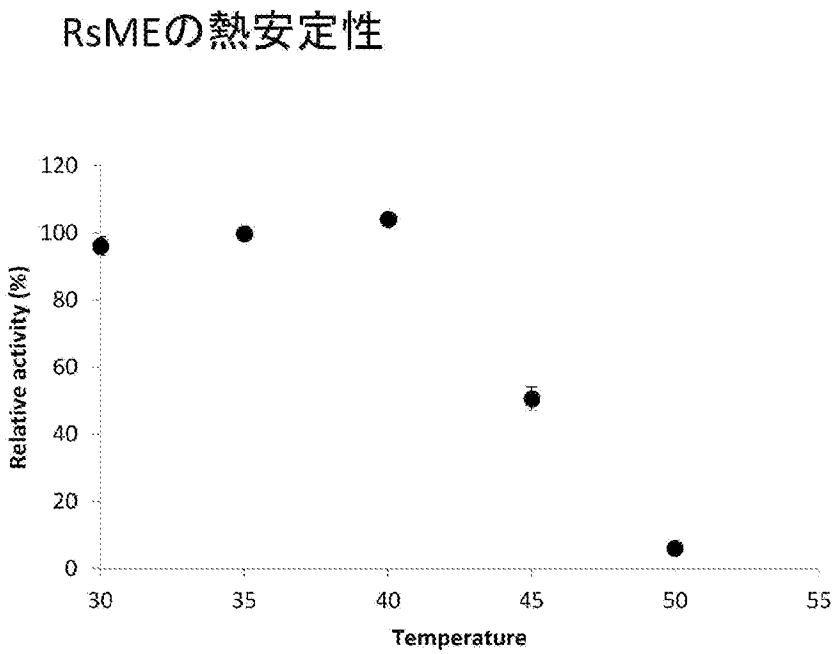
[図3]



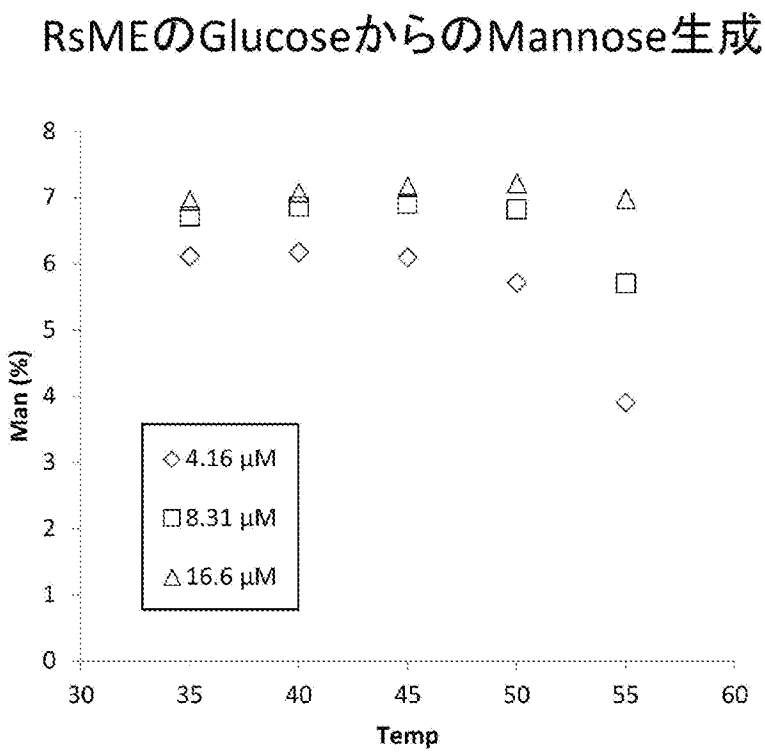
[図4]


RsMEのpH安定性
Relative activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
5
7
9
11
pH

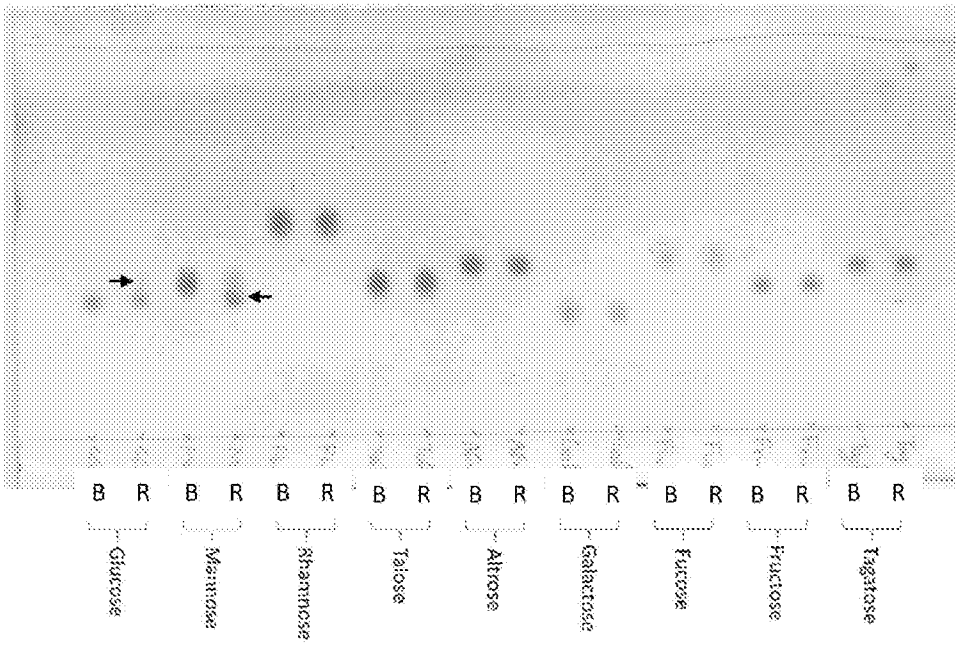
[図5]


RsMEの熱安定性
Relative activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
30
35
40
45
50
55
Temperature

[図6]

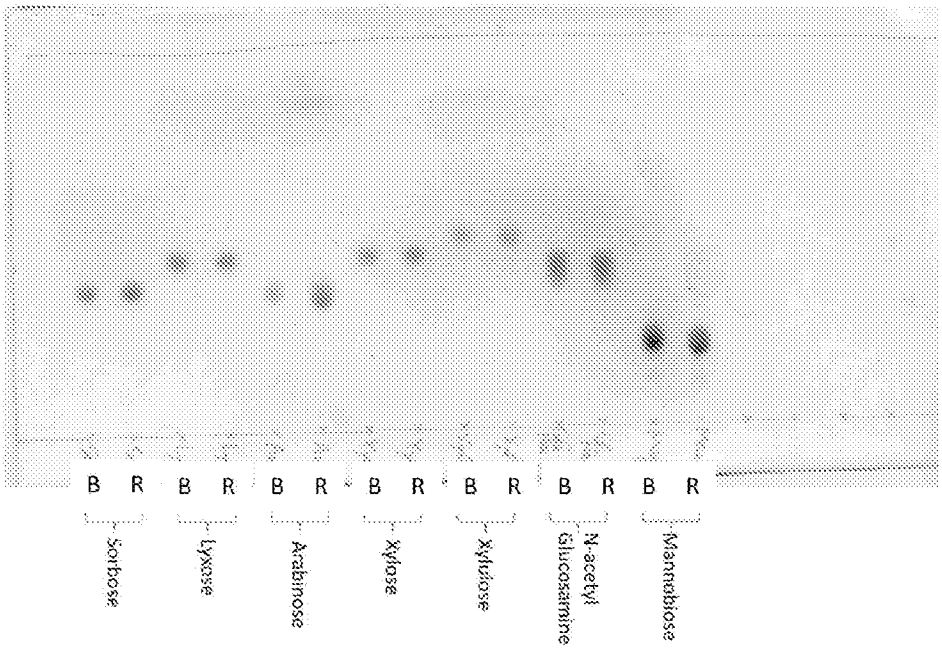


[図7]



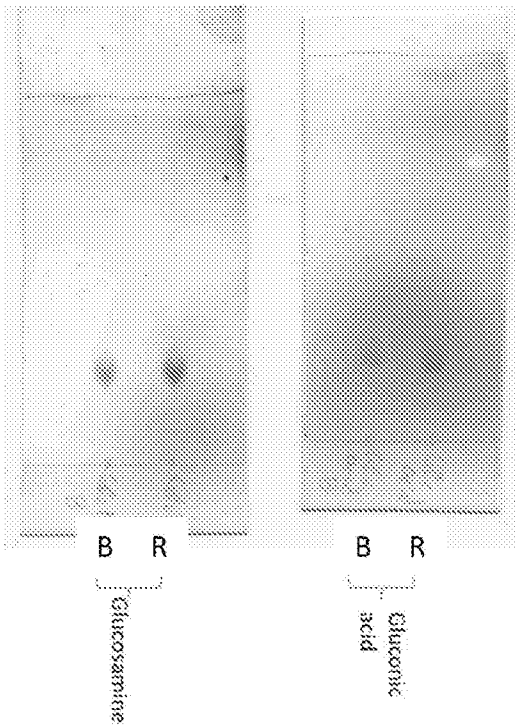
B: Blank (失活処理酵素添加区)
R: Reaction (酵素添加区)

[図8]



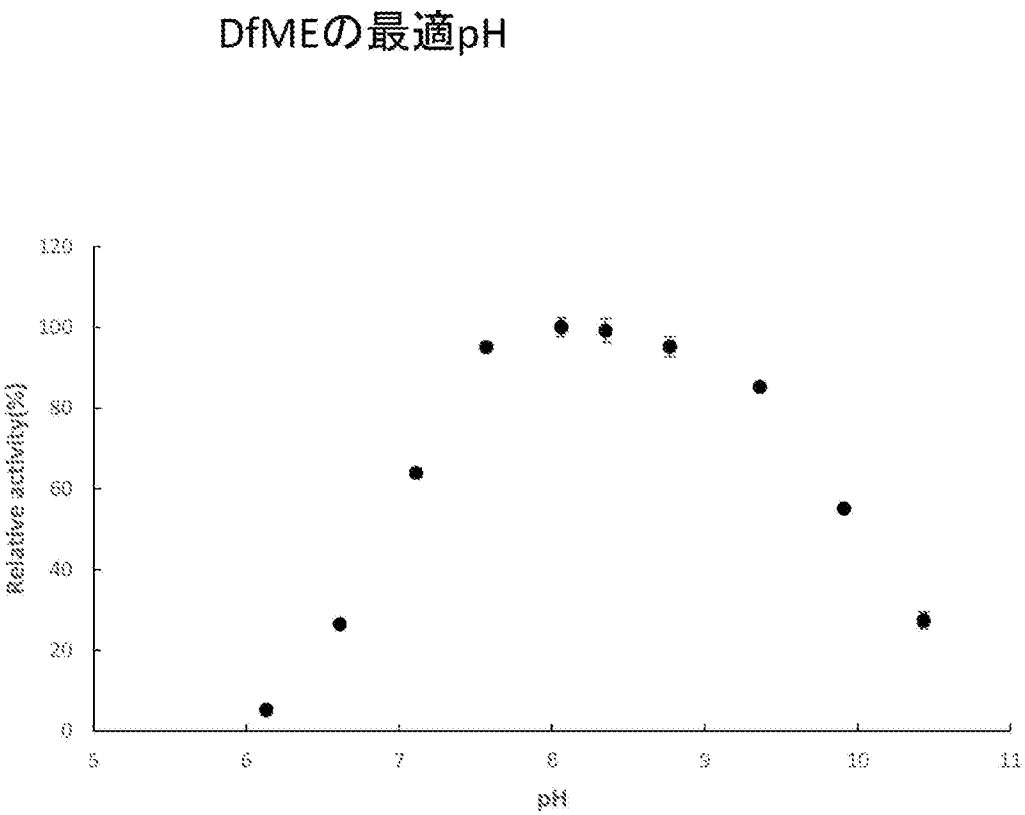
B: Blank (失活処理酵素添加区)
R: Reaction (酵素添加区)

[図9]

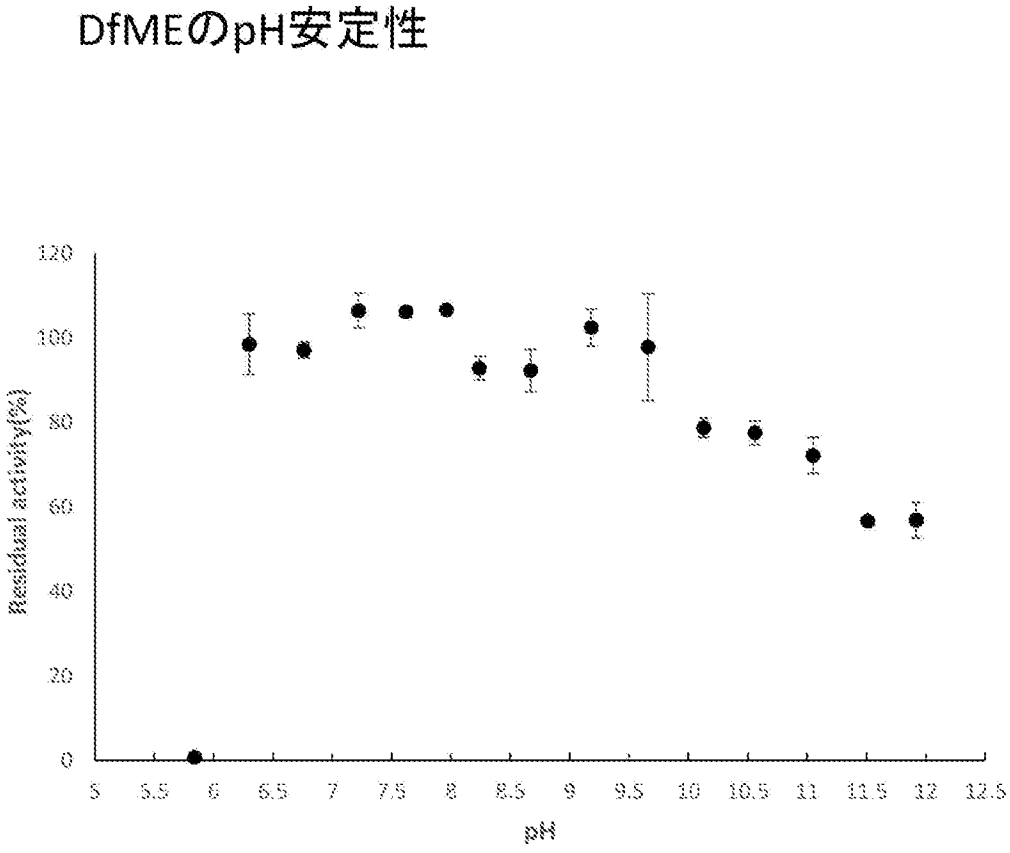


B: Blank (失活処理酵素添加区)
R: Reaction (酵素添加区)

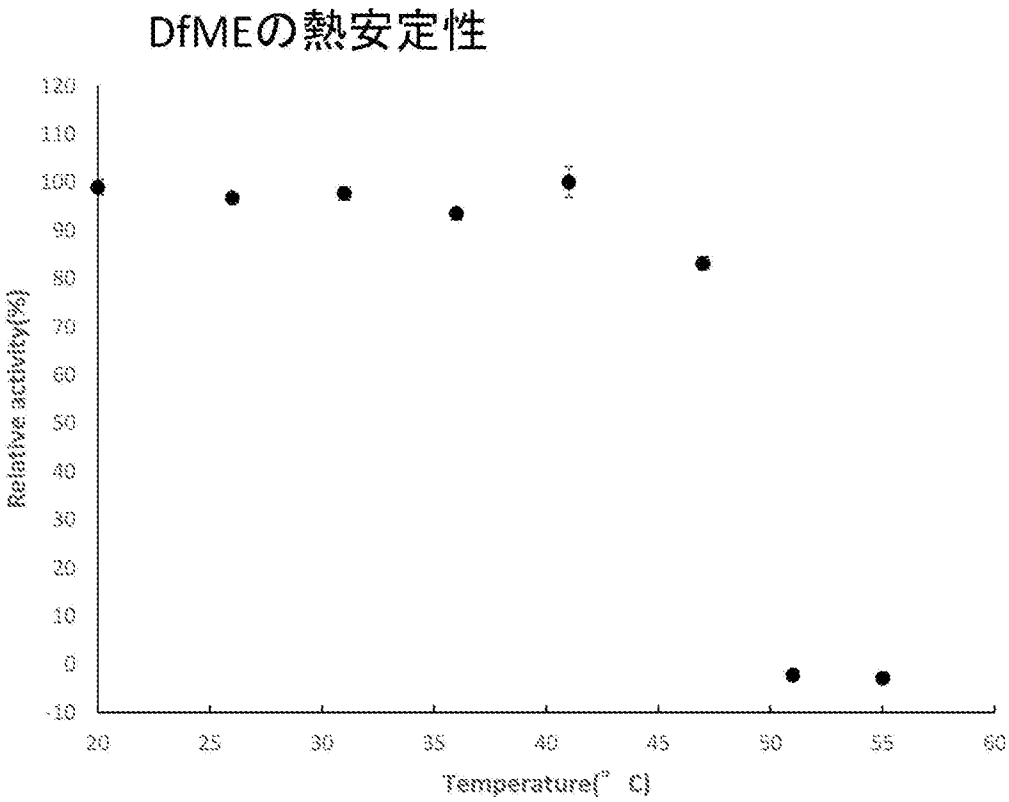
[図10]


DfMEの最適pH
Relative activity(%)
120
100
80
60
40
20
0
5
6
7
8
9
10
11
pH

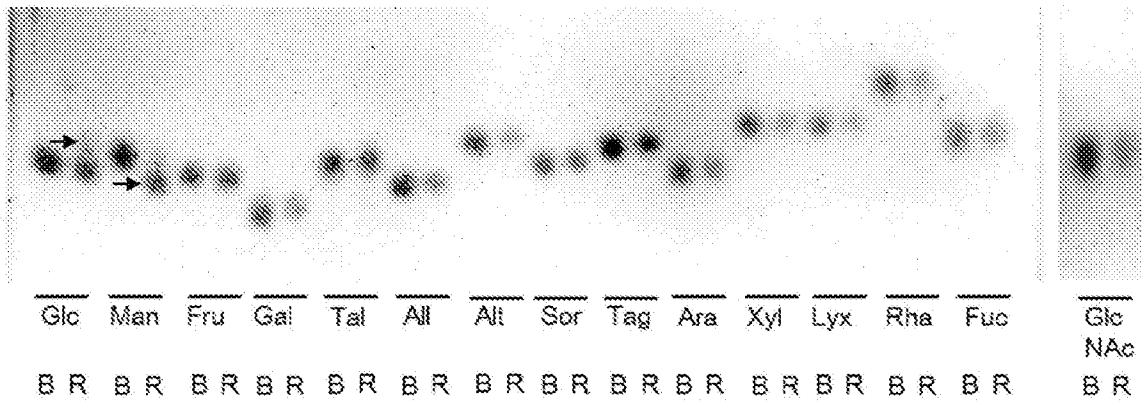
[図11]


DfMEのpH安定性
Residual activity(%)
120
100
80
60
40
20
0
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
8.5
9
9.5
10
10.5
11
11.5
12
12.5
pH

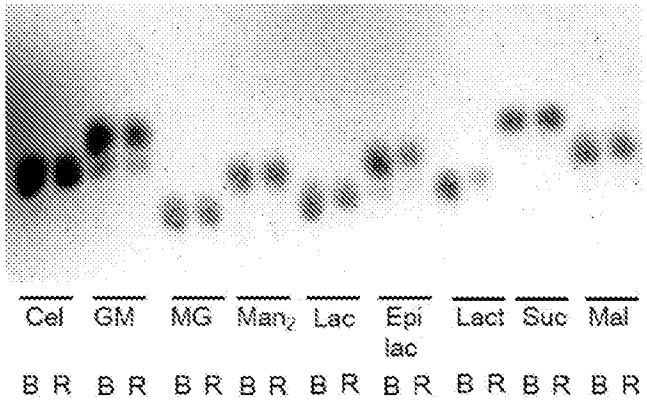
[図12]


DfMEの熱安定性
Relative activity(%)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Temperature(° C)

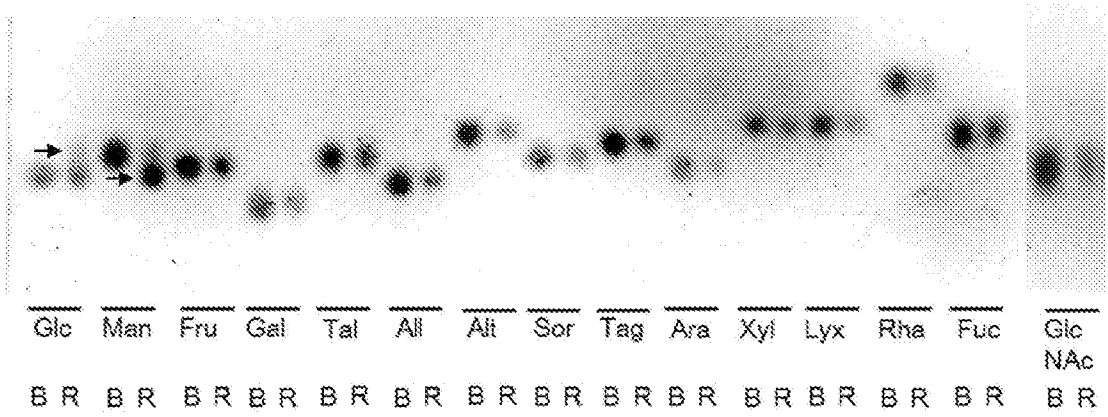
[図13]


Glc
Man
Fru
Gal
Tal
All
Alt
Sor
Tag
Ara
Xyl
Lyx
Rha
Fuc
Glc NAc
B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R

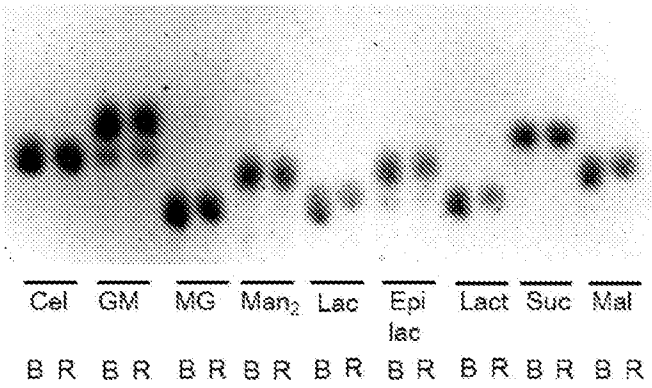
[図14]


Cel
GM
MG
Man2
Lac
Epi lac
Lact
Suc
Mal
B R B R B R B R B R B R B R B R B R

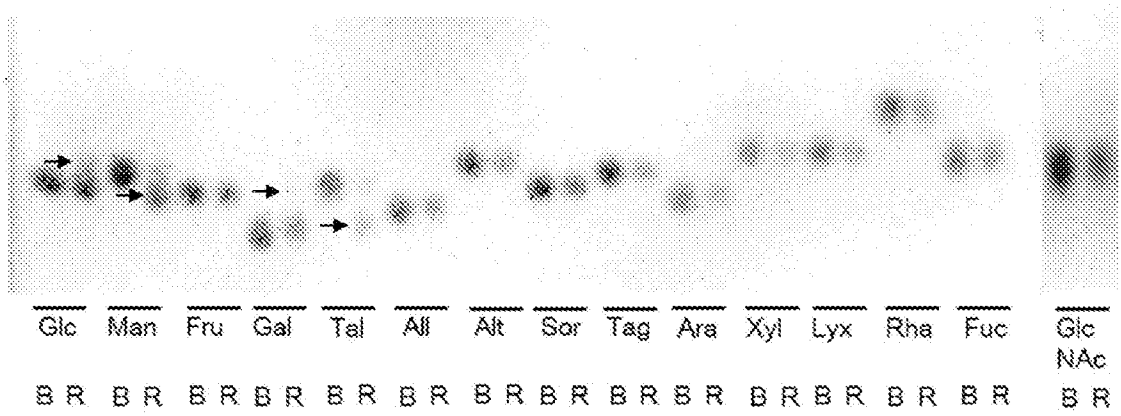
[図15]



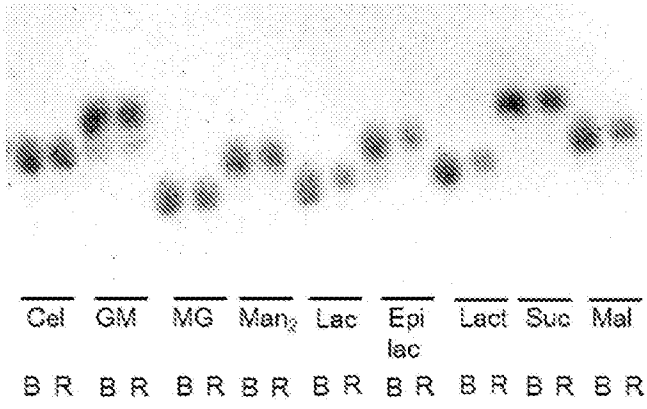
[図16]



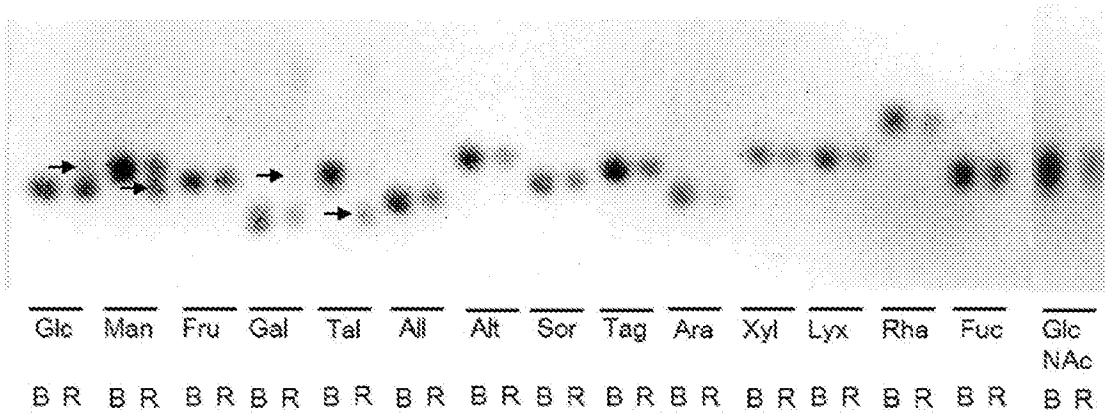
[図17]



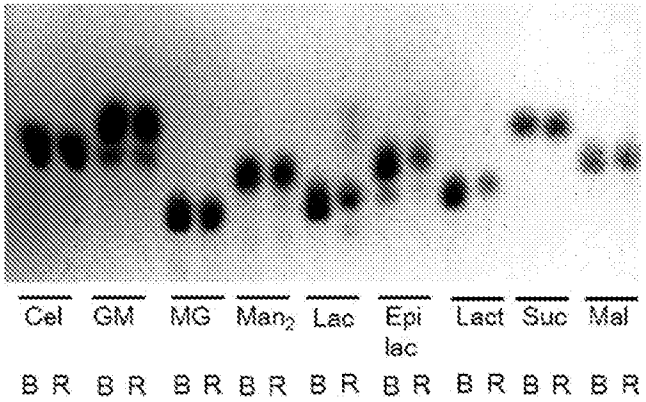
[図18]



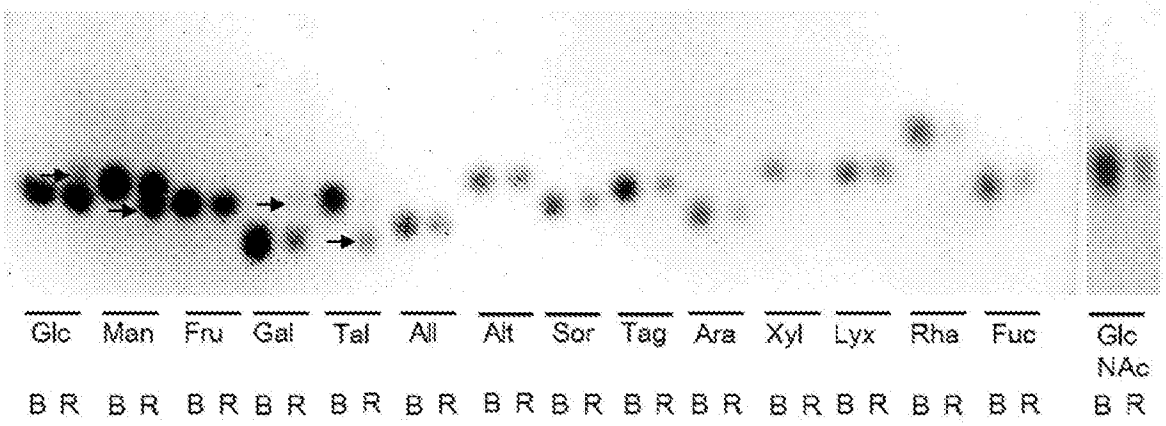
[図19]


Glc
Man
Fru
Gal
Tal
All
Alt
Sor
Tag
Ara
Xyl
Lyx
Rha
Fuc
Glc NAc
B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R

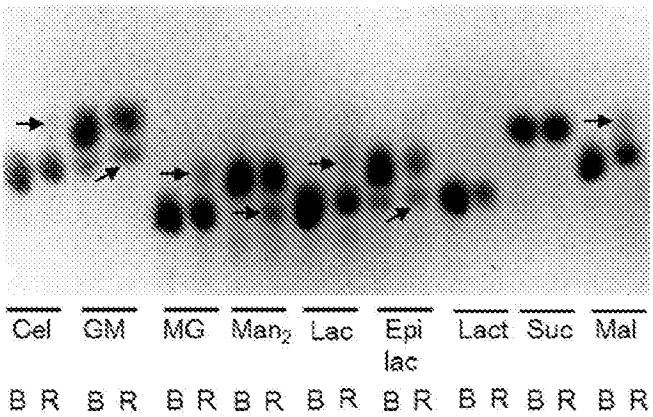
[図20]


Cel
GM
MG
Man2
Lac
Epi lac
Lact
Suc
Mal
B R B R B R B R B R B R B R B R B R

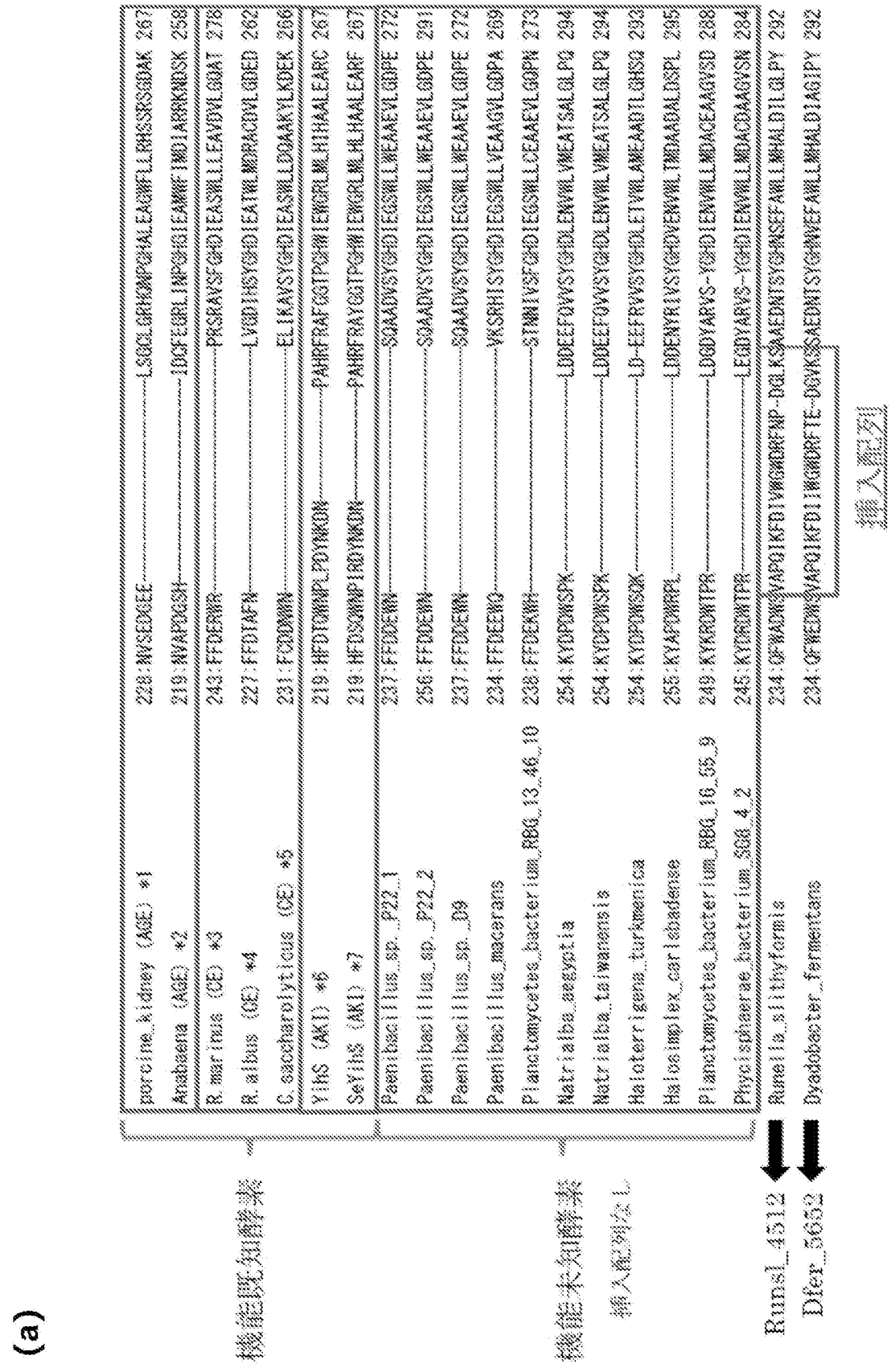
[図21]


Glc
Man
Fru
Gal
Tal
All
Alt
Sor
Tag
Ara
Xyl
Lyx
Rha
Fuc
Glc NAc
B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R B R

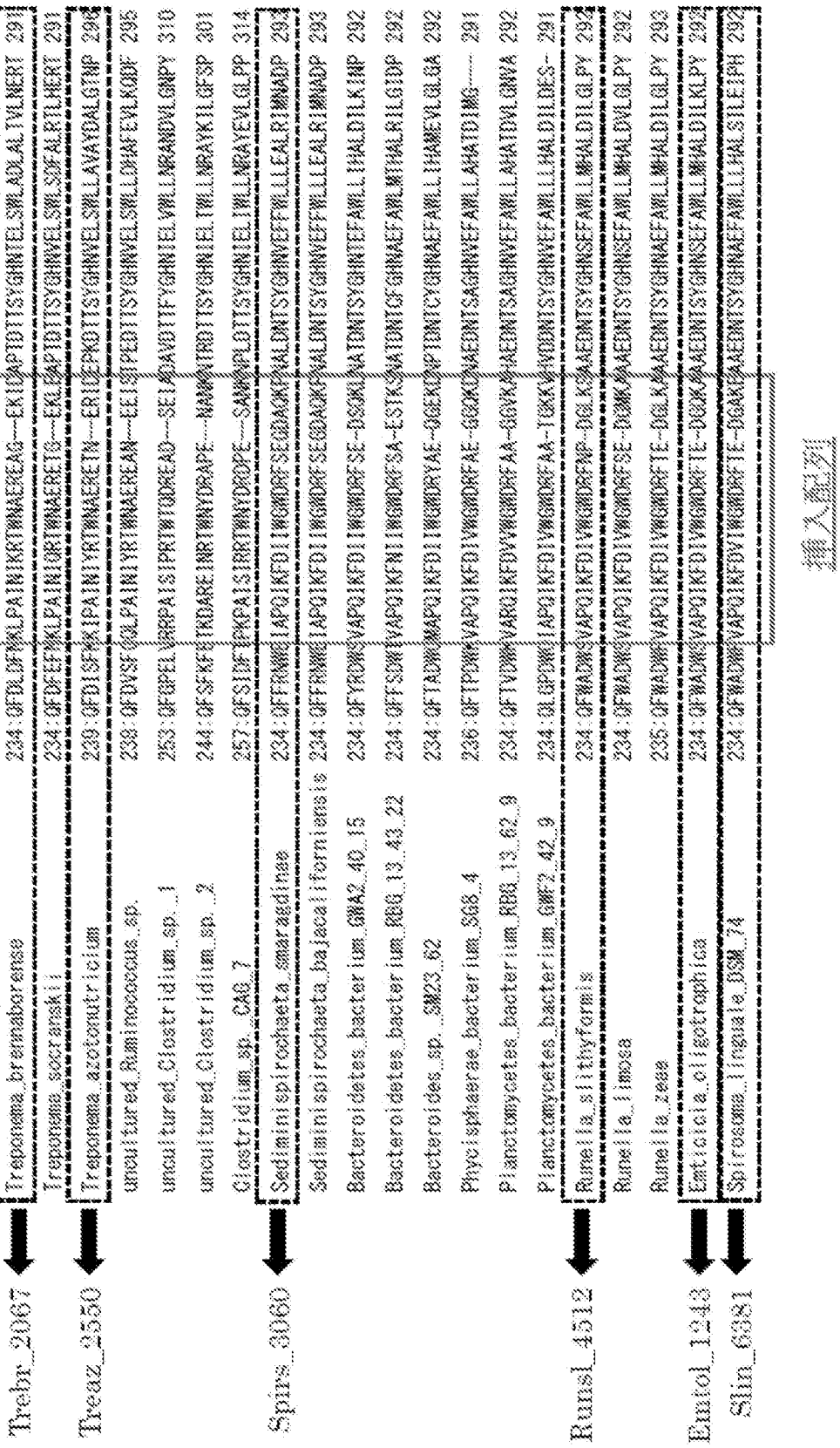
[図22]



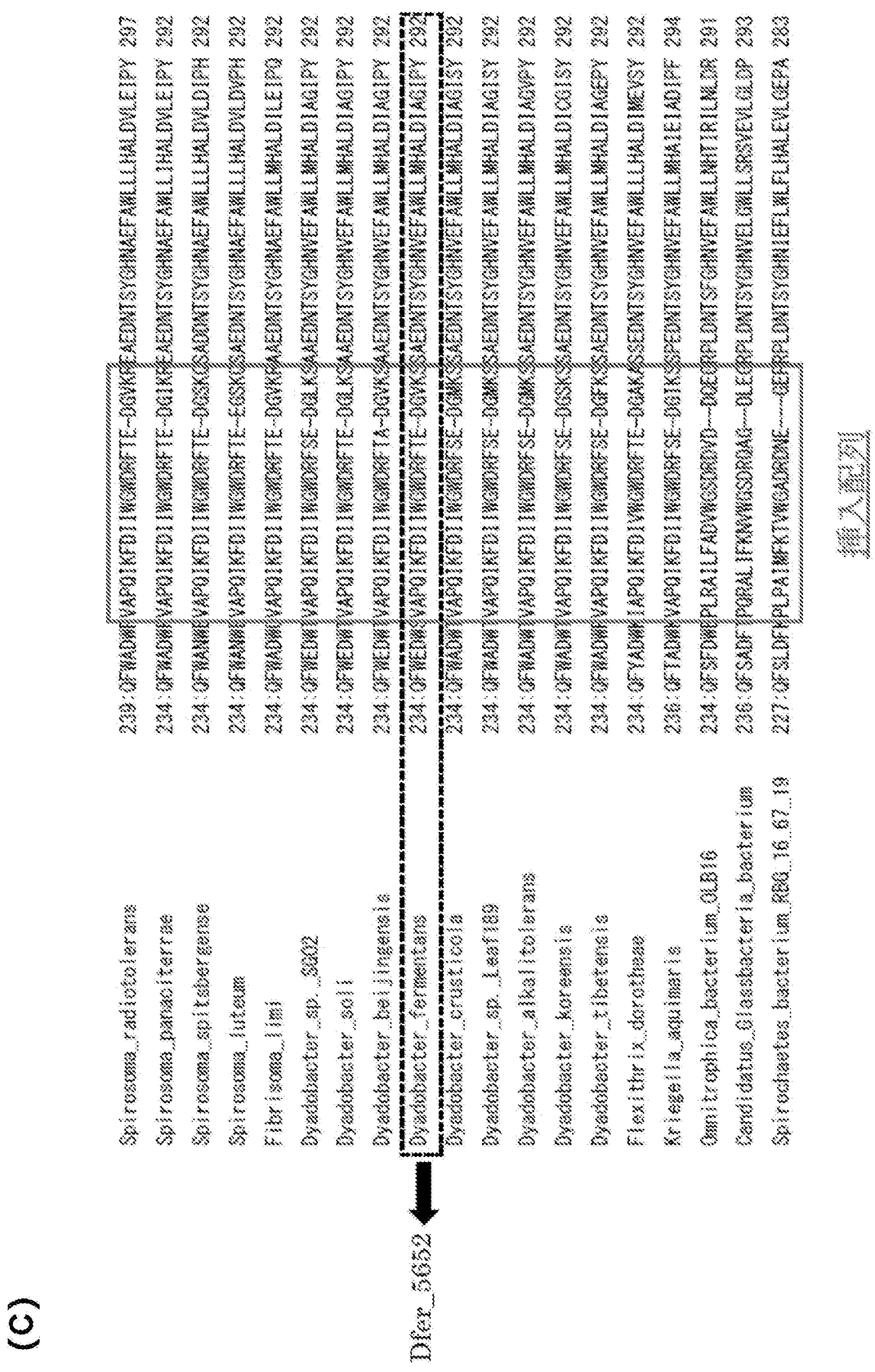
[図23a]



[図23b]


(b)
Trebr_2067
Treaz_2550
Spirs_3060
Runsl_4512
Emtol_1243
Slin_6381
Treponema_brennaborense
Treponema_socranskii
Treponema_azotonutricium
uncultured_Ruminococcus_sp.
uncultured_Clostridium_sp._1
uncultured_Clostridium_sp._2
Clostridium_sp._CAG_7
Sediminispirochaeta_smaragdinae
Sediminispirochaeta_bajacaliforniensis
Bacteroidetes_bacterium_GWA2_40_15
Bacteroidetes_bacterium_RBG_13_43_22
Bacteroides_sp._3M23_62
Phycisphaerae_bacterium_SG8_4
Planctomycetes_bacterium_RBG_13_62_9
Planctomycetes_bacterium_GWF2_42_9
Runella_slithyformis
Runella_limosa
Runella_zeae
Emticicia_oligotrophica
Spirosoma_linguale_DSM_74
挿入配列

[図23c]



[図24]

配列番号 1 *Runella slithyformis* DSM 19594 由来Runsl_4512遺伝子の塩基配列

ATGACTTCTGAAAAAATTGCATCTCTCCGTCAGGAGATTGAGACCTATCTCAACACCGGT
CTGTTACCCTTTTGGATTACCCGTACTGTCGACAAAGAAAATGGCGGTTTTCTTACTCAT
TTCGACCAATTCGGGAATGATTCGGGCGAAGATGAAAAGTCACTGATCGCTCAATCGCGT
TCTGTATTTACCTATTCTTCCGCGCACCGTGCCGGCTATGGAGGTGGTGTATTGGCTGAA
ATGGCCCGTCATGGAGTGGATTATCTGATCAATAACATGTGGGATAATGAGCACGGCGGG
TTTTACTGGATGACCAACCGTAAAGGAGAAGTGACCATCGATCAGAAAATCGTGTACGGA
CTCAGTTTCTGTATCTATTCACTGAGTGAATATACCCTTGCTACGGGCGACCCACGCGGC
CGGGAATACGCCGAAAAAACCTTTGATTTATTGCAAAAATACGCTGTTGATACGCATTAT
GGCGGCTATTTTGAAATGTTTAACCGTGATTGGACCCTCAAAGGTCCCGGTGCCGCCGGT
GGTGACCGCAAGACCCTCGACGTACACATGCACCTCATGGAAGCCTATACAACGTTGTAT
GAATGTACGGGGCAGGAAATTCATCGTCGTAAGTTGCTGGAAACCATTGAATTGCTCGTC
AATAAGGTGATGCACCCGGAGTACGGGACGGGGATCCCGCAATTTTGGGCCGATTGGAGT
GTCGCTCCTCAGATCAAATTTGACATCGTTTGGGGGTGGGATCGCTTCAATCCCGATGGT
CTTAAGTCAGCGGCAGAAGATAACACCAGCTACGGACACAACTCCGAATTTGCCTGGCTT
CTGATGCACGCGTTGGATATACTGGGCTTGCCGTACGACACGTACCGCGAGCAAATCACT
AAATCGTATACGCATGCGGTGGAGAATGGCGTTGATTGGGAATTCGGCGGGGTGTACGTG
GAAGGCTCGCACGCCGGACAGGTATACGACAAAGAAAAGGAGTTTTGGCAGCAGGCCGAA
ATGCTTATCGGAATGTTGGATGCGTACCGCTTTTTGAAAGATGAAAAATACCTGCAAGCC
TACGAAAACATTCATCGTTTTGTGTTTGACAAAATGATCAATCATTCCTTAGGCGAATGG
TGGCCGCTCATGACGCGCGAAGGCGTGCCCATCTGGAAGCACATGAGCCATTCCTGGAAA
ATCAATTACCACGATGTACGCTCAATGATACAGTCCATTGTGCGACTGGATAAGATTGCA
AAAGGGGTGTAG

配列番号 2 Runsl_4512遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MTSEKIASLRQEIETYLNTGLLPFWITRTVDKENGGFLTHFDQFGNDSGEDEKSLIAQSRSVFTYSS
AHRAGYGGGVLAEMARHGVDYLINNMWDNEHGGFYWMTNRKGEVTIDQKIVYGLSFCIYSLSEYTLA
TGDPRGREYAEKTFDLLQKYAVDTHYGGYFEMFNRDWTLKGPGAAGGDRKTLDVHMHLMEAYTTLYE
CTGQEIHRRKLLETIELLVNKVMHPEYGTGIPQFWADWSVAPQIKFDIVWGWDRFNPDGLKSAAEDN
TSYGHNSEFAWLLMHALDILGLPYDTYREQITKSYTHAVENGVDWEFGGVYVEGSHAGQVYDKEKEF
WQQAEMLIGMLDAYRFLKDEKYLQAYENIHRFVFDKMINHSLGEWWPLMTREGVPIWKHMSHSWKIN
YHDVRSMIQSIVRLDKIAKGV

[図25]

配列番号 3 *Dyadobacter fermentans* DSM 18053 由来 Dfer_5652 遺伝子の塩基配列

ATGAATGTAGATCAATTGAAAAGTTACCGCGAGGAAATCCGCCAGCATCTGACTTCGGAG
CTGCTTCCATTCTGGGAAAACCGGGCTGTGGACCGGGAAAACGGCGGCTTTATAACGCAT
TTCGACAACGCAGGCAACGATTCGGGCGAGGACGAAAAGTCGCTCATCGCGCAAACACGC
ACGGTGTACACCTTCTCCTCCGCACACCGCGCGGGCTATGGCGAAGGCCGGTATGCCGAC
ATTGCCCGGCACGGTGTCGATTTTCTGATCAACAAGATGTGGGACAATGAATATGGCGGG
TTTTACTGGCTCATGGACCGCAAGGGCAATGTCAACATCGACGAAAAAATCGTGTACGGC
CACAGCTTCGCGATTTACAGCCTTGCGGAATATACGCTCGCTACCGGAGACCCCCGCGGT
TTGGAATATGCGGAAAAGGTTTTTGACCTGTTACAAAAACATGGCGCAGACACCTACTAC
GGCGGCTATTTCGAGATGTTCCACCGCAACTGGGACCTCAAAGGCCCCGGCGCGGCGGGA
GGCGACCGCAAGACGCTCGACGCTCATATGCACCTCATGGAAGCATTCACGACGCTCTAC
GAAGCCTCGGGCAAGCAGGTTCACCGCCGCAAGCTGGTTGAGATAATCCGTTTGCTCATT
AATAAAATCATGCATCCGCAATACCGGACCGGCATTCCGCAGTTCTGGGAAGATTGGTCG
GTGGCGCCGCAGATCAAATTTGACATTATCTGGGGCTGGGACCGCTTTACCGAGGACGGT
GTAAAGAGCTCGGCGGAGGATAATACCAGCTACGGCCACAACGTAGAATTTGCGTGGCTG
CTCATGCACGCGCTCGACATTGCCGGCATTCCGTACGACGAATACCACGACCAGCTCAAA
GCTTCCTACGACCACGCGGTCGAGTATGGCATCGATTGGGAGTTTGGCGGTGTGTATGTG
GAGGGCTCTCACGCCGGCGAAGTGTACGATCGCGAGAAGGAGTTCTGGCAGCAAGCGGAA
GTCATTATCGGTATGCTCGACGCCTACCGGGTGTATGGCGATGAGAAGTATTTGAAAGCC
TACGACGCCACCCATCGTTTTGTTTTTGATAAAATGATCCACCATTCGGTAGGCGAATGG
CTCCCGCTCCTCACACGCCAGGGCGAGCCGATATGGAAGCATATGAGCCATTCGTGGAAG
GTCAATTACCATTCGGTGCGCTCGATGGTGCAGGGAATTGTCCGTTTGAACAAACTGATT
GGAAATAAGTAG

配列番号 4 Dfer_5652 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MNVDQLKSYREEIRQHLTSELLPFWENRAVDRENGGFITHFDNAGNDSGEDEKSLIAQTRTVYTFSS
AHRAGYGEGRYADIARHGVDFLINKMWDNEYGGFYWLMDRKGNVNIDEKIVYGHSFAIYSLAEYTLA
TGDPRGLEYAEKVFDLLQKHGADTYYGGYFEMFHRNWDLKGPGAAGGDRKTLDAHMHLMEAFTTLYE
ASGKQVHRRKLVEIIRLLINKIMHPQYRTGIPQFWEDWSVAPQIKFDIIWGWDRFTEDGVKSSAEDN
TSYGHNVEFAWLLMHALDIAGIPYDEYHDQLKASYDHAVEYGIDWEFGGVYVEGSHAGEVYDREKEF
WQQAEVIIGMLDAYRVYGDEKYLKAYDATHRFVFDKMIHHSVGEWLPLLTRQGEPIWKHMSHSWKVN
YHSVRSMVQGIVRLNKLIGNK

[図26]

配列番号 5 *Emticicia oligotrophica* 由来 Emtol_1243 遺伝子の塩基配列

atgaatcctattcaagcccgagaacttcgagatgagattgaaaattatctcaacaacagccttttac
ctttctggattacccgaacagttgataatcaatatggaggttttcttacccatttcgaccaatatgg
caatgattctggagaagacgagaaatcgctcattgctcaatctcgttcggtttttacttactcatca
gcccaccgtgctggctatgggggcggtaaattagcagaaatggctcgtcatggcgtagatttcatgc
ttaataaaatgtgggacgaagaatacggtggattctattggatgatgaatcgtaaaggtgaagtagt
aattgatgagaaaatcgtttacggtcatagctttgctatttacagtttaagcgaatatacccttgct
acaggtgacccacgtggacgtgaatacgccgaaaaagttttgatttattacaaaaacacgtagtag
ataccaattatggtggttattgggaaatgttccatcgaaattgggatttgaaaggccccggtgccgc
aggtggtgaccgtaaaaccctagatgctcacatgcacttaatggaagctttcaccactttgtatgaa
tgtactgggcagcaggtacatcgccgtaaacttttagagattattgagattctgactaaaaaaatca
tgcacccaaaatatggcacgggtattccacaattttgggccgattggtcggtggctccacaaatcaa
atttgatattgtttggggttgggatagatttacggaagatggacaaaaagctgctgccgaagataac
accagttatggccacaattcagaatttgcgtggttattaatgcatgctcttgatattctgaaattac
cgtacgacctccaccacgagcagattcaaaaatcatttagccactcagtagattatggcatcgactg
ggaatttggtggagtttatgtagaaggttcgcacgcaggtgaagtttatgaccgagaaaaagaattt
tggcaacaagccgaaatgctcattggtatgctcgatgcttatcgctacttaaaagatgaaaaatact
ggaatgcctatgtgaatgttcatcgattcgtttttgataaaatgattaaccattcattaggcgaatg
gtggccactcatgacccgccaaggcgagccaatatggaaacacatgagccattcatggaaaatcaat
taccacgatgtacgctcaatgattcagtcggtcgtgagattgaataagcttttagaagcttaa

配列番号 6 Emtol_1243 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MNPIQARELRDEIENYLNNSLLPFWITRTVDNQYGGFLTHFDQYGNDSGEDEKSLIAQSRSVFTYSS
AHRAGYGGGKLAEMARHGVDFMLNKMWDEEYGGFYWMMNRKGEVVIDEKIVYGHSFAIYSLSEYTLA
TGDPRGREYAEKVFDLLQKHVVDTNYGGYWEMFHRNWDLKGPGAAGGDRKTLDAHMHLMEAFTTLYE
CTGQQVHRRKLLEIIEILTKKIMHPKYGTGIPQFWADWSVAPQIKFDIVWGWDRFTEDGQKAAAEDN
TSYGHNSEFAWLLMHALDILKLPYDLHHEQIQKSFSHSVDYGIDWEFGGVYVEGSHAGEVYDREKEF
WQQAEMLIGMLDAYRYLKDEKYWNAYVNVHRFVFDKMINHSLGEWWPLMTRQGEPIWKHMSHSWKIN
YHDVRSMIQSVVRLNKLLEA

[図27]

配列番号 7 *Spirosoma linguale* DSM 74 由来 Slin_6381 遺伝子の塩基配列

atgactaacgaaaccttacatcattgccgtcaggagttacaccatcacctgaccaccgagttgctgc
ccttctggacggcccgcaccgccgatcatgtacacgggggcttcattacccatttcgacgagcatgg
ccacgactcgggcgaagacgaaaaatcgctcattgcccagacccgatctatctatacgtatgcatcg
gcccaccgggcgggctacggatcgggtgagttggccgacttggcgcggcatggcgtcgactatttgc
tgaaccgcatgtgggaccacgaacacggcggtttttactggatgaccaaccgccaaggcgaggtaac
gaacgaccagaaaattgtgtacggccaaagtttcgccatctattgcctgagtgagtataccctcgct
accggcgaccaacggggcgttgagtatgcccagaaagtctttgatttactccagaaatacggagccg
atacctgctatggcgggtacttcgaaatgtttgaccgcgactggaccctgaaaggacccggtgctgc
cgggggggaaccgtaagaccctcgatgctcacatgcaccttatggaggcctttactactttgtacgaa
tgtacgcgccagcccatccaccgccggaagctcctggaagtgatcagcctgttggttggtaaagtga
tgcatcccgtatatggtacgggcgtaccgcagttctgggccgattggcgggtggccccgcagataaa
attcgacgtgatttggggatgggaccgctttacggaagacggtgcaaaagaagccgccgaagataac
accagctacggccataatgccgagtttgcctggttgctgctccatgcactttcgatactggagattc
cgcacgaaacgtattttagtcagttgcagaaagcgttttcccacgcagccgacaacggtgtcgactg
ggaatttgggggcgtttttgtcgagggctcgcacagtgggaaggtctacgaccgggaaaaggagttc
tggcagcaggccgaagtacttattggttttctggatgcctatcgaatcttcggggaggaaaaatact
ggcgggcgtatgagaacgttcaccggtttgtgatggacaaaatggtgaatcgtccagtaggggagtg
gtggccgctcatgacgcgaaaaggggtgcccatctggacacacatgagccattcctggaagataaac
taccacaccgtccggtcgatggtgcagtcgatccggcggttggatatgctgttggagaaggacaccg
ttcgtgactga

配列番号 8 Slin_6381 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MTNETLHHCRQELHHHLTTELLPFWTARTADHVHGGFITHFDEHGHDSGEDEKSLIAQTRSIYTYAS
AHRAGYGSGELADLARHGVDYLLNRMWDHEHGGFYWMTNRQGEVTNDQKIVYGQSFAIYCLSEYTLA
TGDQRGVEYAQKVFDLLQKYGADTCYGGYFEMFDRDWTLKGPGAAGGNRKTLDAHMHLMEAFTTLYE
CTRQPIHRRKLLEVISLLVGKVMHPVYGTGVPQFWADWRVAPQIKFDVIWGWDRFTEDGAKEAAEDN
TSYGHNAEFAWLLLHALSILEIPHETYFSQLQKAFSHAADNGVDWEFGGVFVEGSHSGKVYDREKEF
WQQAEVLIGFLDAYRIFGEEKYWRAYENVHRFVMDKMVNRPVGEWWPLMTRKGVPIWTHMSHSWKIN
YHTVRSMVQSIRRLDMLLEKDTVRD

[図28]

配列番号 9 *Sediminispirochaeta smaragdinae* 由来 Spirs_3060 遺伝子の塩基配列

ATGAAAGCAAAGATAGCAGACTGGAAAAAGGAGATGACCGAGCACCTGACAAACGAGTTGCTCCCCT
TCTGGACCAGTCGATGTTGGGACGAGGAATGGGGCGGATTCATAACACAATTCGGTGCGAAAGGGGA
AGACACGGGCGTCGACGAGAAATCGCTGCTCGCCCACATGAGGACCATCTACTCCCTCTCCCTGGCC
GCAGATCACGGATTCGACAAGGACGGAATCTGCCGTGATCTTGCAGGCCGAGGGGTAAAGCACGCCA
TAGACCACTATTGGGACCCGGTCTACGGCGGATTCTACTGGCTTTTCGACCGGAAAAACAAGGTTCT
CATCGATAAGAAGATCCTTTACGGCCACAGCTTTGCCATCTATGCCCTGGCAACCTACAGCAAGGTC
TTCGGCGACCCCACCGCGCTTCACTATGCAGAGGCGTGTTTCGACCTTTTGCAGAAGTATGCGGCGG
AAACGACCTACGGCGGCTATCTCGAGATGTTCGAACGGGACTGGAAGCTCTGCGGCCCCGGTAGTCA
AGGCGGCGACAGAAAGACCCTCGACGTTCATATGCACCTCATGGAGGCTTTCACCGCCCTTTATGCG
GCCAGCGGTAAGGAAATCCATCGGCGTAAGCTCGAAGAGATCATCGAAATCCTGATGGTGAACATTC
TTCATCCCACATACAGAACCGGCATTCCCCAGTTTTTCCGTAACTGGGAGATCGCTCCGCAGATCAA
ATTCGACATCATCTGGGGCTGGGACCGCTTCAGCGAGGGTGATGCGCAGAAACCGAATGCCCTGGAT
AATACCTCATACGGCCATAACGTCGAGTTCTTCTGGCTTCTGCTCGAGGCCTTGCGGATCATGAATG
CCGACCCGAAACCCTACCTTTCGACCTTTCATGCCATCCTCGAACATGCCCTTGCCCACGGAGTCGA
CAGACAATACGGAGGTATCTATGTCGAGGGCTCACATGACGGGAGCCAGGTCTACGACATGGCCAAA
GAGTTTTGGCAGCAGGCGGAATTTTTGACGGGAATGCTCGATGCATACCTCTTTTACGGAGAGGAGC
GTTACCTGGATGTGTACGAAAATGTGCACCGCTTCGTTATGGACAAGATGATCCGCCACGATATCGG
AGAGTGGCTGCCCCTTCTCGAACGCGAGGGGAAGCCCATCTGGACCCATATGAGCCACTCCTGGAAG
GTGAACTATCATACAATCAGGGCCGCTGTCCTCTCCATTGATCGCTTGGAAAAGATAGAAAACAGAA
TCGGTCAACAATAA

配列番号 10 Spirs_3060 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MKAKIADWKKEMTEHLTNELLPFWTSRCWDEEWGGFITQFGAKGEDTGVDEKSLLAHMRTIYSLSLA
ADHGFDKDGICRDLAGRGVKHAIDHYWDPVYGGFYWLFDRKNKVLIDKKILYGHSFAIYALATYSKV
FGDPTALHYAEACFDLLQKYAAETTYGGYLEMFERDWKLCGPGSQGGDRKTLDVHMHLMEAFTALYA
ASGKEIHRRKLEEIIEILMVNILHPTYRTGIPQFFRNWEIAPQIKFDIIWGWDRFSEGDAQKPNALD
NTSYGHNVEFFWLLLEALRIMNADPKPYLSTFHAILEHALAHGVDRQYGGIYVEGSHDGSQVYDMAK
EFWQQAEFLTGMLDAYLFYGEERYLDVYENVHRFVMDKMIRHDIGEWLPLLEREGKPIWTHMSHSWK
VNYHTIRAAVLSIDRLEKIENRIGQQ

[図29]

配列番号 11 *Treponema brennaborense* 由来 Trebr_2067 遺伝子の塩基配列

atgaagaatgccggagaatataagaaagagttatccggaatattacgggataaactgattccgtttt
ggcttgaacgggccgtggactcgcagttcggcggttatctgaccagctttgatgaaaacggggaact
gttcggtgaacttgaaaagaacatcgttacgcagagtcgtatggtgtggggtttttcaaatttaatt
ccgttcgcccgcgaacaggataaagcgacaatgaaagaagccgccgcgcagggcgcgcgtttttga
cagagcgattttgggatccggaattcggcggattttactggctgttgaatcgggacgcgtccgtgcg
tgatccggctaaactgacgtacgggcaaagcttcgccatttacgcattgtcggaatattatctgatg
agtaaagatgtaaaagcgcttgaatatgcgtgcaggggattcgattgtttgcaaaagtacgcgacgg
acacgctgcgcggcggctattatgaaaacatcgagcgcaattggaaactgtcgccggcgggcgactt
tgccggcgaccgcaaatcgctcgacattcacatgcatttgcttgaggcatacactacgctgtatttg
gcgtccggcgaatccattcatgcccggaaactgcgcgaagtgtacgatttgatcgtacgtcgcatgg
tcaacgcggaaaaaggatacggatacaatcagtttgatttggatttcaataaactgccggcaatcaa
tataaaacgcacctggaatgcggagcgtgaagcaggggaaaaaatcgacgcgccgactgatacgacc
agttacggacacaatacggaattgagctggcttgcggatttggcgctgacggtactgaacgagcgta
cgctctgcgacaacgtgttgctgcagcgtttgctcgatcacgcgctgacgtacggttacgactacga
gttcggcggtgtttatagagacggggtcgcggatcggaaagcgctcgtatacgacaaagaatggtgg
cagaattttgagtccatgaccggttttctgaacggatacattctgttcggagacgaaaaatatttta
aggcgtttgccggtacgtgggatttcattcacgcgtattttatgaaccacaaactcggtgaaagccg
ccaattgctcagccgttccggagttccgctgatttcaaatctgggaaatccctggaaaggtatgtat
cataccggacgggcgcttgccgaatgcatcaagcgccttgaccgctgcaaatga

配列番号 12 Trebr_2067 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MKNAGEYKKELSGILRDKLIPFWLERAVDSQFGGYLTSFDENGELFGELEKNIVTQSRMVWGFSNLI
PFAREQDKATMKEAAAQGARFLTERFWDPEFGGFYWLLNRDASVRDPAKLTYGQSFAIYALSEYYLM
SKDVKALEYACRGFDCLQKYATDTLRGGYYENIERNWKLSPAGDFAGDRKSLDIHMHLLEAYTTLYL
ASGESIHARKLREVYDLIVRRMVNAEKGYGYNQFDLDFNKLPAINIKRTWNAEREAGEKIDAPTDTT
SYGHNTELSWLADLALTVLNERTLCDNVLLQRLLDHALTYGYDYEFGGVYRDGVADRKALVYDKEWW
QNFESMTGFLNGYILFGDEKYFKAFAGTWDFIHAYFMNHKLGESRQLLSRSGVPLISNLGNPWKGMY
HTGRALAECIKRLDRCK

[図30]

配列番号 13 *Treponema azotonutricium* 由来 Treaz_2550 遺伝子の塩基配列

atgaacgggaaaatgacagagcctttgaggcagttacggaacgaaatggctcaagtactgcgggata
agatgattccctttggctcaatcgcagcatagatacagaatggggagggtacctaacctcaattga
cgaaaaaggtatcgtttctcccgatgaacctaaatttatagtcacccaagcccgtatgctttggggt
ttttctgcattgaggaaatatgtggaccccaaagacgccgcccgtatcgaaaacgctgcgaggcagg
gttatcaatttttaatcaaaaatttttgggacaaggaattcggcggattcttctggagtactaccaa
ggccggagtttgtaccgacccgggaaagctaagttatgctcaaagtttcgctatatatgccttaagt
gaatatgcgctacagtttggagacccagaagccagggaatatgcggaaaaaaccttaatgcgatgc
aaatttacgcagctgatacccttatggcggatattatgagaatatgcagatggattggtctttggc
cggaaacggcatgtatgcaggagatcgaaaatcactggatatccatatgcaccttatggagtccttt
acaaccctgtataaggcaactcaaaaggaaattcaccgccgcaaactgattgaagtaatcaatctca
ttctgttgcgcatggccgacagggaaaagggctatggatttaaccagtttgatatatcttttaaaaa
aatccctgcaataaatatttaccgtacctggaatgcagaacgtgaaacaaacgaacgtattgacgag
cccaaagacacaacttcctatgggcataatgtggagttgagctggctccttgccgttgcttatgatg
ctcttggaacgaatcccggtaaagattcagaaattatgagccggtttctggatcattcaattaaata
cggctatgacaacgaatatggcggcatataccgggatggtattgctgacagtcctgcattggtcaca
gataaggaatggtggcaaaattttgaggcaatgacaggttacctaaacggatatttccgctttggca
aggaagattaccttaagcactgtgagaatacctgggaatttatcaaaaagcatttcttaattgaacc
ctttggagaatccaggcagctcttggcaaggaagggtgaatcgatcatccccaccataggaaatccc
tggaaaggaatttatcatacaggacgggcattggctgaatgtatcagtattgctgaaaaaattgaga
atggaggaaaaacatggtaa

配列番号 14 Treaz_2550 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列

MNGKMTEPLRQLRNEMAQVLRDKMIPFWLNRSIDTEWGGYLISIDEKGIVSPDEPKFIVTQARMLWG
FSALRKYVDPKDAARIENAARQGYQFLIKNFWDKEFGGFFWSTTKAGVCTDPGKLSYAQSFAIYALS
EYALQFGDPEAREYAEKTFNAMQIYAADTLYGGYYENMQMDWSLAGNGMYAGDRKSLDIHMHLMESF
TTLYKATQKEIHRRKLIEVINLILLRMADREKGYGFNQFDISFKKIPAINIYRTWNAERETNERIDE
PKDTTSYGHNVELSWLLAVAYDALGTNPGKDSEIMSRFLDHSIKYGYDNEYGGIYRDGIADSPALVT
DKEWWQNFEAMTGYLNGYFRFGKEDYLKHCENTWEFIKKHFLIEPFGESRQLLARKGESIIPTIGNP
WKGIYHTGRALAECISIAEKIENGGKTW

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/030497

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N9/90(2006.01)i, C12P19/02(2006.01)i, C1N15/31(2006.01)n

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. C12N9/90, C12P19/02, C12N15/31

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N-acylglucosamine 2-epimerase [Runella slithyformis]., ACCESSION WP_013930124, Protein	1-3, 7
Y	database[online], [retrieved on 06 November 2018], 18 May 2013, Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013930124>, entire text	20
X	N-acylglucosamine 2-epimerase [Treponema brennaborense], ACCESSION WP_013759185, Protein	1, 4-5, 7-8, 10
Y	database[online], [retrieved on 06 November 2018, 18 May 2013, Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013759185>, entire text	20

☒ 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 application or patent 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
07 November 2018 (07.11.2018)	20 November 2018 (20.11.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/030497

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N-acylglucosamine 2-epimerase [Sediminispirochaeta smaragdinae], ACCESSION WP_013255620, 18 May 2013, Protein database[online], [retrieved on 06 November 2018], Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013255620>, entire text	8-9
Y	KR 10-2012-0069126 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION, KONKUK UNIVERSITY) 28 June 2012, paragraphs [0013]-[0018] (Family: none)	20
A	N-acylglucosamine 2-epimerase[Dyadobacter fermentans], ACCESSION WP_015815082, Protein database[online], [retrieved on 06 November 2018], 21 May 2013, Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_015815082>, entire text	1-22
A	N-acylglucosamine 2-epimerase[Emticicia oligotrophica DSM 17448], ACCESSION AFK02392, 08 January 2015, [retrieved on 06 November 2018], Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFK02392>, entire text	1-22
A	N-acylglucosamine 2-epimerase[Spirosoma linguale DSM 74], ACCESSION ADB42339, [retrieved on 06 November 2018], Protein database[online], 24 December 2013, Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/adb42339>, entire text	1-22
A	N-acylglucosamine 2-epimerase[Treponema azotonutricium], ACCESSION WP_015712977, [retrieved on 06 November 2018], Protein database[online], 27 May 2013, Retrieved from the Internet:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_015712977.1>, entire text	1-22
PX	SABURI, W. et al., "Biochemical and structural characterization of Marinomonas mediterranea D-mannose isomerase Marme_2490 phylogenetically distant from known enzymes", Biochimie, 26 October 2017, vol. 144, pp. 63–73	1-22

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０３０４９７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/90(2006.01)i, C12P19/02(2006.01)i, C12N15/31(2006.01)n

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.　C12N9/90, C12P19/02, C12N15/31

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/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	関連する請求項の番号
X Y	N-acylglucosamine 2-epimerase [Runella slithyformis]., ACCESSION WP_013930124, Protein database[online], [retrieved on 2018.11.06], 2013.05.18, Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013930124>, 全文	1-3,7 20
X Y	N-acylglucosamine 2-epimerase[Treponema brennaborense], ACCESSION WP_013759185, Protein database[online], [retrieved on 2018.11.06], 2013.05.18, Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013759185>, 全文	1,4-5,7-8,10 20

☑　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
０７．１１．２０１８	２０．１１．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
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

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５３
高山　敏充
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	関連する請求項の番号
X	N-acylglucosamine 2-epimerase [Sediminispirochaeta smaragdinae], ACCESSION WP_013255620, 2013.05.18, Protein database[online],[retrieved on 2018.11.06], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013255620>,全文	8-9
Y	KR 10-2012-0069126 A (건국대학교 산학협력단) 2012.06.28, [0013]－[0018] (ファミリーなし)	20
A	N-acylglucosamine 2-epimerase[Dyadobacter fermentans], ACCESSION WP_015815082, Protein database[online], [retrieved on 2018.11.06], 2013.05.21, Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_015815082>,全文	1-22
A	N-acylglucosamine 2-epimerase[Emticicia oligotrophica DSM 17448], ACCESSION AFK02392, 2015.01.08, [retrieved on 2018.11.06], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFK02392>,全文	1-22
A	N-acylglucosamine 2-epimerase [Spirosoma linguale DSM 74], ACCESSION ADB42339, [retrieved on 2018.11.06], Protein database[online], 2013.12.24, Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/adb42339>,全文	1-22
A	N-acylglucosamine 2-epimerase [Treponema azotonutricium], ACCESSION WP_015712977, [retrieved on 2018.11.06], Protein database[online], 2013.05.27, Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_015712977.1>, 全文	1-22
PX	SABURI, W. et al., Biochemical and structural characterization of Marinomonas mediterranea D-mannose isomerase Marme_2490 phylogenetically distant from known enzymes, Biochimie, 2017.10.26, Vol. 144, pp.63-73	1-22