

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-29214

(P2010-29214A)

(43) 公開日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 O
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	
審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-256993 (P2009-256993)	(71) 出願人	000000066
(22) 出願日	平成21年11月10日 (2009.11.10)		味の素株式会社
(62) 分割の表示	特願2004-524155 (P2004-524155) の分割		東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号
原出願日	平成15年7月25日 (2003.7.25)	(74) 代理人	100089118
(31) 優先権主張番号	特願2002-218957 (P2002-218957)		弁理士 酒井 宏明
(32) 優先日	平成14年7月26日 (2002.7.26)	(74) 代理人	100113398
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 寺崎 直
(31) 優先権主張番号	特願2003-16765 (P2003-16765)	(74) 代理人	100113103
(32) 優先日	平成15年1月24日 (2003.1.24)		弁理士 香島 拓也
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	原 誠一
			神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内
		(72) 発明者	横関 健三
			神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規ペプチド生成酵素遺伝子

(57) 【要約】

【課題】複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できる新規酵素を提供すること。

【解決手段】カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド合成反応を触媒する新規酵素、この酵素を生産する微生物、およびこの酵素もしくは微生物を使用する安価なペプチドの製造方法。新たに見出したペドバクター属、タキセオバクター属、サイクロバクテリウム属、またはサイクロセルペンス属に属する細菌からペプチドを効率良く合成する新規酵素を見出し、安価かつ簡便にペプチドを製造する方法を見出した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記（E）または（F）に示すタンパク質をコードする DNA。

（E）配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～625 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（F）配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～625 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【請求項 2】

下記（G）または（H）に示すタンパク質をコードする DNA。

（G）配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～645 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（H）配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～645 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【請求項 3】

下記（I）または（J）に示すタンパク質をコードする DNA。

（I）配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 26～620 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（J）配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 26～620 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【請求項 4】

下記（K）または（L）に示すタンパク質をコードする DNA。

（K）配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 18～644 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（L）配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 18～644 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

【請求項 5】

下記（Q）または（R）に示すタンパク質をコードする DNA。

（Q）配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

（R）配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【請求項 6】

下記（S）または（T）に示すタンパク質をコードする DNA。

（S）配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

（T）配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【請求項 7】

下記（U）または（V）に示すタンパク質をコードする DNA。

（U）配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

（V）配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【請求項 8】

下記（W）または（X）に示すタンパク質をコードする DNA。

（W）配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

10

20

30

40

50

(X) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【請求項 9】

下記 (e) または (f) に示す DNA であって、

(e) 配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1935 の塩基配列からなる DNA

(f) 配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1935 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 10】

下記 (g) または (h) に示す DNA であって、

(g) 配列表の配列番号 22 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1995 の塩基配列からなる DNA

(h) 配列表の配列番号 22 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1995 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 11】

下記 (i) または (j) に示す DNA であって、

(i) 配列表の配列番号 24 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 104～1888 の塩基配列からなる DNA

(j) 配列表の配列番号 24 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 104～1888 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 12】

下記 (k) または (l) に示す DNA であって、

(k) 配列表の配列番号 26 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 112～1992 の塩基配列からなる DNA

(l) 配列表の配列番号 26 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 112～1992 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 13】

下記 (q) または (r) に示す DNA であって、

(q) 配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1935 の塩基配列からなる DNA

(r) 配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1935 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 14】

下記 (s) または (t) に示す DNA であって、

(s) 配列表の配列番号 22 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1995 の塩基配列からなる DNA

(t) 配列表の配列番号 22 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1995 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃ で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 15】

下記 (u) または (v) に示す DNA であって、

(u) 配列表の配列番号 24 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 29～1888 の塩基配列からなる DNA

(v) 配列表の配列番号 24 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 29～1888 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃ で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 16】

下記 (w) または (x) に示す DNA であって、

(w) 配列表の配列番号 26 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1992 の塩基配列からなる DNA

(x) 配列表の配列番号 26 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1992 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードする DNA

前記ストリンジェントな条件が、0.1×SSC 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60℃ で洗浄が行われる条件である、DNA。

【請求項 17】

請求項 1～16 のいずれか一項に記載の DNA を有する組換え DNA。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の組換え DNA が導入された形質転換細胞。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、ペプチド生成酵素を蓄積させることを特徴とする、ペプチド生成酵素の製造方法。

【請求項 20】

請求項 18 に記載の形質転換細胞を培地中で培養して培養物を得、当該培養物とカルボキシ成分とアミン成分とを混合して、ジペプチドを合成する、ジペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できる新規酵素に関する。より詳細には、カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド合成反応を触媒する新規酵素、この酵素を生産する微生物、およびこの酵素もしくは微生物を使用するジペプチドの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ペプチドは、医薬品、食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、L-アラニル-L-グルタミンは L-グルタミンに比べ安定かつ水溶性も高いことから、輸液や無血清培地の成分として広く用いられている。

【0003】

ペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、N-ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Z-アラニンと称する）と保護L-グルタミンを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 34, 739（1961）、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966（1962））、Z-アラニンと保護L-グルタミン酸-γ-メチルエステルを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200（1964））、Z-アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特許文献1）、2-置換-プロピオニルハロイドを原料として、N-（2-置換）-プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法（特許文献2）等が知られている。

【0004】

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは光学活性中間体の使用が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。

【0005】

一方、酵素を用いたペプチドの代表的製造法としては、N保護、C無保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる縮合反応（反応1）、および、N保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応（反応2）が広く知られている。反応1の例としては、Z-アスパラギン酸とフェニルアラニンメチルエステルからのZ-アスパルチルフェニルアラニンメチルエステルの製造方法（特許文献3）、反応2の例としてはアセチルフェニルアラニンエチルエステルとロイシンアミドからのアセチルフェニルアラニルロイシンアミドの製造方法（非特許文献1）が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分を用いる方法の報告研究例は極めて少なく、N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応（反応3）の例としては特許WO 90/01555（特許文献4）があり、例えばアルギニンエチルエステルとロイシンアミドからのアルギニルロイシンアミドの製造方法が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C無保護のアミン成分を用いる置換反応（反応4）の例としては、特許EP 278787A1（特許文献5）とEP 359399B1（特許文献6）があり、例えばチロシンエチルエステルとアラニンからのチロシルアラニンの製造方法が挙げられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平1-96194号公報

【特許文献2】特開平6-234715号公報

【特許文献3】特開昭53-92729号公報

【特許文献4】WO 90/01555号公報

【特許文献5】EP 278787A1号公報

【特許文献6】EP 359399B1号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Biochemical J., 163, 531（1977）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記の反応1から反応4の方法の中で最も安価な製造方法となり得るのは、当然ながら保護基の数が最も少ない反応4の範疇に入る反応である。

【0009】

しかしながら、反応4の先行例（特許EP 278787A1）には以下の大きな問題点があった。（1）ペプチド生成速度が極めて遅い、（2）ペプチド生成収率が低い、（3）生産できるペプチドが比較的疎水度の高いアミノ酸を含むものに限られる、（4）添加酵素量が極めて大量、（5）カビ、酵母、植物に由来する比較的高価なカルボキシペプ

10

20

30

40

50

チダーゼ標品が必要である。(反応4)において、細菌およびサッカロミセス(Saccharomyces)属以外の酵母由来の酵素を用いる方法は全く知られておらず、また親水性の高いアラニルグルタミン等のペプチドの製造方法についても全く知られていなかった。このような背景の下、これらペプチドの工業的安価な製造法の開発が望まれていた。

【0010】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できる新規酵素を提供することを課題とする。より詳細には、カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド合成反応を触媒する新規酵素、この酵素を生産する微生物、およびこの酵素もしくは微生物を使用する安価なペプチドの製造方法を提供することを課題とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記目的に鑑み鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは新たに見出したエンペドバクター(Empedobacter)属に属する細菌などからペプチドを効率良く合成する新規酵素を見出し、この酵素遺伝子の配列を決定することにより本発明を完成するに至った。

【0012】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 下記(A)または(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～616のアミノ酸配列を有するタンパク質

20

(B) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～616のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔2〕 下記(C)または(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列表の配列番号12に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号21～619のアミノ酸配列を有するタンパク質

(D) 配列表の配列番号12に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号21～619のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔3〕 下記(E)または(F)に示すタンパク質をコードするDNA。

30

(E) 配列表の配列番号18に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～625のアミノ酸配列を有するタンパク質

(F) 配列表の配列番号18に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～625のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔4〕 下記(G)または(H)に示すタンパク質をコードするDNA。

(G) 配列表の配列番号23に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～645のアミノ酸配列を有するタンパク質

(H) 配列表の配列番号23に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～645のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

40

〔5〕 下記(I)または(J)に示すタンパク質をコードするDNA。

(I) 配列表の配列番号25に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号26～620のアミノ酸配列を有するタンパク質

(J) 配列表の配列番号25に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号26～620のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔6〕 下記(K)または(L)に示すタンパク質をコードするDNA。

(K) 配列表の配列番号27に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号18～644のアミノ酸配列を有するタンパク質

50

(L) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 18～644 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

〔7〕 下記 (M) または (N) に示すタンパク質をコードする DNA。

(M) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(N) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔8〕 下記 (O) または (P) に示すタンパク質をコードする DNA。

(O) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(P) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔9〕 下記 (Q) または (R) に示すタンパク質をコードする DNA。

(Q) 配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(R) 配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔10〕 下記 (S) または (T) に示すタンパク質をコードする DNA。

(S) 配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(T) 配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔11〕 下記 (U) または (V) に示すタンパク質をコードする DNA。

(U) 配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(V) 配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔12〕 下記 (W) または (X) に示すタンパク質をコードする DNA。

(W) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(X) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

〔13〕 下記 (a) または (b) に示す DNA。

(a) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1908 の塩基配列からなる DNA

(b) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1908 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

〔14〕 下記 (c) または (d) に示す DNA。

(c) 配列表の配列番号 11 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 121～1917 の塩基配列からなる DNA

(d) 配列表の配列番号 11 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 121～1917 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

〔15〕 下記 (e) または (f) に示す DNA。

(e) 配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1935 の塩基配列からなる DNA

(f) 配列表の配列番号 17 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 127～1935 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし

10

20

30

40

50

、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

〔16〕 下記(g)または(h)に示すDNA。

(g) 配列表の配列番号22に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1995の塩基配列からなるDNA

(h) 配列表の配列番号22に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1995の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

〔17〕 下記(i)または(j)に示すDNA。

(i) 配列表の配列番号24に記載の塩基配列のうちの塩基番号104～1888の塩基配列からなるDNA

(j) 配列表の配列番号24に記載の塩基配列のうちの塩基番号104～1888の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

〔18〕 下記(k)または(l)に示すDNA。

(k) 配列表の配列番号26に記載の塩基配列のうちの塩基番号112～1992の塩基配列からなるDNA

(l) 配列表の配列番号26に記載の塩基配列のうちの塩基番号112～1992の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

〔19〕 下記(m)または(n)に示すDNA。

(m) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNA

(n) 配列表の配列番号5に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1908の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔20〕 下記(o)または(p)に示すDNA。

(o) 配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1917の塩基配列からなるDNA

(p) 配列表の配列番号11に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1917の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔21〕 下記(q)または(r)に示すDNA。

(q) 配列表の配列番号17に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1935の塩基配列からなるDNA

(r) 配列表の配列番号17に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1935の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔22〕 下記(s)または(t)に示すDNA。

(s) 配列表の配列番号22に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1995の塩基配列からなるDNA

(t) 配列表の配列番号22に記載の塩基配列のうちの塩基番号127～1995の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔23〕 下記(u)または(v)に示すDNA。

(u) 配列表の配列番号24に記載の塩基配列のうちの塩基番号29～1888の塩基配列からなるDNA

(v) 配列表の配列番号24に記載の塩基配列のうちの塩基番号29～1888の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

10

20

30

40

50

〔24〕 下記（w）または（x）に示すDNA。

（w）配列表の配列番号26に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1992の塩基配列からなるDNA

（x）配列表の配列番号26に記載の塩基配列のうちの塩基番号61～1992の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質をコードするDNA

〔25〕 前記ストリンジェントな条件が、 $1 \times \text{SSC}$ 及び0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である、上記〔13〕から〔24〕のいずれか一項に記載のDNA。

〔26〕 上記〔1〕から〔25〕のいずれか一項に記載のDNAを有する組換えDNA

10

〔27〕 上記〔26〕に記載の組換えDNAが導入された形質転換細胞。

〔28〕 上記〔27〕に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、ペプチド生成酵素を蓄積させることを特徴とする、ペプチド生成酵素の製造方法。

〔29〕 上記〔28〕に記載の形質転換細胞を培地中で培養して培養物を得、当該培養物とカルボキシ成分とアミン成分とを混合して、ジペプチドを合成する、ジペプチドの製造方法。

〔30〕 スフィンゴバクテリウム属に属し、カルボキシ成分とアミン成分とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、カルボキシ成分とアミン成分からジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

20

【0013】

なお、配列表の配列番号5に記載のDNAにより、配列番号6に記載のアミノ酸配列が特定される。配列番号11に記載のDNAにより、配列番号12に記載のアミノ酸配列が特定される。配列番号17に記載のDNAにより、配列番号18に記載のアミノ酸配列が特定される。配列番号22に記載のDNAにより、配列番号23に記載のアミノ酸配列が特定される。配列番号24に記載のDNAにより、配列番号25に記載のアミノ酸配列が特定される。配列番号26に記載のDNAにより、配列番号27に記載のアミノ酸配列が特定される。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 図1は、本発明のエンペドバクターの酵素の至適pHを示す図である。

【図2】 図2は、本発明のエンペドバクターの酵素の至適温度を示す図である。

【図3】 図3は、L-アラニンメチルエステルとL-グルタミンからのL-アラニル-L-グルタミン生成の経時変化を示す図である。

【図4】 図4は、サイトプラズム画分（Cy）とペリプラズム画分（Pe）に存在する酵素量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

40

以下、本発明の新規ジペプチド生成酵素遺伝子とその遺伝子産物であるジペプチド生成酵素について詳細に説明する。

（1）本発明のDNAを有する微生物

本発明のDNAは、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する能力を有するタンパク質をコードするものである。本明細書において、カルボキシ成分とは、ペプチド結合（ $-\text{CONH}-$ ）におけるカルボニル部位（CO）を供給する成分のことをいい、アミン成分とは、ペプチド結合におけるアミノ部位（NH）を供給する成分のことをいう。また、本明細書において、単に「ペプチド」というときは、特に断らない限り、少なくとも1つ以上のペプチド結合を有するポリマーのことをいう。また、本明細書において「ジペプチド」とは1つのペプチド結合を有するペプチドのことをいう。

50

【0016】

本発明のDNAを有する微生物としては、例えばエンペドバクター属に属する細菌、スフィンゴバクテリウム属、ペドバクター属、タキセオバクター属、サイクロバクテリウム属、またはサイクロセルペンス属に属する細菌などが挙げられる。より具体的にはエンペドバクター ブレビス (*Empedobacter brevis*) ATCC 14234 株 (FERM P-18545 株、FERM BP-8113 株)、スフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium sp.*) FERM BP-8124 株、ペドバクター ヘパリナス (*Pedobacter heparinus*) IFO 12017 株、タキセオバクター ゲルブルプルアッセン (*Taxeobacter gelupurpurascens*) DSMZ 11116 株、サイクロバクテリウム マリナム (*Cyclobacterium marinum*) ATCC 25205 株、サイクロセルペンス ブルトネンシス (*Psychoserpens burtonensis*) ATCC 700359 株などが挙げられる。エンペドバクター ブレビス ATCC 14234 株 (FERM P-18545 株、FERM BP-8113 株)、スフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium sp.*) FERM BP-8124 株、ペドバクター ヘパリナス (*Pedobacter heparinus*) IFO 12017 株、タキセオバクター ゲルブルプルアッセン (*Taxeobacter gelupurpurascens*) DSMZ 11116 株、サイクロバクテリウム マリナム (*Cyclobacterium marinum*) ATCC 25205 株、サイクロセルペンス ブルトネンシス (*Psychoserpens burtonensis*) ATCC 700359 株は、本発明者らが、カルボキシ成分とアミン成分からペプチドを高収率で生産する酵素の生産菌を検索した結果に選出した微生物である。

【0017】

上記菌株のうち、FERM番号が記載されているものは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

【0018】

上記菌株のうち、ATCC番号が記載されているものは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

【0019】

上記菌株のうち、IFO番号が記載されているものは、財団法人発酵研究所（日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

【0020】

上記菌株のうち、NBRC番号が記載されているものは、独立行政法人製品評価機構生物遺伝資源部門（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

【0021】

上記の菌株のうち、DSMZ番号が記載されているものは、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

【0022】

エンペドバクター ブレビス ATCC 14234 株 (FERM P-18545 株、FERM BP-8113 株) は、2001年10月1日に独立行政法人産業技術総合

研究所特許微生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6）に寄託され、FERMP-18545の受託番号が付与され、さらに平成14年7月8日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにおいて、ブダペスト条約に基づく寄託へ移管され、FERMBP-8113が付与された微生物である（微生物の表示：Empedobacter brevis AJ-13933株）。

【0023】

スフィンゴバクテリウム エスピー AJ 110003株は、2002年7月22日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、FERMBP-8124の受託番号が付与されている。尚、AJ 110003（FERMBP-8124）は、以下の分類実験により、上述のスフィンゴバクテリウム エスピーであることが同定された。FERMBP-8124株は、桿菌（0.7~0.8×1.5~2.0μm）、グラム陰性、孢子形成なし、運動性なし、コロニー形態は円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、淡黄色、30℃で生育、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、OFテスト（グルコース）陰性の性質より、スフィンゴバクテリウムに属する細菌と同定された。更に、硝酸塩還元陰性、インドール産生陰性、グルコースからの酸生成陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陰性、ウレアーゼ陽性、エスクリン加水分解陽性、ゼラチン加水分解陰性、β-ガラクトシダーゼ陽性、グルコース資化陽性、L-アラビノース資化陰性、D-マンノース資化陽性、D-マンニトール資化陰性、N-アセチル-D-グルコサミン資化陽性、マルトース資化陽性、グルコン酸カリウム資化陰性、n-カプリン酸資化陰性、アジピン酸資化陰性、d1-リンゴ酸資化陰性、クエン酸ナトリウム資化陰性、酢酸フェニル資化陰性、チトクロームオキシダーゼ陽性の性質より、スフィンゴバクテリウム マルチボラムあるいはスフィンゴバクテリウム スピリチボラムの性状に類似することが判明した。更に16SrRNA遺伝子の塩基配列のホモロジー解析の結果、スフィンゴバクテリウム マルチボラムと最も高いホモロジー（98.8%）を示したが、完全に一致する株はなかったことより、本菌株をスフィンゴバクテリウム エスピー（Sphingobacterium sp.）と同定した。

【0024】

（2）微生物の培養

本発明のDNAを有する微生物の培養菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限はなく、通常炭素源、窒素源、リン源、硫黄源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

【0025】

例えば、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭化水素類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

【0026】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

【0027】

他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

【0028】

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にてpH5~8、温度15~40℃の範囲でpHおよび温度を適当に制限しつつ12~48時間程度培養を行えばよい。

【0029】

(3) 酵素の精製

本発明のDNAは、ペプチド生成酵素をコードするDNAである。このペプチド生成酵素は、例えばエンペドバクター属に属する細菌から精製することができる。当該酵素を精製する例として、エンペドバクター プレビスからペプチド生成酵素を単離・精製する方法を説明する。

【0030】

まず、エンペドバクター プレビス、例えばFERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）の菌体から、超音波破碎等の物理的方法、あるいは細胞壁溶解酵素等を用いた酵素法等により菌体を破壊し、遠心分離等により不溶性画分を除いて菌体抽出液を調製する。このようにして得られる菌体抽出液を、通常のタンパク質の精製法、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどを組み合わせて分画することによって、ペプチド生成酵素を精製することができる。

【0031】

陰イオン交換クロマトグラフィー用の担体としては、Q-Sepharose HP（アマシャム社製）が挙げられる。本酵素を含む抽出液をこれらの担体を詰めたカラムに通液させると当該酵素はpH 8.5の条件下で非吸着画分に回収される。

【0032】

陽イオンクロマトグラフィー用担体としては、Mono S HR（アマシャム社製）が挙げられる。本酵素を含む抽出液をこれらの担体を詰めたカラムに通液させて本酵素をカラムに吸着させ、カラムを洗浄した後に、高塩濃度の緩衝液を用いて酵素を溶出させる。その際、段階的に塩濃度を高めてもよく、濃度勾配をかけてもよい。例えば、Mono S HRを用いた場合には、カラムに吸着した本酵素は、0.2～0.5M程度のNaClで溶出される。

【0033】

上記のようにして精製された本酵素は、さらにゲル濾過クロマトグラフィー等により均一に精製できる。ゲル濾過クロマトグラフィー用担体としては、Sephadex 200 pg（アマシャム社製）が挙げられる。

【0034】

上記精製操作において、本酵素を含む画分は、後述する方法等により各画分のペプチド生成活性を測定することにより、確認することができる。上記のようにして精製された本酵素の内部アミノ酸配列を、配列表の配列番号1及び配列番号2に示す。

【0035】

(4) 本発明のDNAおよび形質転換体

(4-1) 本発明のDNA

本発明のDNAである配列番号5に記載の塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNAは、エンペドバクター プレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）より単離されたものである。配列番号5に記載の塩基番号61～1908の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス(CDS)部分である。塩基番号61～1908の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～126の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号127～1908の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号5に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、リーダー配列がコードするリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号127～1908でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

【0036】

本発明のDNAである配列番号11に記載の塩基番号61～1917の塩基配列からなるDNAは、スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）より単離されたものである。配列番号11に記載の塩基番号61～1917の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス（CDS）部分である。塩基番号61～1917の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～120の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号121～1917の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号11に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、当該リーダー配列領域にコードされるリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号121～1917でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

10

【0037】

本発明のDNAである配列番号17に記載の塩基番号61～1935の塩基配列からなるDNAは、ベドバクター ヘバリナス IFO 12017株（寄託機関；財団法人発酵研究所、寄託先住所；日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）より単離されたものである。配列番号17に記載の塩基番号61～1935の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス（CDS）部分である。塩基番号61～1935の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～126の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号127～1935の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号17に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、当該リーダー配列領域にコードされるリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号127～1935でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

20

30

【0038】

本発明のDNAである配列番号22に記載の塩基番号61～1995の塩基配列からなるDNAは、タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116株（寄託機関；Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所；Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany）より単離されたものである。配列番号22に記載の塩基番号61～1995の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス（CDS）部分である。塩基番号61～1995の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～126の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号127～1995の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号22に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、当該リーダー配列領域にコードされるリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号127～1995でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

40

【0039】

50

本発明のDNAである配列番号24に記載の塩基番号29～1888の塩基配列からなるDNAは、サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）より単離されたものである。配列番号24に記載の塩基番号29～1888の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス（CDS）部分である。塩基番号29～1888の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号29～103の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号104～1888の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号24に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、当該リーダー配列領域にコードされるリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号104～1888でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

10

【0040】

本発明のDNAである配列番号26に記載の塩基番号61～1992の塩基配列からなるDNAは、サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）より単離されたものである。配列番号26に記載の塩基番号61～1992の塩基配列からなるDNAは、コードシーケンス（CDS）部分である。塩基番号61～1992の塩基配列には、シグナル配列領域と成熟タンパク質領域とが含まれている。シグナル配列領域は塩基番号61～111の領域であり、成熟タンパク質領域は塩基番号112～1992の領域である。すなわち、本発明は、シグナル配列を含むペプチド酵素タンパク質遺伝子と、成熟したタンパク質としてのペプチド酵素タンパク質遺伝子の双方を提供する。配列番号26に記載の配列に含まれるシグナル配列は、リーダー配列の類であり、当該リーダー配列領域にコードされるリーダーペプチドの主たる機能は、細胞膜内から細胞膜外に分泌させることにありと推定される。塩基番号112～1992でコードされるタンパク質、すなわちリーダーペプチドを除く部位が成熟タンパク質であり、高いペプチド生成活性を示すと推定される。

20

30

【0041】

なお、以下に挙げる種々の遺伝子組換え技法については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)などの記載に準じて行うことができる。

【0042】

本発明のDNAは、エンペドバクター ブレビス、スフィンゴバクテリウム エスピー、ペドバクター ヘパリナス、タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス、サイクロバクテリウム マリナム、もしくはサイクロセルペンス ブルトネンシスの染色体DNA、もしくはDNAライブラリーから、PCR (polymerase chain reaction, White, T. J. et al; Trends Genet., 5, 185 (1989) 参照) またはハイブリダイゼーションによって取得することができる。PCRに用いるプライマーは、上記(3)の欄で説明したようにして精製されたペプチド生成酵素に基づいて決定された内部アミノ酸配列に基づいて設計することができる。また、本発明によりペプチド生成酵素遺伝子（配列番号5、配列番号11、配列番号22、配列番号24および配列番号26）の塩基配列が明らかになったので、これらの塩基配列に基づいてプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを設計することもでき、プローブを使って単離することもできる。PCR用のプライマーとして、5' 非翻訳領域及び3' 非翻訳領域に対応する配列を有するプライマーを用いると、本酵素のコード領域全長を増幅することができる。配列番号5に記載された、リーダー配列および成熟タンパク質

40

50

コード領域の双方を含む領域を増幅する場合を例にとると、具体的には、5'側プライマーとしては配列番号5において塩基番号61よりも上流の領域の塩基配列を有するプライマーが、3'側プライマーとしては塩基番号1908よりも下流の領域の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーが挙げられる。

【0043】

プライマーの合成は、例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて(Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859参照)常法に従って合成できる。PCR反応は、例えばGene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社製)及びTaKaRa LA PCR in vitro Clonin 10
g Kit (宝酒造社製)を用い、各メーカーなど供給者により指定された方法に従って行うことができる。

【0044】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号5に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号5に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。 20

【0045】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号11に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号11に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

【0046】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号17に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号17に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。 30

【0047】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号22に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号22に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。 40

【0048】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号24に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号24に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペ 50

プチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

【0049】

本発明のDNAには、リーダー配列を含む場合および含まない場合のいずれにせよ、配列表の配列番号26に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号26に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

10

【0050】

プローブは、例えば配列番号5に記載の塩基配列に基づいて定法により作製することができる。また、プローブを用いてこれとハイブリダイズするDNAをつくり上げ、目的とするDNAを単離する方法も、定法に従って行えばよい。例えば、DNAプローブはプラスミドやファージベクターにクローニングされた塩基配列を増幅し、プローブとして用いた塩基配列を制限酵素により切り出し、抽出して調製することができる。切り出す箇所は、目的とするDNAに応じて調節することができる。

【0051】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中でストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の発現ベクターにつなぎ、適当な宿主で発現させて、発現産物の酵素活性を後述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

20

【0052】

ただし、上記のようにストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合には、50℃、pH8の条件下で、元となる塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質の半分程度以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。例えば、配列番号5に記載の塩基配列のうち塩基番号127～1908にの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合について説明すると、50℃、pH8の条件下で、配列番号6に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号23～616のアミノ酸配列を有するタンパク質の半分程度以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

30

【0053】

配列表の配列番号5に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号6に示される。配列表の配列番号11に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号12に示される。配列表の配列番号17に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号18に示される。配列表の配列番号22に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号23に示される。配列表の配列番号24に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号25に示される。また、配列表の配列番号26に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号27に示される。

40

【0054】

配列番号6に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質

50

領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～22 までがリーダーペプチドにあたり、23～616 までが成熟タンパク質領域である。また、配列番号 11 に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～20 までがリーダーペプチドにあたり、21～619 までが成熟タンパク質領域である。

【0055】

配列番号 18 に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～22 までがリーダーペプチドにあたり、23～625 までが成熟タンパク質領域である。

【0056】

配列番号 23 に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～22 までがリーダーペプチドにあたり、23～645 までが成熟タンパク質領域である。

10

【0057】

配列番号 25 に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～25 までがリーダーペプチドにあたり、26～620 までが成熟タンパク質領域である。

【0058】

配列番号 27 に記載されたアミノ酸配列の全体には、リーダーペプチドと成熟タンパク質領域が含まれ、アミノ酸残基番号 1～17 までがリーダーペプチドにあたり、18～644 までが成熟タンパク質領域である。

20

【0059】

本発明の DNA によりコードされるタンパク質は、その成熟タンパク質がペプチド生成活性を有するタンパク質である。リーダーペプチドを含むか含まないかに関わらず、配列表の配列番号 6、配列番号 12、配列番号 18、配列番号 23、配列番号 25 もしくは配列番号 27 に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードする DNA も、本発明の DNA に含まれる（なお、ユニバーサルコドンのコードに従ってアミノ酸配列から塩基配列は特定される）。すなわち、本発明により、以下の（A）から（X）に示されるタンパク質をコードする DNA が提供される。

【0060】

（A）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列を有するタンパク質

30

（B）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～616 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

（C）配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（D）配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 21～619 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

（E）配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～625 のアミノ酸配列を有するタンパク質

40

（F）配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～625 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

（G）配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～645 のアミノ酸配列を有するタンパク質

（H）配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 23～645 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

（I）配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 26～620

50

のアミノ酸配列を有するタンパク質

(J) 配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 26 ～ 620 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

(K) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 18 ～ 644 のアミノ酸配列を有するタンパク質

(L) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列のうちアミノ酸残基番号 18 ～ 644 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質

(M) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(N) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

(O) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(P) 配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

(Q) 配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(R) 配列表の配列番号 18 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

(S) 配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(T) 配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

(U) 配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(V) 配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

(W) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(X) 配列表の配列番号 27 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有する成熟タンパク質領域を含むタンパク質

【0061】

ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造や活性を大きく損なわない範囲のものであり、具体的には、2 ～ 50 個、好ましくは 2 ～ 30 個、さらに好ましくは 2 ～ 10 個である。ただし、(B)、(D)、(F)、(H)、(J)、(L)、(N)、(P)、(R)、(T)、(V)、(X) のタンパク質のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位を含むアミノ酸配列の場合には、50℃、pH 8 の条件下で、変異を含まない状態でのタンパク質の半分程度以上、より好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上の酵素活性を保持していることが望ましい。例えば、(B) の場合について説明すると、(B) 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位を含むアミノ酸配列の場合には、50℃、pH 8 の条件下で配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の半分程度以上、より好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

【0062】

上記 (B) などに示されるようなアミノ酸の変異は、例えば部位特異的変異法によって、本酵素遺伝子の特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列

10

20

30

40

50

を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、本酵素をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び本酵素をコードするDNAを保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0063】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、および／または逆位等には、微生物の種あるいは菌株による差等、天然に生じる変異も含まれる。上記のような変異を有するDNAを適当な細胞で発現させ、発現産物の本酵素活性を調べることにより、配列表の配列番号6または12に記載のタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0064】

(4-2) 形質転換体の作製およびペプチド生成酵素の生成

本発明のDNAを適当な宿主に導入し、発現させることによってペプチド生成酵素を生成することができる。

【0065】

本発明のDNAにより特定されるタンパク質を発現させるための宿主としては、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属細菌、エンペドバクター属細菌、スフィンゴバクテリウム属細菌、フラボバクテリウム属細菌、及びバチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピヒア スティピティス (*Pichia stipitis*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) をはじめとする種々の真核細胞を用いることができる。

【0066】

本発明のDNAを宿主に導入するのに用いる組換えDNAは、発現させようとする宿主の種類に応じたベクターに、本発明のDNAを、該DNAがコードするタンパク質が発現可能な形態で挿入することで調製可能である。本発明のDNAを発現させるためのプロモータとしては、エンペドバクター プレビスなどのペプチド生成酵素遺伝子固有のプロモータが宿主細胞で機能する場合には該プロモータを使用することができる。また、必要に応じて宿主細胞で働く他のプロモータを本発明のDNAに連結し、該プロモータ制御下で発現させるようにしてもよい。

【0067】

組換えDNAを宿主細胞に導入するための形質転換法としては、D. M. Morrisonの方法 (*Methods in Enzymology* 68, 326 (1979)) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)) 等が挙げられる。

【0068】

タンパク質を組換えDNA技術を用いて大量生産する場合、該タンパク質を生産する形質転換体内で該タンパク質が会合し、タンパク質の封入体 (inclusion body) を形成させる形態も好ましい一実施形態として挙げられる。この発現生産方法の利点は、目的のタンパク質を菌体内に存在するプロテアーゼによる消化から保護する点および目的のタンパク質を菌体破碎に続く遠心分離操作によって簡単に精製できる点等である。

【0069】

このようにして得られるタンパク質封入体は、タンパク質変性剤により可溶化され、主にその変性剤を除去することによる活性再生操作を経た後、正しく折り畳まれた生理的に活性なタンパク質に変換される。例えば、ヒトインターロイキン-2の活性再生 (特開昭61-257931号公報) 等多くの例がある。

10

20

30

40

50

【0070】

タンパク質封入体から活性型タンパク質を得るためには、可溶化・活性再生等の一連の操作が必要であり、直接活性型タンパク質を生産する場合よりも操作が複雑になる。しかし、菌体の生育に影響を及ぼすようなタンパク質を菌体内で大量に生産させる場合は、不活性なタンパク質封入体として菌体内に蓄積させることにより、その影響を抑えることができる。

【0071】

目的タンパク質を封入体として大量生産させる方法として、強力なプロモータの制御下、目的のタンパク質を単独で発現させる方法の他、大量発現することが知られているタンパク質との融合タンパク質として発現させる方法がある。

10

【0072】

以下、形質転換された大腸菌を作製し、これを用いてペプチド生成酵素を製造する方法を例として、より具体的に説明する。なお、大腸菌などの微生物にペプチド生成酵素を作製させる場合、タンパク質のコード配列として、リーダー配列を含む前駆タンパク質をコードするDNAを組み込んでも、リーダー配列を含まない成熟タンパク質領域のDNAのみを組み込んでもよく、作製しようとする酵素の製造条件、形態、使用条件などにより適宜選択することができる。

【0073】

ペプチド生成酵素をコードするDNAを発現させるプロモータとしては、通常大腸菌における異種タンパク質生産に用いられるプロモータを使用することができ、例えば、T7プロモータ、lacプロモータ、trpプロモータ、trcプロモータ、tacプロモータ、ラムダファージのPRプロモータ、PLプロモータ等の強力なプロモータが挙げられる。また、ベクターとしては、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等を用いることができる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。さらに、プロモータを含み、挿入DNA配列を発現させることができる発現ベクターを使用することもできる。

20

【0074】

ペプチド生成酵素を融合タンパク質封入体として生産させるためには、ペプチド生成酵素遺伝子上流あるいは下流に、他のタンパク質、好ましくは親水性であるペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質遺伝子とする。このような他のタンパク質をコードする遺伝子としては、融合タンパク質の蓄積量を増加させ、変性・再生工程後に融合タンパク質の溶解性を高めるものであればよく、例えば、T7gene 10、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、インターフェロン γ 遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、プロキモシン遺伝子等が候補として挙げられる。

30

【0075】

これらの遺伝子とペプチド生成酵素をコードする遺伝子とを連結する際には、コドンの読み取りフレームが一致するようにする。適当な制限酵素部位で連結するか、あるいは適当な配列の合成DNAを利用すればよい。

【0076】

また、生産量を増大させるためには、融合タンパク質遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネータを連結することが好ましい場合がある。このターミネータとしては、T7ターミネータ、fdファージターミネータ、T4ターミネータ、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネータ、大腸菌trpA遺伝子のターミネータ等が挙げられる。

40

【0077】

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子を大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位などによってプラスミドに

50

改変を施したものを意味する。なお、ここでいう改変とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。

【0078】

また、形質転換体を選別するために、該ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモータを持つ発現ベクターが市販されている（pUC系（宝酒造（株）製）、pPROK系（クローンテック製）、pKK233-2（クローンテック製）ほか）。

【0079】

プロモータ、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子、場合によってはターミネータの順に連結したDNA断片と、ベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。

10

【0080】

該組換えDNAを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養すると、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質が発現生産される。形質転換される宿主は、異種遺伝子の発現に通常用いられる株を使用することができるが、エシェリヒア コリ JM109株が好ましい。形質転換を行う方法、および形質転換体を選別する方法はMolecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）等に記載されている。

【0081】

融合タンパク質として発現させた場合、血液凝固因子Xa、カリクレインなどの、ペプチド生成酵素内に存在しない配列を認識配列とする制限プロテアーゼを用いてペプチド生成酵素を切り出せるようにしてもよい。

20

【0082】

生産培地としては、M9ーカザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカー、プロモータ、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

【0083】

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質を回収するには、以下の方法などがある。ペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質が菌体内に可溶化されていれば、菌体を回収した後、菌体を破碎あるいは溶菌させ、粗酵素液として使用できる。さらに、必要に応じて、通常の沈澱、濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法によりペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質を精製して用いることも可能である。この場合、ペプチド生成酵素あるいは融合タンパク質の抗体を利用した精製法も利用できる。

30

【0084】

タンパク質封入体が形成される場合には、変性剤でこれを可溶化する。菌体タンパク質とともに可溶化してもよいが、以降の精製操作を考慮すると、封入体を取り出して、これを可溶化するのが好ましい。封入体を菌体から回収するには、従来公知の方法で行えばよい。例えば、菌体を破壊し、遠心分離操作等によって封入体を回収する。タンパク質封入体を可溶化させる変性剤としては、グアニジン塩酸（例えば、6M、pH5～8）や尿素（例えば8M）などが挙げられる。

40

【0085】

これらの変性剤を透析等により除くと、活性を有するタンパク質として再生される。透析に用いる透析溶液としては、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などを用いればよく、濃度としては20mM～0.5M、pHとしては5～8が挙げられる。

【0086】

再生工程時のタンパク質濃度は、500μg/ml程度以下に抑えるのが好ましい。再生したペプチド生成酵素が自己架橋を行うのを抑えるために、透析温度は5℃以下であることが好ましい。また、変性剤除去の方法として、この透析法のほか、希釈法、限外濾過

50

法などがあり、いずれを用いても活性の再生が期待できる。

【0087】

(5) 本発明のDNAでコードされる酵素の性質

本発明のDNAがコードする酵素の活性は、例えばアミノ酸エステルとアミンを基質として含むホウ酸緩衝液中で反応させ、生成したペプチドを定量することにより測定できる。より具体的な例としては、L-アラニンメチルエステル 100mM、L-グルタミン 200mMを含む100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)を用いて、25℃で数分反応させる方法が挙げられる。

【0088】

本発明に用いられる酵素の活性単位については、L-アラニンメチルエステル 100mM、L-グルタミン 200mMを含む100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)を用いて、25℃で反応させた条件で、1分間に1μmolのペプチドを生成する酵素量を1単位(U)と定義した。

【0089】

本発明のDNAでコードされるタンパク質は、ペプチド生成酵素タンパク質である。ペプチド生成活性とは、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する活性のことをいう。以下、本発明のDNAでコードされる酵素の好ましい形態について、その性質面から説明する。

【0090】

本発明のDNAでコードされる酵素の好ましい一形態として、ジペプチドの生成速度を1つの指標とした、下記のような能力を有する酵素が挙げられる。すなわち、本発明の酵素の好ましい一形態として、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する能力を有し、下記(i)～(iv)の条件下におけるジペプチド合成反応において、L-アラニン-L-グルタミンの生成速度が、好ましくは0.03mM/分以上、より好ましくは0.3mM/分以上、特に好ましくは1.0mM/分以上となる能力を有する酵素が挙げられる。ジペプチド合成反応の条件は次のとおりである。

【0091】

(i) 前記カルボキシ成分が、L-アラニンメチルエステル塩酸塩(100mM)

(ii) 前記アミン成分が、L-グルタミン(200mM)

(iii) pHが、9.0

(iv) 酵素添加量が、タンパク量として0.61mg/ml未満

【0092】

上記のような生成速度は、酵素を用いたペプチド合成のこれまでの常識を遙かに上回るものであり、本発明の酵素は極めて高速にペプチド合成を触媒する能力を有するものである。

【0093】

上記酵素添加量とは、反応系に添加する酵素の終末添加量を示し、タンパク量として0.01mg/ml以上、好ましくは0.02mg/ml以上の添加がのぞましい。「タンパク量として」とは、プロテインアッセイCBB溶液(ナカライ製)を用い、牛血清アルブミンを標準物質としたクマシーブリリアントブルーによる発色法で示した値を用いた。

【0094】

酵素活性の測定についてより具体的な例を挙げると、アミノ酸エステルとアミンを基質として含むホウ酸緩衝液中で反応させ、生成したペプチドを定量することにより測定できる。さらに具体的な例としては、L-アラニンメチルエステル 100mM、L-グルタミン 200mMを含む100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)を用いて、25℃で数分反応させる方法が挙げられる。

【0095】

また、本発明のDNAでコードされる酵素として好ましいものの一形態には、カルボキシ成分として、アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る性質を有する酵素が挙げられる。「アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る」

というのは、アミノ酸エステルの少なくとも1種以上およびアミノ酸アミドの少なくとも1種以上を基質とし得ることを意味する。また、本発明の酵素として好ましいものの一形態には、アミン成分として、アミノ酸、C保護アミノ酸、アミンのいずれをも基質とし得る性質を有する酵素が挙げられる。「アミノ酸、C保護アミノ酸、アミンのいずれをも基質とし得る」というのは、アミノ酸の少なくとも1種以上、C保護アミノ酸の少なくとも1種以上、および、アミンの少なくとも1種以上を基質とし得ることを意味する。カルボキシ成分またはアミン成分について幅広い基質特異性を有することは、工業生産の場におけるコスト、生産設備などの点で都合のよい原料の選択性が広がるという点で好ましい。

【0096】

カルボキシ成分の具体例を挙げると、例えば、L-アミノ酸エステル、D-アミノ酸エステル、L-アミノ酸アミド、D-アミノ酸アミドなどが挙げられる。また、アミノ酸エステルには、天然型のアミノ酸に対応するアミノ酸エステルだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応するアミノ酸エステルもある。また、アミノ酸エステルとしては、 α -アミノ酸エステルの他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、または、 ω -等のアミノ酸のエステルもある。アミノ酸エステルの代表例としては、アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、*n*-プロピルエステル、*iso*-プロピルエステル、*n*-ブチルエステル、*iso*-ブチルエステル、または、*tert*-ブチルエステルなどが挙げられる。

【0097】

アミン成分の具体例を挙げると、例えば、L-アミノ酸、C保護L-アミノ酸、D-アミノ酸、C保護D-アミノ酸、または、アミン等が例示される。また、アミンとしては、天然型アミンだけでなく、非天然型のアミンもしくはその誘導体なども例示される。また、アミノ酸としては、天然型アミノ酸だけではなく非天然型アミノ酸もしくはその誘導体も例示される。 α -アミノ酸の他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸なども例示される。

【0098】

また、更に別の側面として、本発明のDNAでコードされる酵素として好ましいものの一形態には、ペプチド生成反応における触媒可能なpHの範囲が6.5~10.5の範囲である酵素が挙げられる。このように広いpH範囲で触媒可能であることは、様々な制約が生じ得る工業的生産において柔軟な対応が可能であるという点で好ましい。ただし、実際にペプチドを生産するにあたっては、酵素の触媒性能を最大限に引き出すように、取得された酵素に応じてさらに至適pHに調整して用いることが好ましい。

【0099】

また、更に別の側面として、本発明のDNAでコードされる酵素として好ましいものの一形態には、ペプチド生成反応における触媒可能な温度条件が0~60℃の範囲である酵素が挙げられる。このように広い温度範囲で触媒可能であることは、様々な制約が生じ得る工業的生産において柔軟な対応が可能であるという点で好ましい。ただし、実際にペプチドを生産するにあたっては、酵素の触媒性能を最大限に引き出すように、取得された酵素に応じてさらに至適温度に調整して用いることが好ましい。

【0100】

(6) ジペプチドの製造方法

本発明のジペプチドを製造する方法では、所定の酵素の存在下でカルボキシ成分とアミン成分とを反応させる。すなわち、本発明のジペプチドの製造方法は、カルボキシ成分とアミン成分とからペプチドを生成する能力を有する酵素または当該酵素を含む含有物を、カルボキシ成分とアミン成分とに作用させ、ジペプチドを合成せしめるものである。

【0101】

本発明に使用する酵素または酵素含有物を、カルボキシ成分とアミン成分に作用せしめる方法としては、当該酵素または酵素含有物、カルボキシ成分、およびアミン成分を混合すればよい。より具体的には、酵素または酵素含有物をカルボキシ成分とアミン成分を含む溶液中に添加して反応せしめる方法を用いてもよいし、当該酵素を生産する微生物を用

10

20

30

40

50

いる場合には、当該酵素を生産する微生物を培養し、微生物中または微生物の培養液中に当該酵素を生成・蓄積せしめ、培養液中にカルボキシ成分とアミン成分を添加する方法などを用いてもよい。生成されたジペプチドは、定法により回収し、必要に応じて精製することができる。

【0102】

「酵素含有物」とは、当該酵素を含有するものであればよく、具体的形態としては、当該酵素を生産する微生物の培養物、当該培養物から分離された微生物菌体、菌体処理物などが含まれる。微生物の培養物とは、微生物を培養して得られる物のことであり、より具体的には、微生物菌体、その微生物の培養に用いた培地および培養された微生物により生成された物質の混合物などのことをいう。また、微生物菌体は洗浄し、洗浄菌体として用いてもよい。また、菌体処理物には、菌体を破碎、溶菌、凍結乾燥したものなどが含まれ、さらに菌体などを処理して回収される粗酵素、さらに精製した精製酵素なども含まれる。精製処理された酵素としては、各種精製法によって得られる部分精製酵素等を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化酵素を使用してもよい。また、使用する微生物によっては、培養中に一部、溶菌するものもあるので、この場合には培養液上清も酵素含有物として利用できる。

10

【0103】

また、当該酵素を含む微生物としては野生株を用いても良いし、本酵素を発現した遺伝子組換え株を用いてもよい。当該微生物としては、酵素微生物菌体に限らず、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体等の菌体処理物を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化菌体、固定化菌体処理物を使用してもよい。

20

【0104】

なお、培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破碎あるいは溶菌させた菌体処理物を用いる場合には、ペプチドの生成に関与せずに生成ペプチドを分解する酵素が存在することが多く、この場合には、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような金属プロテアーゼ阻害剤を添加するほうが好ましい場合がある。添加量は、0.1 mMから300 mMの範囲で、好ましくは1 mMから100 mMである。

【0105】

本発明のジペプチド製造方法の好ましい形態としては、上記（4-2）に記載した形質転換細胞を培地中で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、ペプチド生成酵素を蓄積させる方法が挙げられる。形質転換体を用いることにより、ペプチド生成酵素を簡便に大量生成できるため、ジペプチドの生成も大量に速く行うことができる。

30

【0106】

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、例えば酵素を用いる場合には、0.01から100ユニット（U）程度、洗浄菌体を用いる場合は1～500 g/L程度である。

【0107】

カルボキシ成分としては、もう一つの基質であるアミン成分と縮合してペプチドを生成できるものであれば、いかなるものを使用してよい。カルボキシ成分としては、例えば、L-アミノ酸エステル、D-アミノ酸エステル、L-アミノ酸アミド、D-アミノ酸アミド、更にはアミノ基の有さない有機酸エステル等が挙げられる。また、アミノ酸エステルとしては、天然型のアミノ酸に対応するアミノ酸エステルだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応するアミノ酸エステルなども例示される。また、アミノ酸エステルとしては、 α -アミノ酸エステルその他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸のエステルなども例示される。アミノ酸エステルの代表例としては、アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、iso-プロピルエステル、n-ブチルエステル、iso-ブチルエステル、tert-ブチルエステル等が例示される。

40

【0108】

50

アミン成分としては、もう一つの基質であるカルボキシ成分と縮合してペプチドを生成できるものであれば、いかなるものも使用してよい。アミン成分としては、例えば、L-アミノ酸、C保護L-アミノ酸、D-アミノ酸、C保護D-アミノ酸、アミン等が挙げられる。また、アミンとしは、天然型アミンだけでなく、非天然型のアミンもしくはその誘導体などが例示される。また、アミノ酸としては、天然型アミノ酸だけではなく非天然型アミノ酸もしくはその誘導体も例示される。 α -アミノ酸の他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸なども例示される。

【0109】

出発原料であるカルボキシ成分およびアミン成分の濃度は各々1 mM~10 M、好ましくは0.05 M~2 Mであるが、カルボキシ成分に対してアミン成分を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応中にこれらを阻害しない濃度にして逐次添加することができる。

【0110】

反応温度は0~60℃でペプチド合成可能であり、好ましくは5~40℃である。また反応pHはpH6.5~10.5でペプチド合成可能であり、好ましくはpH7.0~10.0である。

【実施例】

【0111】

以下、実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。生成物の測定には、薄層クロマトグラムのニンヒドリン発色での確認(定性)に加え、定量的には以下に示す高速液体クロマトグラフィーにて定量した。カラム: Inertsil ODS-2 (GLサイエンス社製)、溶離液: 5.0 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含むリン酸水溶液(pH2.1): メタノール=100:15~50、流量: 1.0 mL/min、検出210 nm。

【0112】

(実施例1) 微生物の培養 (Empedobacter brevis FERM BP-8113)

1 L中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 gを含む培地(pH6.2) 50 mLを500 mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌した。これに同培地で30℃、16時間培養したエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株(寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所; 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日; 2002年7月8日)を1白金耳接種し、30℃、120往復/分で16時間振盪培養を行った。

【0113】

(実施例2) 微生物菌体を用いるペプチドの生産

実施例1で得られた培養液を遠心分離(10,000 rpm, 15分)し菌体を集め、10 mM EDTAを含む100 mMホウ酸緩衝液(pH9.0)に100 g/Lになるように懸濁した。懸濁液1 mLを、EDTA 10 mMと下記のカルボキシ成分 200 mMと、下記のアミノ酸400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液(pH9.0) 1 mLにそれぞれ添加し、全量を2 mLとした後、18℃にて2時間反応をおこなった。この結果、生成したペプチドを表1に示した。

【0114】

【表 1】

表 1

カルボキシ 成分	アミン 成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ 成分	アミン 成分	生成ペプチド (mM)	
L-Ala-OMe	L-Leu	L-Ala-L-Leu	38.2	Gly-OMe	L-His	L-Gly-L-His	22.1
	L-Met	L-Ala-L-Met	68.3	L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	29.0
	L-Phe	L-Ala-L-Phe	62.4	L-Val-OMe	L-Met	L-Val-L-Met	10.5
	L-Ser	L-Ala-L-Ser	51.3	L-Met-OMe	L-Phe	L-Met-L-Phe	28.5
	L-His	L-Ala-L-His	52.1	L-Thr-OMe	L-Leu	L-Thr-L-Leu	23.0
	L-Arg	L-Ala-L-Arg	72.1	L-Ile-OMe	L-Met	L-Ile-L-Met	8.3
	L-Gln	L-Ala-L-Gln	68.0				

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0115】

(実施例 3) 酵素の精製 (*Empedobacter brevis* FERM BP-8113)

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは 4℃にて行った。実施例 1 と同様に、*Empedobacter brevis* FERM BP-8113 株 (寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、国際寄託移管日；2002 年 7 月 8 日) を培養し、遠心分離 (10,000 rpm, 15 分) によって菌体を集めた。菌体 16 g を 50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて洗浄後、同緩衝液 40 ml に懸濁し、195 W にて 45 分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離 (10,000 rpm, 30 分) し、破碎菌体片を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を 50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して一夜透析し、超遠心分離 (50,000 rpm, 30 分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分をトリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて予め平衡化した Q-Sepharose HP カラム (アマシャム社製) に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に対して一夜透析し、遠心分離 (10,000 rpm, 30 分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として透析画分を得た。この透析画分を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で予め平衡化した Mono S カラム (アマシャム社製) に供し、0~1 M NaCl を含む同緩衝液の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分の内、夾雑タンパクの最も少ない一画分を 1 M NaCl を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で予め平衡化した Superdex 200 pg カラム (アマシャム社製) に供し、1 M NaCl を含む同緩衝液 (pH 4.5) を流すことによりゲル濾過を行い、活性画分溶液を得た。これらの操作により、本発明に使用されるペプチド生成酵素は電気泳動の実験結果より均一に精製されたことが確認された。上記の精製工程における活性の回収率は 12.2%、精製度は 707 倍であった。

【0116】

(実施例 4) 酵素の分子量測定

(SDS-ゲル電気泳動)

実施例 3 の方法により得られた精製酵素画分 0.3 μg 相当をポリアクリルアミド電気泳動に供した。電気泳動緩衝液には 0.3% (w/v) トリス、1.44% (w/v) グリシン、0.1% (w/v) ラウリル硫酸ナトリウムを、ポリアクリルアミドゲルはゲル濃度 10~20% の濃度勾配ゲル (マルチゲル 10-20、第一化学薬品製)、分子量マ

ーカーはファルマシア製分子量マーカーを用いた。電気泳動終了後、クーマシーブリリアントブルーR-250によってゲルを染色し、分子量約75kDa位置に均一なバンドが検出された。

【0117】

(ゲル濾過)

実施例3の方法により得られた精製酵素画分を1M NaClを含む50mM酢酸緩衝液(pH4.5)で予め平衡化したSuperdex 200pgカラム(アマシャム社製)に供し、1M NaClを含む同緩衝液(pH4.5)を流すことによりゲル濾過を行い、分子量を測定した。検量線を作成するための分子量既知の標準タンパクとしてはファルマシア製分子量マーカーを用いた。この結果、得られた酵素の分子量は約150kDaであった。

10

【0118】

SDS-ゲル電気泳動とゲル濾過の結果より、本酵素は分子量約75kDaのホモダイマーであることが示唆された。

【0119】

(実施例5) 酵素の至適pH

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンからL-アラニル-L-グルタミンを生成する反応におけるpHの影響を検討した。緩衝液としては、酢酸緩衝液(pH3.9~5.4)MES緩衝液(pH5.4~6.4)、リン酸緩衝液(pH6.0~7.9)ホウ酸緩衝液(pH7.8~9.3)、CAPS緩衝液(pH9.3~10.7)、およびK₂HPO₄-NaOH緩衝液(pH10.8~11.6)を用いた。100mM L-アラニンメチルエステル、200mM L-グルタミン、10mMのEDTAを含む100mMのそれぞれの緩衝液100μlに実施例3で得られたMonoS画分酵素(約180U/ml)を1μl加え、18℃、5分間反応させ、反応に対するpHの影響を測定した。ホウ酸緩衝液(pH9.3)を用いた場合の活性を100%とした結果を第1図に示した。この結果、本酵素の至適pHは8~9.5であった。

20

【0120】

(実施例6) 酵素の至適温度

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンからL-アラニル-L-グルタミンを生成する反応における温度の影響を検討した。100mM L-アラニンメチルエステル、200mM L-グルタミン、10mM EDTAを含む100mMのホウ酸緩衝液(pH9.0)100μlに実施例5で用いたものと同じ酵素画分を1μl加え、各温度にて5分間反応させ、反応に対する温度の影響を測定した。34℃での活性を100%とした結果を第2図に示した。この結果、本酵素の至適温度は30~40℃であった。

30

【0121】

(実施例7) 酵素の阻害剤

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質に用い、L-アラニル-L-グルタミン生成に与える阻害剤の影響を検討した。表2に示す10mMの各種酵素阻害剤を含む100mMのホウ酸緩衝液(pH9.0)50μlに実施例5で用いたものと同じ酵素画分2μlを加え、25℃にて5分間反応させた。尚、オ-フェナンスロリン、フェニルメチルスルフォニルフルオリド、p-ニトロフェニル-p'-グアニジノベンゾエートについては50mMになるようにメタノールに溶解したものを使用した。各条件での酵素活性は酵素阻害剤を加えない条件でのL-アラニル-L-グルタミン生成を100とした場合の相対活性で示した。結果を表2に示す。この結果、本酵素は、セリン酵素阻害剤の内、フェニルメチルスルフォニルフルオリドでは阻害されないが、p-ニトロフェニル-p'-グアニジノベンゾエートで阻害される性質を示した。

40

【0122】

【表 2】

表 2

酵素阻害剤		L-Ala-L-Gln生成相 対活性 (%)
なし		100
金属酵素阻害剤	E D T A	96
	o-フェナンスロリン	96
S H酵素阻害剤	N-エチルマレイミド	110
	モノヨード酢酸	101
セリン酵素阻害 剤	フェニルメチルスルフォニル フルオリド	115
	4-(2-アミノエチル)ベンゼンス ルフォニルフルオリド	75
	p-ニトロフェニル p'-グアニ ジノベンゾエート	0.1

10

20

【0123】

(実施例 8) L-アラニンメチルエステルと L-グルタミンからの L-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 3 μ l を、100 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、200 mM の L-グルタミン、10 mM の E D T A を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l に加え、18 $^{\circ}$ C にて反応した。この結果、第 3 図に示すように、酵素添加区では、反応 60 分で 83 mM の L-アラニル-L-グルタミン (L-Ala-L-Gln) が生成し、副成する L-Ala-L-Ala-L-Gln は 1.3 mM であった。一方、酵素無添加区での L-Ala-L-Gln 生成はほとんど認められず、反応 120 分で 0.07 mM 程度であった。

30

【0124】

(実施例 9) L-アラニル-L-グルタミンの生産に与える L-グルタミン濃度の影響

実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 1 μ l を、100 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、表 3 に示す濃度の L-グルタミン、10 mM の E D T A を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l に加え、18 $^{\circ}$ C にて 2 時間反応した。この結果を表 3 に示した。

【0125】

【表 3】

表 3

L-アラニンメチルエステル塩酸塩 (mM)	L-グルタミン (mM)	L-Ala-L-Gln (mM)
100	100	68.2
	110	72.1
	120	73.3
	130	75.1
	150	75.5
	200	82.0

10

【0126】

(実施例10) 酵素の基質特異性 (1)

カルボキシ成分としてL-アミノ酸エステルを用いた場合のエステル特異性を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表4に示す100mMのカルボキシ成分、200mM L-グルタミン、10mMのEDTAを含む100mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ lに加え、25 $^{\circ}$ Cにて2時間反応した。この反応で生成したL-Ala-L-Gln量を表4に示した (表4中、HClは塩酸塩を示す)。

20

【0127】

【表 4】

表 4

カルボキシ成分	生成L-Ala-L-Gln (mM)
L-アラニンメチルエステル・HCl	84.3
L-アラニンエチルエステル・HCl	91.5
L-アラニンイソプロピルエステル・HCl	78.9
L-アラニン- <i>t</i> -ブチルエステル・HCl	7.5

30

【0128】

(実施例11) 酵素の基質特異性 (2)

カルボキシ成分にL-アラニンメチルエステル、アミン成分に各種のL-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、100mMのL-アラニンメチルエステル塩酸塩、150mMの表5に示すL-アミノ酸、10mMのEDTAを含む100mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ lに加え、25 $^{\circ}$ Cにて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表5に示した (+印は、ペプチドの生成は確認されているが、標準品がなく定量できなかったもの、trは微量を示す)。

40

【0129】

【表 5】

表 5

アミン成分	生成ペプチド (mM)		アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly	L-Ala-Gly	13.7	L-Asn	L-Ala-L-Asn	65.5
L-Ala	L-Ala-L-Ala	25.4	L-Gln	L-Ala-L-Gln	79.3
L-Val	L-Ala-L-Val	20.8	L-Tyr	L-Ala-L-Tyr	17.6
L-Leu	L-Ala-L-Leu	45.3	L-CySH	L-Ala-L-CySH	+
L-Ile	L-Ala-L-Ile	33.9	L-Lys	L-Ala-L-Lys	71.8
L-Met	L-Ala-L-Met	83.3	L-Arg	L-Ala-L-Arg	88.0
L-Phe	L-Ala-L-Phe	74.4	L-His	L-Ala-L-His	66.9
L-Trp	L-Ala-L-Trp	53.9	L-Asp	L-Ala-L-Asp	2.1
L-Ser	L-Ala-L-Ser	62.5	L-Glu	L-Ala-L-Glu	42.9
L-Thr	L-Ala-L-Thr	53.9	L-Pro	L-Ala-L-Pro	tr

10

【0130】

(実施例 12) 酵素の基質特異性 (3)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸メチルエステル、アミン成分に L-グルタミンを用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 6 に示す 100 mM の L-アミノ酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe $\cdot$ HCl)、150 mM の L-グルタミン、10 mM の EDTA を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 6 に示した (+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成は確認されているもの、tr は微量を示す)。尚、L-Trp-OMe、L-Tyr-OMe を用いた場合には、反応系に Tween-80 を終末 0.1 % になるように添加した。

20

【0131】

【表 6】

表 6

カルボキシ成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	Gly-L-Gln	54.7	L-Tyr-OMe	L-Tyr-L-Gln	3.4
L-Ala-OMe	L-Ala-L-Gln	74.6	CySH-OMe	L-CySH-L-Gln	+
L-Val-OMe	L-Val-L-Gln	15.4	L-Lys-OMe	L-Lys-L-Gln	+
L-Leu-OMe	L-Leu-L-Gln	+	L-Arg-OMe	L-Arg-L-Gln	7.1
L-Ile-OMe	L-Ile-L-Gln	8.4	L-His-OMe	L-His-L-Gln	+
L-Met-OMe	L-Met-L-Gln	12.0	L-Asp- α -OMe	α -L-Asp-L-Gln	tr
L-Phe-OMe	L-Phe-L-Gln	0.9	L-Asp- β -OMe	β -L-Asp-L-Gln	tr
L-Trp-OMe	L-Trp-L-Gln	+	L-Glu- α -OMe	α -L-Glu-L-Gln	+
L-Ser-OMe	L-Ser-L-Gln	24.0	L-Glu- γ -OMe	γ -L-Glu-L-Gln	+
L-Thr-OMe	L-Thr-L-Gln	81.9	L-Pro-OMe	L-Pro-L-Gln	2.2
L-Asn-OMe	L-Asn-L-Gln	+			
L-Gln-OMe	L-Gln-L-Gln	0.3			

30

40

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

50

【0132】

(実施例13) 酵素の基質特異性 (4)

カルボキシ成分に各種のL-アミノ酸メチルエステル、アミン成分に各種のL-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表7に示す100mMのL-アミノ酸メチルエステル塩酸塩(AA-OMe $\cdot$ HCl)、表7に示す150mMの各種L-アミノ酸、10mMのEDTAを含む100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)100 μ lに加え、25 $^{\circ}$ Cにて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表7に示した(trは微量を示す)。尚、L-Trp-OMeを用いた場合には、反応系にTween-80を終末0.1%になるように添加した(+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成が確認されているものを示す)。

【0133】

【表7】

表7

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)	カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
Gly-OMe	L-CySH	Gly-L-CySH	45.6	L-Met-OMe	L-Ser	L-Met-L-Ser	12.8
	L-Arg	Gly-L-Arg	25.5		L-Met	L-Met-L-Met	25.0
	L-Phe	Gly-L-Phe	44.0		L-Phe	L-Met-L-Phe	34.0
	L-His	Gly-L-His	31.6	L-Ile-OMe	L-Ser	L-Ile-L-Ser	17.2
	L-Lys	Gly-L-Lys	9.8		L-Met	L-Ile-L-Met	10.0
	L-Ser	Gly-L-Ser	44.2		L-Phe	L-Ile-L-Phe	5.2
L-Thr-OMe	Gly	L-Thr-Gly	9.4	L-Arg-OMe	L-Ser	L-Arg-L-Ser	3.6
	L-Ala	L-Thr-L-Ala	9.4		L-Met	L-Arg-L-Met	0.7
	L-Val	L-Thr-L-Val	0.7		L-Phe	L-Arg-L-Phe	1.9
	L-Leu	L-Thr-L-Leu	28.4	L-Leu-OMe	L-Met	L-Leu-L-Met	12.2
	L-Met	L-Thr-L-Met	38.6	L-Trp-OMe	L-Met	L-Trp-L-Met	4.1
	L-Ser	L-Thr-L-Ser	58.2	L-Lys-OMe	L-Met	L-Lys-L-Met	6.8
L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	38.0	L-His-OMe	L-Met	L-His-L-Met	6.5
	L-Met	L-Ser-L-Met	12.5	L-Asn-OMe	L-Glu	L-Asn-L-Glu	10.2
	L-Phe	L-Ser-L-Phe	20.3				
L-Val-OMe	L-Ser	L-Val-L-Ser	30.8				
	L-Met	L-Val-L-Met	10.3				
	L-Phe	L-Val-L-Phe	6.1				

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0134】

(実施例14) 酵素の基質特異性 (5)

カルボキシ成分に各種のL-またはD-体のアミノ酸メチルエステル、アミン成分に各種のL-またはD-体のアミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表8に示す100mMのアミノ酸メチルエステル塩酸塩(AA-OMe $\cdot$ HCl)、表8に示す150mMの各種アミノ酸、10mMのEDTAを含む100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)100 μ lに加え、25 $^{\circ}$ Cにて3時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表8に示した(trは微量を示す)。

。

【 0 1 3 5 】

【 表 8 】

表 8

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
D-Ala-OMe	L-Gln	D-Ala-L-Gln	69.3
D-Ala-OMe	L-Ser	D-Ala-L-Ser	20.3
D-Thr-OMe		D-Thr-L-Ser	1.0
D-Ser-OMe		D-Ser-L-Ser	3.3
D-Val-OMe		D-Val-L-Ser	0.6
D-Met-OMe		D-Met-L-Ser	5.1
L-Ala-OMe	D-Gln	L-Ala-D-Gln	0.3
L-Ala-OMe	D-Ser	L-Ala-D-Ser	5.4
L-Thr-OMe		L-Thr-D-Ser	6.9
L-Ser-OMe		L-Ser-D-Ser	16.2
L-Val-OMe		L-Val-D-Ser	1.4
L-Met-OMe		L-Met-D-Ser	1.9
D-Ala-OMe	D-Gln	D-Ala-D-Gln	tr
D-Ala-OMe	D-Ser	D-Ala-D-Ser	0.2
D-Thr-OMe		D-Thr-D-Ser	1.1
D-Ser-OMe		D-Ser-D-Ser	2.5
D-Val-OMe		D-Val-D-Ser	0.5
D-Met-OMe		D-Met-D-Ser	2.7

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【 0 1 3 6 】

(実施例 15) 酵素の基質特異性 (6)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸アミド、アミン成分に各種の L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 9 に示す 100 mM の L-アミノ酸アミド ($AA-NH_2 \cdot HCl$)、表 9 に示す 150 mM の L-アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l に加え、25 $^{\circ}C$ にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 9 に示した。

【 0 1 3 7 】

【表 9】

表 9

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Phe-NH ₂	L-Gln	L-Phe-L-Gln	0.2
L-Phe-NH ₂	L-Ser	L-Phe-L-Ser	0.6
L-Ala-NH ₂	L-Gln	L-Ala-L-Gln	7.6
L-Ala-NH ₂	L-Met	L-Ala-L-Met	3.4
L-Ala-NH ₂	L-His	L-Ala-L-His	3.9
L-Thr-NH ₂	L-Gln	L-Thr-L-Gln	0.3

10

【0138】

(実施例16) 酵素の基質特異性 (7)

カルボキシ成分に各種の L-アラニンメチルエステル、アミン成分に C 保護 L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分 2 μl を、表10に示す 100 mM の L-アラニン酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe · HCl)、表10に示す 150 mM の L-アミノ酸アミド、10 mM の EDTA を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μl に加え、25 °C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表10に示した。

20

【0139】

【表 10】

表 10

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Ala-OMe	Gly-NH ₂	L-Ala-Gly-NH ₂	7.4
	L-Ala-NH ₂	L-Ala-L-Ala-NH ₂	8.3
	L-Phe-NH ₂	L-Ala-L-Phe-NH ₂	12.2

30

【0140】

(実施例17) 酵素の基質特異性 (8)

カルボキシ成分に各種のアミノ酸メチルエステル、アミン成分にメチルアミンを用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分 2 μl を、表11に示す 100 mM のアミノ酸メチルエステル (AA-OMe · HCl)、表11に示す 150 mM のメチルアミン、10 mM の EDTA を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μl に加え、25 °C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表11に示した。

【0141】

【表 11】

40

表 11

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
Gly-OMe	メチルアミン	Gly-メチルアミン	1.1
L-Thr-OMe		L-Thr-メチルアミン	0.2
L-Ala-OMe		L-Ala-メチルアミン	0.3

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0142】

50

（実施例 18）酵素の基質特異性（9）

カルボキシ成分として β -アミノ酸エステル、あるいはアミン成分として β -アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 12 に示す 100 mM のカルボキシ成分、表 12 に示す 150 mM のアミン成分、10 mM の EDTA を含む 100 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.0）100 μ l に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 12 に示した（tr は微量を示す）。

【0143】

【表 12】

表 12

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
Gly-OMe	β -Ala	Gly- β -Ala	2.2
Gly-OMe	β -Phe	Gly- β -Phe	0.4
L-Ala-OMe	β -Ala	Ala- β -Ala	7.7
L-Ala-OMe	β -Phe	Ala- β -Phe	1.4
L-Thr-OMe	β -Ala	Thr- β -Ala	3.2
L-Thr-OMe	β -Phe	Thr- β -Phe	1.4
β -Ala-OMe	L- α -Ala	β -Ala-L- α -Ala	tr
β -Ala-OMe	β -Ala	β -Ala- β -Ala	0.2
β -Ala-OMe	L-Gln	β -Ala-L-Gln	0.6
β -Ala-OMe	L-Ser	β -Ala-L-Ser	3.2

【0144】

（実施例 19）酵素の基質特異性（10）

カルボキシ成分として L-アミノ酸エステル、アミン成分としてペプチドを用いた場合のオリゴペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 13 に示す 100 mM のカルボキシ成分、表 13 に示す 150 mM のアミン成分、10 mM の EDTA を含む 100 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.0）100 μ l に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 13 に示した。この結果、本酵素はジペプチド生産のみならず、アミン成分としてペプチドを用いることにより、鎖長の長いペプチドも生産できることが明らかとなった。

【0145】

以上実施例 9～19 に示されるように、エンペドバクター プレビス FERMP-18545 株から得られた本酵素が、極めて基質特異性の広い酵素であることが判明した。

【0146】

10

20

30

【表 1 3】

表 1 3

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Ala-OMe	L-Ala	L-Ala-L-Ala	28.7
	L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala	57.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	44.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	34.8
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	1.4*
	L-Ala-L-Gln	L-Ala-L-Ala-L-Gln	15.2
	Gly-L-Ala	L-Ala-Gly-L-Ala	25.9
	Gly-Gly	L-Ala-Gly-Gly	41.7
	L-His-L-Ala	L-Ala-L-His-L-Ala	55.9
	L-Leu-L-Ala	L-Ala-L-Leu-L-Ala	48.3
	L-Phe-L-Ala	L-Ala-L-Phe-L-Ala	49.7
	L-Phe-Gly	L-Ala-L-Phe-Gly	43.7
Gly-OMe	L-Ala-L-Tyr	Gly-L-Ala-L-Tyr	1.7
	Gly-L-Gln	Gly-Gly-L-Gln	7.2
	Gly-L-Tyr-L-Ala	Gly-Gly-L-Tyr-L-Ala	44.2
L-Thr-OMe	Gly-Gly	L-Thr-Gly-Gly	83.0

(* L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Alaの溶解度が低かったので、この系

ではカルボキシ成分 10 mM、アミン成分 15 mMの濃度を用いた。

他の条件は実施例の説明と同じ)

【0147】

(実施例 20) 既存酵素とのペプチド生成触媒能力の比較

本酵素のペプチド生成能力を既存酵素と比較した。既存酵素としては、EP 278787A1 記載のカルボキシペプチダーゼ Y、EP 359399B1 記載のチオールエンドペプチダーゼ (フィシン、パバイン、プロメライン、キモパバイン) を用い、これらについては、シグマ社製の精製酵素を使用した。本酵素源としては実施例 3 で均一に精製した酵素を使用した。これら酵素は、タンパク量として表 14 に示す量を反応系に添加した。反応は、100 mM L-アラニンメチルエステルと 200 mM L-グルタミンを含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25 $^{\circ}$ C にて反応した。尚、カルボキシペプチダーゼは、1 mM の EDTA を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で溶解した酵素、チオールエンドペプチダーゼは、2 mM EDTA、0.1 M KCl、5 mM ジチオスレイトールを含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で溶解した酵素を用いた。これら酵素による L-アラニル-L-グルタミンの生成速度比を表 14 に示した。

【0148】

この結果、酵素無添加でも、ごく微量の L-アラニル-L-グルタミン生成が観察され、カルボキシペプチダーゼあるいはチオールエンドペプチダーゼ添加区では、酵素無添加区に比し若干生成速度速まることが観察された。これに対して、本酵素の添加区では圧倒的に速い L-アラニル-L-グルタミン生成速度が観察され、その速度は、カルボキシペプチダーゼ Y、チオールエンドペプチダーゼに対して、約 5,000 倍~100,000

倍であった。以上のように、本酵素は、今までに例のない極めて速いペプチド生成速度を有していることが判明した。尚、本酵素の分子量は75000のダイマーであるのに対し、カルボキシペプチダーゼYの分子量は約61000、上記チオールエンドペプチダーゼの分子量は約23000～36000と報告されているので、分子量当たりのL-アラニル-L-グルタミン生成速度は、実施例に示した単位重量当たりよりも更に本酵素の方が速くなる。

【0149】

【表14】

表14

酵素	添加酵素量 (タンパクmg/ml)	L-Ala-L-Gln生成 速度 (mM/分)	酵素単位重量当 りのL-Ala-L-Gln 生成速度比
酵素なし	0	0.0006	
カルボキシペプチ ダーゼY	0.61	0.0257	0.0191
フィシン	2.60	0.0096	0.0017
パパイン	2.30	0.0106	0.0021
ブロメライン	2.80	0.0062	0.0010
キモパパイン	3.60	0.0100	0.0013
本発明酵素	0.02	4.4000	100.0

【0150】

(実施例21) スフィンゴバクテリウム エスピーの菌体を用いるL-アラニル-L-グルタミンの生産

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株(寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所; 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日; 2002年7月22日)の培養には、1L中にグルコース 5g、硫酸アンモニウム 5g、リン酸一カリウム 1g、リン酸二カリウム 3g、硫酸マグネシウム 0.5g、酵母エキス 10g、ペプトン 10gを含む培地(pH7.0)50mLを500mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1L中にグルコース 5g、酵母エキス 10g、ペプトン 10g、NaCl 5gを含む斜面寒天培地(寒天 20g/L、pH7.0)にて30℃、24時間培養したスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株(寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所; 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日; 2002年7月22日)を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で20時間振とう培養を行った。この培養液1mLを上記培地(50mL/500mL坂口フラスコ)に添加し、30℃、18時間培養した。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、湿菌体として100g/Lになるように10mMのEDTAを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)にて懸濁した。この菌体懸濁液0.1mLに、EDTA10mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩200mM、及びL-グルタミン400mMを含む100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)0.1mLを添加し、全量を0.2mLとした後、25℃にて120分反応をおこなった。このときのL-アラニル-L-グルタミンの生成量は62mMであった。

【0151】

(実施例22) スフィンゴバクテリウム エスピーからの酵素の精製

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。実施例21と同様に、スフ

ィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）を培養し、遠心分離（10,000rpm, 15分）によって菌体を集めた。菌体2gを20mMトリスー塩酸緩衝液（pH7.6）にて洗浄後、同緩衝液8mlに懸濁し、195Wにて45分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離（10,000rpm, 30分）し、破碎菌体片を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を20mMトリスー塩酸緩衝液（pH7.6）に対して一夜透析し、超遠心分離（50,000rpm, 30分）にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分をトリスー塩酸緩衝液（pH7.6）にて予め平衡化したQ-Sepharose HPカラム（アマシャム社製）に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を20mM酢酸緩衝液（pH5.0）に対して一夜透析し、遠心分離（10,000rpm, 30分）にて不溶性画分を除去することにより、上清液として透析画分を得た。この透析画分を20mM酢酸緩衝液（pH5.0）で予め平衡化したSP-Sepharose HPカラム（アマシャム社製）に供し、0~1M NaClを含む同緩衝液の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた活性画分を得た。

10

【0152】

（実施例23）酵素画分を用いたL-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例22で精製したSP-Sepharose HP画分（約27U/ml）10μlを、111mMのL-アラニンメチルエステル塩酸塩、222mMのL-グルタミン、11mMのEDTAを含む111mMホウ酸緩衝液（pH9.0）90μlに加え、25℃にて120分反応した。はこの結果、酵素添加区では、73mMのL-アラニル-L-グルタミンが生成した。一方、酵素無添加区でのL-Ala-L-Gln生成はほとんど認められず、反応120分で0.07mM程度であった。

20

【0153】

（実施例24）酵素の基質特異性（11）

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）由来酵素の基質特異性を検討した。表15-1から表15-4に示した終末100mMの各種カルボキシ成分と150mMの各種アミン成分、実施例22で精製したSP-Sepharose HP画分酵素（反応液中0.33ユニット添加）を含む10mMのEDTA含有100mMホウ酸緩衝液（pH9.0）100μlの反応液を用い、25℃にて1.5時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表15に示した。（+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成は確認されているもの、trは微量を示す）。尚、L-Tyr-OMeを用いた場合には、反応系にTween-80を終末0.1%になるように添加した。また、カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用した。

30

【0154】

【表 1 5 - 1】

表 1 5 - 1

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Ala-OMe	Gly	L-Ala-Gly	11.1
	L-Ala	L-Ala-L-Ala	13.1
	L-Val	L-Ala-L-Val	10.9
	L-Leu	L-Ala-L-Leu	33.0
	L-Ile	L-Ala-L-Ile	24.7
	L-Met	L-Ala-L-Met	86.9
	L-Pro	L-Ala-L-Pro	1.5
	L-Phe	L-Ala-L-Phe	69.5
	L-Trp	L-Ala-L-Trp	46.0
	L-Thr	L-Ala-L-Thr	47.3
	L-Asn	L-Ala-L-Asn	52.3
	L-Tyr	L-Ala-L-Tyr	11.1
	L-CySH	L-Ala-L-CySH	+
	L-Lys	L-Ala-L-Lys	71.2
	L-Arg	L-Ala-L-Arg	72.2
	L-His	L-Ala-L-His	73.6
	L-Asp	L-Ala-L-Asp	2.3
	L-Glu	L-Ala-L-Glu	39.1
	L-Ser	L-Ala-L-Ser	43.8
	D-Ser	L-Ala-D-Ser	3.3
D-Ala-OMe	L-Ser	D-Ala-L-Ser	24.1
	D-Ser	D-Ala-D-Ser	5.5

10

20

30

【 0 1 5 5】

【表 1 5 - 2】

表 1 5 - 2

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Thr-OMe	L-Gln	L-Thr-L-Gln	36.1
Gly-OMe		Gly-L-Gln	61.1
L-Ser-OMe		L-Ser-L-Gln	12.9
L-Val-OMe		L-Val-L-Gln	8.2
L-Met-OMe		L-Met-L-Gln	32.6
L-Ile-OMe		L-Ile-L-Gln	6.4
L-Arg-OMe		L-Arg-L-Gln	17.2
L-Tyr-OMe		L-Tyr-L-Gln	0.6
L-Pro-OMe		L-Pro-L-Gln	1.8
L-Phe-OMe		L-Phe-L-Gln	0.8
L-Gln-OMe		L-Gln-L-Gln	0.1
Asp- α -OMe		α -L-Asp-L-Gln	0.05

10

20

【 0 1 5 6 】

【表 15-3】

表 15-3

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Thr-OMe	Gly	L-Thr-Gly	0.4
	L-Ala	L-Thr-L-Ala	5.8
	L-Val	L-Thr-L-Val	1.3
	L-Leu	L-Thr-L-Leu	15.3
	L-Met	L-Thr-L-Met	28.9
Gly-OMe	L-Arg	Gly-L-Arg	17.9
	L-Phe	Gly-L-Phe	20.0
	L-His	Gly-L-His	36.2
	L-Lys	Gly-L-Lys	48.2
	L-Ser	Gly-L-Ser	53.8
L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	9.9
	L-Met	L-Ser-L-Met	7.6
	L-Phe	L-Ser-L-Phe	4.3
L-Val-OMe	L-Ser	L-Val-L-Ser	31.9
	L-Met	L-Val-L-Met	6.8
	L-Phe	L-Val-L-Phe	1.0
L-Met-OMe	L-Ser	L-Met-L-Ser	25.3
	L-Met	L-Met-L-Met	28.4
	L-Phe	L-Met-L-Phe	8.9
L-Ile-OMe	L-Ser	L-Ile-L-Ser	17.3
	L-Met	L-Ile-L-Met	5.1
	L-Phe	L-Ile-L-Phe	1.5
L-Arg-OMe	L-Ser	L-Arg-L-Ser	2.2
	L-Met	L-Arg-L-Met	tr
	L-Phe	L-Arg-L-Phe	tr

10

20

30

【0157】

【表 15-4】

表 15-4

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド	(mM)
L-Ala-OMe	Glyアミド	L-Ala-Glyアミド	15.1
	L-Alaアミド	L-Ala-L-Alaアミド	9.2
	L-Pheアミド	L-Ala-Pheアミド	27.1
L-Ala-OMe	メチルアミン	L-Ala-メチルアミン	0.6
L-Thr-OMe		L-Thr-メチルアミン	0.3
Gly-OMe		Gly-メチルアミン	1.0
L-Alaアミド	L-Gln	L-Ala-L-Gln	0.3
	L-Met	L-Ala-L-Met	tr
	L-His	L-Ala-L-His	tr

10

【0158】

(実施例 25) 酵素の基質特異性 (12)

20

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124 株 (寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所; 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、国際寄託日; 2002 年 7 月 22 日) 由来酵素のオリゴペプチド生産に対する基質特異性を検討した。表 16 に示した、終末 100 mM の各種カルボキシ成分と 150 mM の各種アミン成分、実施例 22 で精製した SP-Sepharose HP 画分酵素 (反応液中 0.33 ユニット添加) を含む 10 mM の EDTA 含有 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l の反応液を用い、25 $^{\circ}$ C にて 1.5 時間反応した。この反応で生成した各種オリゴペプチドの生産量を表 16 に示した。尚、カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用した。

【0159】

30

【表 1 6】

表 1 6

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Ala-OMe	L-Ala	L-Ala-L-Ala	25.6
	L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala	41.1
	L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	30.1
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	22.8
	Gly-Gly	L-Ala-Gly-Gly	33.7
	Gly-Ala	L-Ala-Gly-L-Ala	35.1
	L-His-L-Ala	L-Ala-L-His-L-Ala	58.0
	L-Phe-Gly	L-Ala-L-Phe-Gly	34.0
	L-Leu-L-Ala	L-Ala-L-Leu-L-Ala	40.7
	L-Phe-L-Ala	L-Ala-L-Phe-L-Ala	24.8
L-Thr-OMe	Gly-Gly	L-Thr-Gly-Gly	8.4
Gly-OMe	L-Ala-L-Tyr	Gly-L-Ala-L-Tyr	0.6

10

20

【0160】

(実施例 26) 酵素の基質特異性 (13)

実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分を用いて、エンペドバクター ブレビスに由来する酵素の基質特異性をさらに検討した。

【0161】

【表 17】

表 17

カルボキシ成分 (mM)	アミン成分 (mM)	生成ペプチド (mM)	反応 時間 (hr)
H-Ala-OMe 50mM	H- <i>p</i> -F-Phe-OH 50mM	H-Ala- <i>p</i> -F-Phe-OH 21.9mM	3
H-Ala-OMe 40mM	H- <i>Cl</i> -F-Phe-OH 40mM	H-Ala- <i>Cl</i> -F-Phe-OH 20.8mM	3
H-Ala-OMe 40mM	H- <i>p</i> -NO ₂ -Phe-OH 40mM	H-Ala- <i>p</i> -NO ₂ -Phe-OH 27.5mM	3
H-Ala-OMe 100mM	H- <i>t</i> -Leu-OH 150mM	H-Ala- <i>t</i> -Leu-OH 0.4mM	3
H-Ala-OMe 20mM	H-2-Nal-OH 20mM	H-Ala-2-Nal-OH +	3
H- <i>p</i> -F-Phe-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H- <i>p</i> -F-Phe-H-Gln-OH tr	3
H- <i>Cl</i> -F-Phe-OMe 25mM	H-Gln-OH 50mM	H- <i>Cl</i> -F-Phe-H-Gln-OH tr	3
H- <i>p</i> -NO ₂ -Phe-OMe 40mM	H-Gln-OH 40mM	H- <i>p</i> -NO ₂ -Phe-H-Gln-OH 1.1mM	3
H- <i>t</i> -Leu-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H- <i>t</i> -Leu-H-Gln-OH tr	3
H-2-Nal-OMe 40mM	H-Gln-OH 40mM	H-2-Nal-H-Gln-OH tr	3
H-Aib-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Aib-H-Gln-OH 18.8mM	3
H-N-Me-Ala-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-N-Me-Ala-H-Gln-OH 0.5mM	3
H-Aib-OMe 100mM	H-Phe-OH 150mM	H-Aib-Phe-OH 17.2mM	3
H-CHA-OMe 40mM	H-Phe-OH 40mM	H-CHA-Phe-OH +	3
H-N-Me-Ala-OMe 100mM	H-Phe-OH 150mM	H-N-Me-Ala-Phe-OH tr	3
H-Ala-OMe 100mM	H-Ser(tBu)-OH 150mM	H-Ala-Ser(tBu)-OH 48.8mM	2
H-Ser(tBu)-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Ser(tBu)-Gln-OH tr	2
H-Ala-OMe 100mM	H-Asp(OtBu)-OH 150mM	H-Ala-Asp(OtBu)-OH 62.6mM	2
H-Asp(OtBu)-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Asp(OtBu)-Gln-OH 0.9mM	2
H-Ala-OMe 100mM	H-Lys(Boc)-OH 150mM	H-Ala-Lys(Boc)-OH 51.0mM	2
H-Lys(Boc)-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Lys(Boc)-Gln-OH +	2

【0162】

表 17 に示した終末濃度の各種カルボキシ成分と各種アミン成分、酵素（反応液中 0.1 ユニット添加）を含む 10 mM の EDTA 含有 100 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.0）100 μ l の反応液を用い、25 $^{\circ}$ C にて表 17 に示した反応時間で反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 17 に示した（+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成は確認されているもの、tr は微量を示す）。

【0163】

（略号）

H-Ala-OMe： L-アラニンメチルエステル塩酸塩

H-*p*-F-Phe-OMe： *p*-フルオロ-L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩

H-*Cl*-F-Phe-OMe： *p*-クロロ-L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩

H-*p*-NO₂-Phe-OMe： *p*-ニトロ-L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩

10

20

30

40

50

- H-t-Leu-OMe: tert-L-ロイシンメチルエステル塩酸塩
H-2-Nal-OMe: 3-(2-ナフチル)-Lアラニンメチルエステル塩酸塩
H-Aib-OMe: α-アミノイソブチリックアシッドメチルエステル塩酸塩
H-N-Me-Ala-OMe: N-メチル-Lアラニンメチルエステル塩酸塩
H-CHA-OMe: β-シクロヘキシル-Lアラニンメチルエステル塩酸塩
H-Ser(tBu)-OMe: O-tert-ブチル-L-セリンメチルエステル塩酸塩
H-Asp(OtBu)-OMe: L-アスパルチックアシッド β-tert-ブチルエステル α-メチルエステル塩酸塩
H-Lys(Boc)-OMe: N-ε-tert-ブトキシカルボニル-L-リジンメチルエステル塩酸塩 10
H-p-F-Phe-OH: p-フルオロ-L-フェニルアラニン
H-Cl-F-Phe-OH: p-クロロ-L-フェニルアラニン
H-p-NO₂-Phe-OH: p-ニトロ-L-フェニルアラニン
H-t-Leu-OH: tert-L-ロイシン
H-2-Nal-OH: 3-(2-ナフチル)-Lアラニン
H-Gln-OH: L-グルタミン
H-Phe-OH: L-フェニルアラニン
H-Ser(tBu)-OH: O-tert-ブチル-L-セリン
H-Asp(OtBu)-OH: L-アスパルチックアシッド β-tert-ブチルエステル 20
H-Lys(Boc)-OH: N-ε-tert-ブトキシカルボニル-L-リジン
【0164】

(実施例27) 酵素の基質特異性 (14)

実施例5で用いたものと同じ酵素画分(エンペドバクター プレビス由来)を用い、オリゴペプチド生産に対する基質特異性を検討した。表18に示した終末濃度の各種カルボキシ成分と各種アミン成分、酵素(反応液中に添加したユニット数は表18に記載)を含む10mMのEDTA含有100mMホウ酸緩衝液(pH9.0)100μlの反応液を用い、25℃にて3時間反応した。この反応で生成した各種オリゴペプチドの生産量を表18に示した(+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成は確認されているもの、trは微量を示す)。尚、カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用した。 30

【0165】

【表18】

表18

カルボキシ成分	アミン成分	酵素量 (ユニット数)	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	L-Phe-L-Met	1.0	Gly-Phe-Met	13.3
L-Ala-OMe	L-Phe-L-Met	0.2	L-Ala-L-Phe-L-Met	+
L-Tyr-OMe	Gly-Gly-L-Phe-L-Met	1.0	L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met	2.7
L-Ala-OMe	Gly-Gly-L-Phe-L-Met	0.2	L-Ala-Gly-Gly-L-Phe-L-Met	+
Gly-OMe	Gly-L-Phe	0.1	Gly-L-Phe	17.3
L-Ala-OMe	Gly-L-Phe	0.1	L-Ala-Gly-L-Phe	+
D-Ala-OMe	Gly-L-Phe	0.1	D-Ala-Gly-L-Phe	Tr

【0166】

(実施例28) エンペドバクター プレビス由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はエンペドバクター

ブレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）JM-109を宿主に用い、ベクターはpUC118を用いた。

【0167】

（1）決定内部アミノ酸配列に基づいたPCRプライマーの作製

前述のエンベドバクター ブレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）由来のペプチド生成酵素のリジルエンドペプチダーゼによる消化物をエドマン分解法により決定したアミノ酸配列（配列番号1及び2）をもとに、配列番号3及び4にそれぞれ示す塩基配列を有するミックスプライマーを作成した。

【0168】

（2）菌体の取得

エンベドバクター ブレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）をCM2G寒天培地（50g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l ペプトン、5g/l 塩化ナトリウム、20g/l 寒天、pH7.0）上で30℃、24時間培養した。この菌体を、50mlのCM2G液体培地（上記培地より寒天を除いた培地）を張り込んだ500mlの坂口フラスコに1白金耳植菌し、30℃で振盪培養した。

【0169】

（3）菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離（12,000rpm、4℃、15分間）し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System（Qiagen社）を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

（4）PCR法によるペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片の取得エンベドバクター ブレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。エンベドバクター ブレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）から取得した染色体DNAに対し、配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。

【0170】

PCR反応は、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL（宝酒造製）を用いて行い、以下の条件の反応を30サイクル行った。

94℃	30秒
52℃	1分
72℃	1分

【0171】

反応後、反応液3μlを0.8%アガロース電気泳動に供した。その結果、約1.5kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。

【0172】

（5）遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイ

10

20

30

40

50

ブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

【0173】

上記PCRで増幅された約1.5 kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0174】

本実施例28(3)で取得したエンペドバクター プレビスの染色体DNAを制限酵素 HindIII で37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルター Nylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製) にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1% SDSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。

【0175】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約4 kbのバンドが検出できた。

【0176】

本実施例28(3)で調製した染色体DNA 5 μgをHindIIIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動により約4 kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit (フナコシ社製) を用いてDNAを精製し、10 μlのTEに溶解した。このうち4 μlと、pUC118 HindIII/BAP (宝酒造製) とを混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5 μlとEscherichia coli JM109のコンピテント・セル (東洋紡績製) 100 μlとを混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

【0177】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

【0178】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルター Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製) に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1% SDSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。

【0179】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを2株確認できた。

【0180】

（6）エンベドバクター プレビス由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記2菌株から、エシェリヒア コリ JM109が保有するプラスミドを、Wizard Plus Miniprep DNA Purification System（プロメガ社製）を用いて調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTC S-Quick Start Kit（ベックマン・コールター社製）を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL（ベックマン・コールター社製）を用いて行った。

【0181】

その結果、ペプチド生成酵素の内部アミノ酸配列（配列番号1及び2）を含むタンパク質をコードするオープンリーディングフレームが存在し、ペプチド生成酵素をコードする遺伝子であることを確認した。ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号5に示した。得られたオープンリーディングフレームをBLASTPプログラムで相同性解析した結果、二つの酵素に相同性が見出され、Acetobacter pasteurianusのα-アミノ酸エステルハイドrolラーゼ（Appl. Environ. Microbiol., 68(1), 211-218(2002)）とは、アミノ酸配列で34%、Brevibacillus laterosporum（J. Bacteriol., 173(24), 7848-7855(1991)）のグルタリル-7ACAアシラーゼとは、アミノ酸配列で26%の相同性を示した。

【0182】

（実施例29）エンベドバクター属由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現
エシェリヒア コリ（Escherichia coli）W3110染色体DNA上のtrpオペロンのプロモーター領域を配列番号7、8に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子領域を増幅し、得られたDNA断片をpGEM-T easyベクター（プロメガ製）にライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中からtrpプロモーターの方向がlacプロモーターと反対向きに挿入された目的のプラスミドを有する株を選択した。次にこのプラスミドをEcoO109I/EcoRIにて処理して得られるtrpプロモーターを含むDNA断片と、pUC19（Takara製）のEcoO109I/EcoRI処理物とライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択した。次にこのプラスミドをHindIII/PvuIIにて処理して得られるDNA断片と、pKK223-3（Amersham Pharmacia製）をHindIII/HincIIにて処理し、得られたrrnBターミネーターを含むDNA断片とをライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpTと命名した。

【0183】

エンベドバクター プレビス FERM BP-8113株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託移管日；2002年7月8日）の染色体DNAを鋳型として配列番号9、10に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子を増幅した。このDNA断片をNdeI/PstIにて処理し、得られたDNA断片とpTrpTのNdeI/PstI処理物をライゲーションした。このライゲーション溶

液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpT_Gtg2と命名した。

【0184】

pTrpT_Gtg2を有するエシェリヒア コリ JM109を100mg/lアンピシリンを含むLB培地で、30℃、24時間シード培養した。得られた培養液1mlを、50mlの培地(2g/l D-グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン)を張り込んだ500ml 坂口フラスコにシードし、25℃、24時間の本培養を行った。培養液1mlあたり0.44UのL-アラニル-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がE. coliで発現したことを確認した。なお、対照としてpTrpTのみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

10

【0185】

(シグナル配列予測)

配列表に記載の配列番号6番のアミノ酸配列をSignalP v1.1プログラム(Protein Engineering, vol12, no. 1, pp. 3-9, 1999)にて解析したところ、アミノ酸配列の1-22番目までがシグナルとして機能してペリプラズムに分泌すると予測され、成熟タンパクは23番目より下流であると推定された。

【0186】

(分泌の確認)

pTrpT_Gtg2を有するエシェリヒア コリ JM109を100mg/lアンピシリンを含むLB培地で、30℃、24時間シード培養した。得られた培養液1mlを、50mlの培地(2g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン)を張り込んだ500ml 坂口フラスコにシードし、25℃、24時間の本培養を行い培養菌体を得た。

20

【0187】

上記培養菌体を20g/dlのスクロース溶液を用いた浸透圧ショック法により、ペリプラズム画分とサイトプラズム画分に分画した。20g/dlのスクロース溶液に浸した菌体を5mM MgSO₄水溶液に浸し、この遠心上清をペリプラズム画分(Pe)とした。また、その遠心沈殿を再懸濁し、超音波破碎したものをサイトプラズム画分(Cy)とした。サイトプラズムを分離したことを確認するために、サイトプラズムに存在することが知られているグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼの活性を指標とした。測定法は1mM グルコース6リン酸、0.4mM NADP、10mM MgSO₄、50mM Tris-Cl(pH8)、30℃の反応溶液の中に適量の酵素を添加し、340nmの吸光度の測定によりNADPHの生成を測定することにより行った。

30

【0188】

別途調整した無細胞抽出液の活性を100%としたときの、サイトプラズム画分、ペリプラズム画分の酵素量を第4図に示す。グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ活性がペリプラズム画分に混入していないことは、サイトプラズム画分にペリプラズム画分が混入していないことを示す。Ala-Gln生成活性のうち約60%がペリプラズム画分に回収され、上記SignalP v1.1プログラムを用いてアミノ酸配列から予測されたように、Ala-Gln生成酵素がペリプラズムに分泌していることが確認された。

40

【0189】

(実施例30) スフィンゴバクテリウム エスピー の菌体を用いるL-アラニル-L-グルタミンの生産

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株(寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所; 日本国茨城県つくば市

50

東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）の培養には、1 L中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 gを含む培地（pH 7.0）50 mLを500 mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1 L中にグルコース 5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 g、NaCl 5 gを含む斜面寒天培地（寒天 20 g/L、pH 7.0）にて30℃、24時間培養したスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で20時間振とう培養を行った。この培養液1 mLを上記培地（50 mL/500 mL坂口フラスコ）に添加し、30℃、18時間培養した。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、湿菌体として100 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液（pH 9.0）にて懸濁した。この菌体懸濁液0.1 mLに、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 200 mM、及びL-グルタミン 400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液（pH 9.0）0.1 mLを添加し、全量を0.2 mLとした後、25℃にて120分反応をおこなった。このときのL-アラニル-L-グルタミン）の生成量は62 mMであった。

【0190】

（実施例31）スフィンゴバクテリウム エスピーからの酵素の精製

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。実施例21と同様に、スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）を培養し、遠心分離（10,000 rpm, 15分）によって菌体を集めた。菌体2 gを20 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）にて洗浄後、同緩衝液8 mLに懸濁し、195 Wにて45分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離（10,000 rpm, 30分）し、破碎菌体片を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を20 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）に対して一夜透析し、超遠心分離（50,000 rpm, 30分）にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分をトリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）にて予め平衡化したQ-Sepharose HPカラム（アマシャム社製）に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）に対して一夜透析し、遠心分離（10,000 rpm, 30分）にて不溶性画分を除去することにより、上清液として透析画分を得た。この透析画分を20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）で予め平衡化したSP-Sepharose HPカラム（アマシャム社製）に供し、0~1 M NaClを含む同緩衝液の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた活性画分を得た。

【0191】

（実施例32）酵素画分を用いたL-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例31で精製したSP-Sepharose HP画分（約27 U/mL）10 µlを、111 mMのL-アラニンメチルエステル塩酸塩、222 mMのL-グルタミン、11 mMのEDTAを含む90 µlのホウ酸緩衝液（pH 9.0）に加え、25℃にて120分反応した。この結果、酵素添加区では、73 mMのL-アラニル-L-グルタミンが生成した。一方、酵素無添加区でのL-Ala-L-Gln生成はほとんど認められず、反応120分で0.07 mM程度であった。

【0192】

（実施例33）スフィンゴバクテリウム エスピー由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中

中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）DH5αを宿主に用い、ベクターはpUC 118を用いた。

【0193】

（1）菌体の取得

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）をCM2G寒天培地（50g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l ペプトン、5g/l 塩化ナトリウム、20g/l 寒天、pH7.0）上で25℃、24時間培養した。この菌体を、50mlのCM2G液体培地（上記培地より寒天を除いた培地）を張り込んだ500mlの坂口フラスコに1白金耳植菌し、25℃で振盪培養した。

10

【0194】

（2）菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離（12,000rpm、4℃、15分間）し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System（Qiagen社）を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

【0195】

（3）PCR法によるプローブ用DNA断片の取得

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株（寄託機関；独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日；2002年7月22日）から取得した染色体DNAに対し、配列番号13及び14に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。

20

【0196】

PCR反応は、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL（宝酒造製）を用いて行い、以下の条件の反応を30サイクル行った。

30

94℃	30秒
52℃	1分
72℃	1分

【0197】

反応後、反応液3μlを0.8%アガロース電気泳動に供した。その結果、約1.5kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。

【0198】

（4）遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）に説明されている。

40

【0199】

上記PCRで増幅された約1.5kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0200】

50

本実施例 33 (2) で取得したスフィンゴバクテリウム エスピーの染色体 DNA を制限酵素 Sac I で 37℃、16 時間反応させて完全に消化した後、0.8% アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルター Nylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製) にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションは EASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを 37℃ で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを 0.1% SDS を含む 1×SSC で 60℃ で洗浄を 2 回行った。

10

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約 3 kb のバンドが検出できた。

【0201】

本実施例 33 (2) で調製した染色体 DNA 5 µg を Sac I で完全に消化した。0.8% アガロースゲル電気泳動により約 3 kb の DNA を分離し、Gene Clean II Kit (フナコシ社製) を用いて DNA を精製し、10 µl の TE に溶解した。このうち 4 µl と、Sac I で 37℃、16 時間反応させて完全に消化した後、Alkaline Phosphatase (E. coli C75) で 37℃、30 分、50℃、30 分処理した pUC118 とを混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液 5 µl と Escherichia coli DH5α のコンピテント・セル (宝酒造社製) 100 µl とを混合して、Escherichia coli を形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体 DNA ライブラリーを作製した。

20

【0202】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体 DNA ライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

30

【0203】

染色体 DNA ライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルター Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製) に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションは EASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを 37℃ で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを 0.1% SDS を含む 1×SSC で 60℃ で洗浄を 2 回行った。

【0204】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを 6 株確認できた。

40

【0205】

(5) スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記 6 菌株から、エシェリヒア コリ DH5α が保有するプラスミドを、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (プロメガ社製) を用いて調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応は CEQ D

50

T C S - Q u i c k S t a r t K i t (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はC E Q 2 0 0 0 - X L (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

【0206】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号11に示した。スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素は、エンペドバクタープレビス由来ペプチド生成酵素とアミノ酸配列で63.5%の相同性を示した(B L A S T Pプログラムを使用)。

【0207】

(実施例34) スフィンゴバクテリウム属由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現

スフィンゴバクテリウム エスピー F E R M B P - 8 1 2 4 株(寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター、寄託機関住所; 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6、国際寄託日; 2002年7月22日)の染色体DNAを鋳型として配列番号13、14に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子を増幅した。このDNA断片をN d e I / X b a Iにて処理し、得られたDNA断片とp T r p TのN d e I / X b a I処理物をライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ J M 1 0 9を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをp T r p T _ S m _ a e tと命名した。

【0208】

p T r p T _ S m _ a e tを有するエシェリヒア コリ J M 1 0 9を3mlの培地(2g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン)を張り込んだ普通試験管に一白金耳植菌し、25℃、20時間の本培養を行った。培養液1mlあたり2.1UのL-アラニル-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がエシェリヒア コリで発現したことを確認した。なお、対照としてp T r p Tのみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

【0209】

(シグナル配列予測)

配列表に記載の配列番号12番のアミノ酸配列をS i g n a l P v 1 . 1プログラム(Protein Engineering, vol 12, no. 1, pp. 3-9, 1999)にて解析したところ、アミノ酸配列の1-20番目までがシグナルとして機能してペリプラズムに分泌すると予測され、成熟タンパクは21番目より下流であると推定された。出されなかった。

【0210】

(シグナル配列の確認)

p T r p T _ S m _ a e tを有するエシェリヒア コリ J M 1 0 9を50mlの培地(2g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン)を張り込んだ普通試験管に一白金耳植菌し、25℃、20時間の本培養を行った。

【0211】

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、100mMリン酸緩衝液(pH7)にて洗浄後、同緩衝液に懸濁した。195Wにて20分間超音波破碎処理を行い、超音波破碎処理液を遠心分離(12,000rpm、30分)し、破碎菌体片を除去することにより可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を100mMリン酸緩衝液(pH7)にて予め平衡化したC H T - I I

10

20

30

40

50

カラム（バイオラッド製）に供し、500mMリン酸緩衝液による直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分と5倍量の2M硫酸アンモニウム、100mMリン酸緩衝液とを混合した溶液を、2M硫酸アンモニウム、100mMリン酸緩衝液にて予め平衡化したResource-PHEカラム（アマシャム社製）に供し、2~0M硫酸アンモニウムによる直線的な濃度勾配で酵素を溶出させ、活性画分溶液を得た。これらの操作により、ペプチド生成酵素は電気泳動的に単一に精製されたことが確認された。

【0212】

上記ペプチド生成酵素をエドマン分解法によりアミノ酸配列を決定したところ、配列番号15のアミノ酸配列を取得し、SignalP v1.1プログラムで予測されたとおり成熟タンパクは21番目より下流であることが確認された。

10

【0213】

（実施例35）ペドバクター ヘパリナス IFO 12017由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はペドバクター ヘパリナス IFO 12017株（寄託機関；財団法人発酵研究所、寄託先住所；日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）JM109を宿主に用い、ベクターはpUC118を用いた。

【0214】

（1）菌体の取得

ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株（寄託機関；財団法人発酵研究所、寄託先住所；日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）をCM2G寒天培地（50g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l ペプトン、5g/l 塩化ナトリウム、20g/l 寒天、pH7.0）上で25℃、24時間培養した。この菌体を、50mlのCM2G液体培地（上記培地より寒天を除いた培地）を張り込んだ500mlの坂口フラスコに1白金耳植菌し、25℃で振盪培養した。

20

【0215】

（2）菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離（12,000rpm、4℃、15分間）し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System（Qiagen社）を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

30

【0216】

（3）PCR法によるプローブ用DNA断片の取得

ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株（寄託機関；財団法人発酵研究所、寄託先住所；日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）から取得した染色体DNAに対し、配列番号15及び16に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。PCRで増幅された約1kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

40

【0217】

（4）遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）に説明されている。

【0218】

50

ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株（寄託機関；財団法人発酵研究所、寄託先住所；日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）の染色体DNAを制限酵素HindIIIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNylon membranes positively charged（ロシュ・ダイアグノティクス社製）にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを0.1%SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

10

【0219】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約5kbのバンドが検出できた。

【0220】

ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株（寄託機関；財団法人発酵研究所、寄託先住所；日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85）の染色体DNA 5μgをHindIIIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動により約5kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit（フナコシ社製）を用いてDNAを精製し、10μlのTEに溶解した。このうち4μlと、pUC118 HindIII/BAP（宝酒造製）とを混合しとを混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2（宝酒造製）を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5μlとEscherichia coli JM109のコンピテント・セル（宝酒造社製）100μlとを混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

20

【0221】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）に説明されている。

30

【0222】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization（ロシュ・ダイアグノティクス社製）に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを0.1%SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

40

【0223】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを1株確認できた。

【0224】

（5）ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記1菌株から、エシェリヒア

50

コリ JM109が保有するプラスミドを調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTC S-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

【0225】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株 (寄託機関; 財団法人発酵研究所、寄託先住所; 日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85) 由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号17に示した。

【0226】

(実施例36) ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現

ペドバクター ヘパリナス IFO 12017株 (寄託機関; 財団法人発酵研究所、寄託先住所; 日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17-85) の染色体DNAを鋳型として配列番号19、20に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子を増幅した。このDNA断片をNde I/Hind IIIにて処理し、得られたDNA断片とpTrpTのNde I/Hind III処理物をライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpT-Ph-aetと命名した。

【0227】

pTrpT-Ph-aetを有するエシェリヒア コリ JM109を3mlの培地 (2g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン) を張り込んだ普通試験管に一白金耳植菌し、25℃、20時間の本培養を行った。培養液1mlあたり0.3UのL-アラニール-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がエシェリヒア コリで発現したことを確認した。なお、対照としてpTrpTのみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

【0228】

(実施例37) タキセオバクター ゲルブルプルアッセンス (Taxeobacter gelupurpurascens) DSMZ 11116株由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はタキセオバクター ゲルブルプルアッセンス DSMZ 11116株 (寄託機関; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所; Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109を宿主に用い、バクターはpUC118を用いた。

【0229】

(1) 菌体の取得

タキセオバクター ゲルブルプルアッセンス DSMZ 11116株 (寄託機関; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所; Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) をCM2G寒天培地 (50g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l ペプトン、5g/l 塩化ナトリウム、20g/l 寒天, pH7.0) 上で25

10

20

30

40

50

℃、24時間培養した。この菌体を、50mlのCM2G液体培地（上記培地より寒天を除いた培地）を張り込んだ500mlの坂口フラスコに1白金耳植菌し、25℃で振盪培養した。

【0230】

（2）菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離（12,000rpm、4℃、15分間）し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System（Qiagen社）を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

【0231】

（3）PCR法によるプローブ用DNA断片の取得

タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116株（寄託機関；Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所；Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany）由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116株（寄託機関；Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所；Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany）から取得した染色体DNAに対し、配列番号21及び16に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。PCRで増幅された約1kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime（ベリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0232】

（4）遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）に説明されている。

【0233】

タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116株（寄託機関；Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所；Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany）の染色体DNAを制限酵素Pst Iで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNYLON MEMBRANES POSITIVELY CHARGED（ロシュ・ダイアグノティクス社製）にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB（ベリンガー・マンハイム社製）を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1%SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0234】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約5 kbのバンドが検出できた。

【0235】

タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116 株 (寄託機関; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures、寄託先住所; Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) の染色体DNA 5 µg を Hind III で完全に消化した。0.8% アガロースゲル電気泳動により約5 kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit (ファコシ社製) を用いてDNAを精製し、10 µl のTEに溶解した。このうち4 µl と、pUC118 Pst I/BAP (宝酒造製) とを混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5 µl と Escherichia coli JM109 のコンピテント・セル (宝酒造社製) 100 µl とを混合して、Escherichia coli を形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

10

【0236】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

20

【0237】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルター Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製) に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

30

【0238】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを1株確認できた。

【0239】

(5) タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116 株由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

40

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記1菌株から、エシェリヒア コリ JM109 が保有するプラスミドを調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTC S-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製) を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製) を用いて行った。

【0240】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。タキセオバクター ゲルブルブルアッセンス DSMZ 11116 株 (寄託機関; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of M

50

icroorganisms and Cell Cultures、寄託先住所；Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany）由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号22に示した。

【0241】

（実施例38）サイクロバクテリウム マリナム（*Cyclobacterium marinum*）ATCC 25205株由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はサイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託機関住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）JM109を宿主に用い、ベクターはpUC118を用いた。

【0242】

（1）菌体の取得

サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）をCM2G寒天培地（50g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l ペプトン、5g/l 塩化ナトリウム、20g/l 寒天、pH7.0）上で25℃、24時間培養した。この菌体を、50mlのCM2G液体培地（上記培地より寒天を除いた培地）を張り込んだ500mlの坂口フラスコに1白金耳植菌し、25℃で振盪培養した。

【0243】

（2）菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離（12,000rpm、4℃、15分間）し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System（Qiagen社）を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

【0244】

（3）PCR法によるプローブ用DNA断片の取得

サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）から取得した染色体DNAに対し、配列番号15及び16に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。PCRで増幅された約1kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime（ベリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0245】

（4）遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）に説明されている。

10

20

30

40

50

【0246】

サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）の染色体DNAを制限酵素Pst IもしくはHinc IIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、それぞれ0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNylon membranes positively charged（ロシュ・ダイアグノティクス社製）にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEAS Y HYB（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1%SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0247】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズするPst I消化産物では7k、Hinc II消化産物では2kのバンドが検出できた。

【0248】

サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205株（寄託機関；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所；P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America）の染色体DNA5μgをPst IもしくはHinc IIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ約7kbもしくは2kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit（フナコシ社製）を用いてDNAを精製し、10μlのTEに溶解した。このうち4μlと、それぞれpUC118 Pst I/BAP（宝酒造製）もしくはpUC118 Hinc II/BAP（宝酒造製）とを混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2（宝酒造製）を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5μlとEscherichia coli JM109のコンピテント・セル（宝酒造社製）100μlとをそれぞれ混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

【0249】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press（1989）に説明されている。

【0250】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization（ロシュ・ダイアグノティクス社製）に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEAS Y HYB（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1%SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0251】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit（ベーリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に

に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーをそれぞれ1株確認できた。

【0252】

(5) サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205 株由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

上記、標識プローブとハイブリダイズしたことが確認されたそれぞれ1菌株から、エシェリヒア コリ JM109 が保有するプラスミドを調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応は CEQ DTS-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製) を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動は CEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製) を用いて行った。

10

【0253】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。サイクロバクテリウム マリナム ATCC 25205 株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) 由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号24に示した。

【0254】

(実施例39) サイクロセルペンス ブルトネンシス (Psychoserpens burtonensis) ATCC 700359 由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離
以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はサイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359 株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 を宿主に用い、ベクターは pUC118 を用いた。

20

【0255】

(1) 菌体の取得

サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359 株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) を CM2G 寒天培地 (50g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l ペプトン、5g/l 塩化ナトリウム、20g/l 寒天、pH7.0) 上で 10℃、24 時間培養した。この菌体を、50ml の CM2G 液体培地 (上記培地より寒天を除いた培地) を張り込んだ 500ml の坂口フラスコに 1 白金耳植菌し、10℃で振盪培養した。

30

【0256】

(2) 菌体からの染色体 DNA の取得

培養液 50ml を遠心分離 (12,000rpm、4℃、15 分間) し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System (Qiagen 社) を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体 DNA を取得した。

40

【0257】

(3) PCR 法によるプローブ用 DNA 断片の取得

サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359 株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) 由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含む DNA 断片を、LA-Taq (宝酒造社製) を用いた PCR 法により取得した。サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359 株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, th

50

e United States of America) から取得した染色体DNAに対し、配列番号15及び16に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。PCRで増幅された約1 kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0258】

(4) 遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

10

【0259】

サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) の染色体DNAを制限酵素EcoRIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製) にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

20

【0260】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約7 kbのバンドが検出できた。

30

【0261】

サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359株 (寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America) の染色体DNA 5 µgをEcoRIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動により約7 kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit (ファコシ社製) を用いてDNAを精製し、10 µlのTEに溶解した。このうち4 µlと、pUC118 EcoRI/BAP (宝酒造製) とを混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5 µlとEscherichia coli JM109のコンピテント・セル (宝酒造社製) 100 µlとを混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

40

【0262】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に説明されている。

【0263】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon M

50

embranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製)に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0264】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを1株確認できた。

10

【0265】

(5) サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359株由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記1菌株から、エシェリヒア コリ JM109が保有するプラスミドを調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTC S-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

20

【0266】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。サイクロセルペンス ブルトネンシス ATCC 700359株(寄託機関; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、寄託先住所; P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, the United States of America)由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号26に示した。

【産業上の利用可能性】

【0267】

本発明により、保護基の導入・脱離などの複雑な合成方法を軽減し、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造することができる新規酵素が提供される。本発明の酵素を用いることにより、効率的なペプチドの工業生産が可能である。

30

【配列表フリーテキスト】

【0268】

配列番号3; 合成プライマー1

配列番号4; 合成プライマー2

配列番号5; ペプチド合成酵素をコードする遺伝子

配列番号7; pTrpTの調製のための合成プライマー

配列番号8; pTrpTの調製のための合成プライマー

配列番号9; pTrpT__Gtg2の調製のための合成プライマー

配列番号10; pTrpT__Gtg2の調製のための合成プライマー

配列番号11; ペプチド合成酵素の遺伝子

配列番号13; pTrpT__Sm__aetの調製のための合成プライマー

配列番号14; pTrpT__Sm__aetの調製のための合成プライマー

配列番号15; Aet用ミックスプライマー1

配列番号16; Aet用ミックスプライマー2

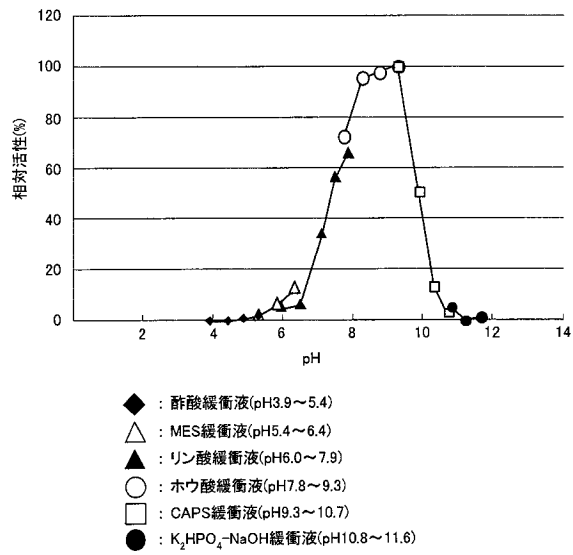
配列番号19; ペドバクター由来aet発現ベクター構築用プライマー1

配列番号20; ペドバクター由来aet発現ベクター構築用プライマー2

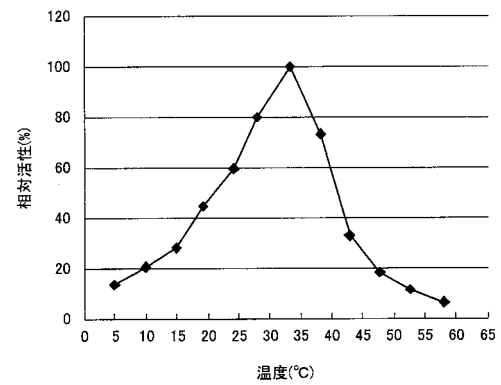
配列番号21; Aet用ミックスプライマー3

40

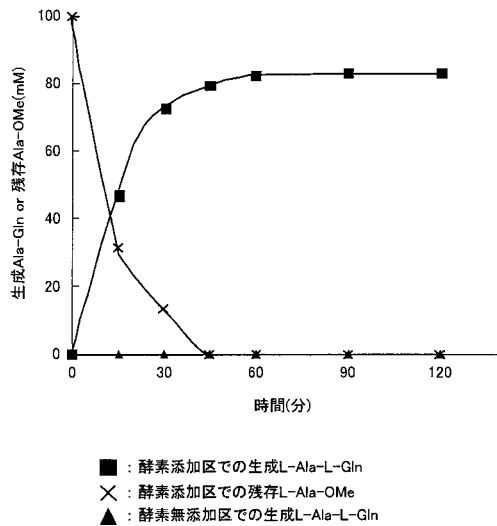
【図 1】



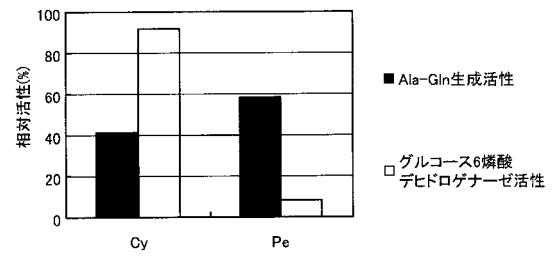
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2010029214000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 0 7 K	5/06	(2006.01)	C 0 7 K	5/06	

(72)発明者 阿部 巧
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内

(72)発明者 外内 尚人
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内

(72)発明者 城嶋 恭子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA05 BA10 CA04 CA09 CA20 DA06 EA04
4B050 CC01 CC03 DD02 LL01 LL02
4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 CA29 CA41 CA44
4H045 AA20 BA11 EA01 EA20 FA70