

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 3 月 3 日 (03.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/019458 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/53, (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/011461
- (22) 国際出願日: 2004 年 8 月 10 日 (10.08.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-299607 2003 年 8 月 25 日 (25.08.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 場家幹雄 (BAKKE, Mikio) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 梶山直樹 (KAJIYAMA, Naoki) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町 MT ビル 1 9 階 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ACYL-CoA OXIDASE, GENE THEREFOR, RECOMBINANT DNA AND PROCESS FOR PRODUCING ACYL-CoA OXIDASE

(54) 発明の名称: アシル CoA オキシダーゼ、その遺伝子、組み換え体 DNA 及びアシル CoA オキシダーゼの製造法

(57) Abstract: An acyl-CoA oxidase characterized by exhibiting a remaining activity, as measured after treatment at pH 7.5 in the presence of 10 mM SH reagent performed at 37°C for 4 hr, of 40% or higher. This acyl-CoA oxidase excels in the stability exhibited in the presence of SH reagent and is thus useful.

(57) 要約: 本発明は、10 mM の SH 試薬存在下、pH 7.5 において 37°C、4 時間の処理で 40% 以上の残存活性を示すことを特徴とするアシル CoA オキシダーゼを提供する。かかるアシル CoA オキシダーゼは SH 試薬共存下において安定性に優れており、有用である。



WO 2005/019458 A1

明 細 書

アシルCoAオキシダーゼ、その遺伝子、組み換え体DNA及びアシルCoAオキシダーゼの製造法

技術分野

[0001] 本発明は、SH試薬に対する安定性が優れたアシルCoAオキシダーゼ、その遺伝子、組み換え体DNA及びSH試薬に対する安定性が優れたアシルCoAオキシダーゼの製造法に関する。

背景技術

[0002] アシルCoAオキシダーゼは、アシルコエンザイムA(アシルCoA)を酸化し、トランス-2,3-デヒドロアシルコエンザイムA(エノイルCoA)及び過酸化水素に変換する酵素であり、ペルオキシソームにおける脂肪酸の β 酸化に関与する。本酵素は、哺乳動物、植物、微生物等天然に広く存在することが知られている。

[0003] 例えば、哺乳類由来のものとしては、ラット由来(Biochem. Biophys. Res. Commun. 217, 482(1995)参照)、マウス由来(Eur. J. Biochem. 267, 1254(2000)参照)、ヒト由来(Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 1113(1994)参照)等の報告がある。

[0004] 植物由来としては、カボチャ由来(J. Biol. Chem. 273, 8301(1998)参照)、キュウリ由来(J. Biol. Chem. 261, 8570(1986)参照)、シロイヌナズナ由来等が知られている。

[0005] また微生物由来としては、*Candida lipolytica* (*Yarrowia lipolytica*)由来(特公昭59-15625号公報、J. Biochem. 88, 1481(1980)参照)、*Candida tropicalis*由来(Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 108(1979)参照)、*Candida maltosa*由来(Nucleic Acids Res. 16, 365(1988)参照)、*Macrophomina phaseoli*由来(特公昭58-40466号公報参照)、*Cladosporium resinae*由来、*Aspergillus candidus*由来(特公昭58-40466号公報参照)、*Monascus*属由来(特公昭58-40466号公報参照)、*Saccharomyces cerevisiae*由来(特公昭58-40466号公報参照)、*Arthrobacter*属由来(特公昭58-40466号公報参照)、*Dic*

tyostelium discoideum由来、Corynebacterium由来(特願2003-276393号明細書参照)等が知られている。これらの酵素のなかにはすでに遺伝子のクローニングに成功し、組み換え体によって生産されている例もある。

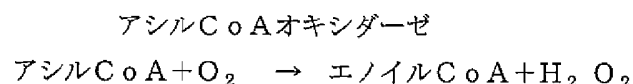
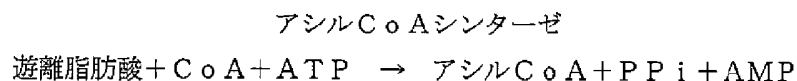
[0006] 本酵素の産業上の有用性としては、例えば、遊離脂肪酸の測定あるいは脂肪酸の β 酸化系を利用する化学変換が挙げられる。特に臨床診断の分野においては、血清中の遊離脂肪酸が糖尿病、高脂血症、甲状腺機能亢進症、重症肝障害の診断の指標とされている。また、近年、遊離脂肪酸がオーファンGタンパク質受容体の一つであるGPR40に作用して、膵臓 β 細胞からのインスリン分泌を促進することが明らかとなり、遊離脂肪酸の生体内における機能性に注目が集まっている(Nature 422, 173(2003)参照)。

[0007] 酵素を用いる遊離脂肪酸の測定方法は、いくつか知られている。

[0008] アシルCoAオキシダーゼを用いる方法は、特異性が高く、簡便であることから広く一般的に用いられている(特公昭57-29998号公報及び特公昭57-33955号公報参照)。

[0009] 本測定は、まず血清中の遊離脂肪酸にコエンザイムA(CoA)、アデノシン3リン酸(ATP)及びアシルCoAシンターゼ等を含有する第一試薬を添加し、アシルCoAを生成させる。これにアシルCoAオキシダーゼを含有する第二試薬を添加すると、アシルCoAが酸化されて過酸化水素が発生する。第二試薬にペルオキシダーゼと発色試薬を共存させると、発生する過酸化水素により発色するので、これを測定することにより遊離脂肪酸を定量できる。以下に反応式を示す。

[化1]



[0010] 本測定では、過剰に添加するCoAが発色を妨害することが知られており、これを回

避するために、第二試薬中にN-エチルマレイミド(NEM)、ヨード酢酸、ヨード酢酸アミド等のSH試薬を共存させ、第二試薬の添加と同時にCoAを失活させる方法が報告されている(特公昭57-29998号公報及び特公昭57-33955号公報参照)。しかしながら、同じく第二試薬に処方されるアシルCoAオキシダーゼは、SH試薬共存下では安定性が著しく低下するために、長期間使用可能な液状化試薬の調製が困難であった。そこで、遊離脂肪酸測定用の液状化試薬を開発するために、SH試薬に対する安定性の優れたアシルCoAオキシダーゼの開発が強く求められていた。

発明の開示

- [0011] 本発明が解決しようとする課題は、種々の用途、特に臨床診断に用いることのできる、SH試薬共存下での安定性の優れたアシルCoAオキシダーゼを提供することにある。
- [0012] そこで本発明者等は、前記課題解決のために鋭意検討を重ねた結果、*Arthrobacter ureafaciens* (IFO 12140)由来のアシルCoAオキシダーゼが、上記課題を解決し得ることを見出し、本発明を完成した。
- [0013] すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。
- [0014] (1) 10mMのSH試薬存在下、pH7.5において37℃、4時間の処理で40%以上の残存活性を示すことを特徴とするアシルCoAオキシダーゼ。
- [0015] (2) 10mMのSH試薬存在下、pH7.5において37℃、4時間の処理で60%以上の残存活性を示すことを特徴とするアシルCoAオキシダーゼ。
- [0016] (3) 以下の(a)又は(b)のアシルCoAオキシダーゼ。
(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質
(b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシルCoAオキシダーゼ活性を有するタンパク質
- [0017] (4) 以下の(a)又は(b)のアシルCoAオキシダーゼをコードする遺伝子。
(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質
(b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシルCoAオキシダーゼ活性を有するタンパク質
- [0018] (5) 以下の(a)又は(b)のDNAからなるアシルCoAオキシダーゼ遺伝子。

(a) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNA

(b) (a) の塩基配列からなるDNA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、かつアシルCoAオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

[0019] (6) 項目(4)又は(5)記載のアシルCoAオキシダーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNA。

[0020] (7) 項目(6)記載の組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体。

[0021] (8) 項目(7)記載の形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からアシルCoAオキシダーゼを採取することを特徴とするアシルCoAオキシダーゼの製造法。

[0022] 本発明によれば、SH試薬共存下において安定性の優れたアシルCoAオキシダーゼが提供される。SH試薬共存下において安定性の優れた、本発明アシルCoAオキシダーゼは、診断用酵素等として測定用キットに有利に利用でき、産業上有用である。

発明を実施するための最良の形態

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003年8月25日に出願された日本国特許出願第2003-299607号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

[0024] アシルCoAオキシダーゼは、自然界に広く分布しており、該酵素の遺伝子は、種々の動物、植物、微生物等からクローニングが可能であり、その生物資源は、特に限定されないが、本発明では、例えば、微生物、さらに具体的には *Arthrobacter ureafaciens* (IFO 12140) が用いられる。

[0025] 目的とするアシルCoAオキシダーゼ遺伝子は、染色体遺伝子あるいはmRNAより逆転写酵素を用いて合成したDNAからクローニングすることができる。クローニングについては如何なる方法でもよく、例えば、単離したアシルCoAオキシダーゼのアミノ酸配列解析結果や、既知のアシルCoAオキシダーゼの塩基配列又はアミノ酸配列を基に混合塩基プライマーを作製してポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCRと略称する)を行うことにより目的の遺伝子又はその一部をクローニングすることができる。さらに

、制限酵素処理した染色体遺伝子についてサザンブロット分析を行い、目的遺伝子断片を有する遺伝子断片群を単離し、これをベクターに挿入して大腸菌等を形質転換させて目的遺伝子をスクリーニングする方法あるいはセルフライゲーションさせたものを鋳型としてインバースPCRを行う方法等も用いることができる。

[0026] 次いで、得られた塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定する。このアミノ酸配列は、配列番号1で表されるとおりである。このようにして確定されたアミノ酸配列をコードする遺伝子が本発明のアシルCoAオキシダーゼ遺伝子である。

[0027] なお、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されており、かつ、アシルCoAオキシダーゼ活性をもたらすアミノ酸配列をコードするアシルCoAオキシダーゼ遺伝子は、全て本発明に含まれる。

[0028] そして、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されており、かつアシルCoAオキシダーゼ活性をもたらすアミノ酸配列をコードするアシルCoAオキシダーゼ遺伝子を得るには、如何なる方法でもよく、例えば、遺伝子に点変異又は欠失変異を生じさせるための周知技術である部位特定変異誘導法；遺伝子を選択的に開裂し、次いで、選択されたヌクレオチドを除去又は付加し、遺伝子を連結する方法；オリゴヌクレオチド変異誘導法等が挙げられる。

[0029] これらのDNAは、アシルCoAオキシダーゼ活性をもたらすポリペプチドをコードしている蓋然性が高く、形質転換体を作製し、活性を有するものを選択することができる。

[0030] 本発明のアシルCoAオキシダーゼ遺伝子と実質的に同一な遺伝子を取得するためには、配列番号2の塩基配列を有するDNA若しくはその相補鎖、又はそれらの一部を含むプローブによりストリンジントな条件でハイブリダイゼーションし、アシルCoAオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするものを選択することができる。ここでいうストリンジントな条件とは、特異的なハイブリッドのみが選択的に形成され、シグナルが検出されるが、非特異的なハイブリッドは形成されない条件である。このような条件は個々の生物種により若干異なるが、常法によりハイブリダイゼーションと

洗いの際の塩濃度又は温度をいくつか検討するのみで容易に決定することができる。このような条件としては、例えば、後記実施例1の項目(4)において特異的なシグナルが観察できることから、ハイブリダイゼーションは、DIG Easy Hyb試薬(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)を用いて37〜42℃で一晩行う。洗いは、0.5×SSC、0.1% SDSを用い、15分間、2回行う。洗いの温度は、45℃以上、好ましくは52℃以上、更に好ましくは57℃以上である。このような条件でハイブリダイズするようなDNAは、アシルCoAオキシダーゼ活性を有するペプチドをコードしている蓋然性が高いが、アシルCoAオキシダーゼ活性を失うような変異を有するものも含まれる。そして配列番号1で表されるアミノ酸配列の70%以上、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アミノ酸配列は本発明に含まれることとなる。そして配列番号2に示される遺伝子配列の70%以上、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遺伝子配列もまた本発明に含まれることとなる。

[0031] なお、配列番号2に示される配列を有するアシルCoAオキシダーゼ遺伝子は、pACO-A300に挿入されて、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(茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)にブタペスト条約の規定下で2003年8月21日付(原寄託)で国際寄託され、受託番号FERM BP-08456が付与されている。

[0032] 上記のようにして得られたアシルCoAオキシダーゼ遺伝子を、大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター及びリボゾーム結合部位等の発現領域を含むDNA配列(The Operon, p. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980を参照)を保有するベクターDNAに挿入し、得られた組み換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌等に形質導入してアシルCoAオキシダーゼ高生産株を得る。

[0033] 用いられるベクターDNAは、如何なるものでもよく、例えば、プラスミドDNA若しくはバクテリオファージDNA等でもよい。具体的には、特開平08-205861号公報記載のpBR系ベクターであるpUTE500K'あるいはこれをpUC系に改良した実施例1の項目(6)に示されるpUTE300K'等を用いることができる。得られた組み換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌K-12、好ましくは大腸菌JM109(宝酒造社製)、DH5α(宝酒造社製)等を形質転換又はそれらに形質導入して夫々の菌株を得る。

- [0034] 上記のようにして得られたアシルCoAオキシダーゼ生産能を有する形質転換体又は形質導入体、例えば、エッシェリシア属に属する菌株を用いてアシルCoAオキシダーゼを生産するには、下記のようにして行うことができる。上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。
- [0035] また、上記微生物を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーあるいは大豆もしくは小麦麴の浸出液等、1種以上の窒素源に、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。
- [0036] なお、培地の初発pHは、例えば、7〜9に調整するのが適当である。また培養は、例えば、30〜42℃、好ましくは37℃前後で6〜24時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりアシルCoAオキシダーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。
- [0037] 培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離し、洗菌する。この菌体からアシルCoAオキシダーゼを採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破碎機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチームの如き細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトンX-100等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からアシルCoAオキシダーゼを採取するのが好ましい。
- [0038] このようにして得られた粗酵素液からアシルCoAオキシダーゼを単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫安塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を適宜組み合わせて行うのが好ましい。
- [0039] 本発明の「SH試薬」とは、SH基と反応する試薬をいい、チオール試薬、スルフヒドリル試薬ともいう。例えば、N-エチルマレイミド(NEM)等のマレイミド誘導体、ヨード酢酸、ヨード酢酸アミド、p-メルクリ安息香酸(PMB)、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安

息香酸) (DTNB) 等が挙げられる。

[0040] また、本発明の「SH試薬に対する安定性が優れた」とは、以下に述べる活性測定方法及び安定性測定方法に記載した反応条件下で、10mMのSH試薬の存在下、pH7.5において37℃、4時間処理した後の残存活性比が処理前の活性に対して40%以上、好ましくは60%以上残存していることをいう。SH試薬に対する安定性が優れたアシルCoAオキシダーゼは、SH試薬を共存させた酵素含有製品等の保存性が著しく向上するため、産業上極めて有用である。

[0041] アシルCoAオキシダーゼの活性の測定方法及び安定性の測定方法は、種々の方法を用いることができ、一例として、以下に、本発明で用いるアシルCoAオキシダーゼ活性の測定方法及び安定性測定方法について説明する。

[0042] (アシルCoAオキシダーゼ活性の測定方法)

0.2M Tris-HCl緩衝液(pH7.5) 0.9ml、0.1% パルミトイルCoA溶液 0.1ml、15mM Toos溶液 0.04ml、150U/mlペルオキシダーゼ溶液 0.04ml、1.76% 4-アミノアンチピリン溶液 0.02mlの混合液を37℃で5分間インキュベートし、アシルCoAオキシダーゼサンプルを0.05ml添加、混合する。全容1.15mlを37℃で3分間反応させ、反応開始から3分間の、反応溶液の555nmにおける吸光度の変化を分光光度計を用いて測定する。酵素1Uは、上記測定条件下において、1分間あたり1 μ molの過酸化水素を生成する酵素量とする。

[0043] (NEM安定性測定方法)

各種アシルCoAオキシダーゼを0.1mM FADを含む200mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)にて夫々約10U/mlの濃度とし、各酵素溶液に0.1mM FAD及び20mM NEMを含む200mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を夫々等量添加し、NEMの濃度を10mMとする。本酵素液(約5U/ml)を37℃にて4時間放置する。保存前及び保存後のサンプルの酵素活性を測定し、残存活性比を求めることで安定性を評価する。

実施例

[0044] 以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

[0045] 実施例1:アシルCoAオキシダーゼ遺伝子のクローニング

(1) *Arthrobacter ureafaciens* (IFO 12140) 染色体DNAの調製

Arthrobacter ureafaciens (IFO 12140) をLB寒天培地〔バクトトリプトン1% (W/V), 酵母エキス0.5% (W/V), NaCl 0.5% (W/V) 及び寒天1.4% (W/V)〕に接種し、37℃で培養した。培地表面に生育した菌体を集菌した。この菌体よりG NOME DNA Isolation Kit (フナコシ社製) を用いて、染色体DNAを100 μ g得た。

[0046] (2) アシルCoAオキシダーゼ遺伝子の部分断片の取得1

次いで、日本DNAデータバンクの国際塩基配列データベースを用いて、各種アシルCoAオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性検索を行い、相同性が高いアミノ酸配列部分を基に、コドンが縮重している箇所を混合塩基とした複数のPCR用プライマーを作製した。項目(1)で調製した染色体DNAを鋳型とし、Ex Taq DNA ポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCR反応は、PCRマスターサイクラーグラジェント(エッペンドルフ社製)にて、熱変性94℃、2分、アニール58℃、30秒、伸長反応72℃、1分の条件下、30サイクル行った。結果としてセンスプライマーが5'-TTYGCNATGACNGARATHGGNCA YGG-3' (配列番号3; 26 mer, Aは、アデニン、Cは、シトシン、Gは、グアニン、Tは、チミン、Hは、アデニン、シトシン又はチミン、Nは、アデニン、シトシン、グアニン又はチミン、Rは、アデニン又はグアニン、Yは、チミン又はシトシンを示す。対応するアミノ酸配列: Phe Ala Met Thr Glu Ile Gly His Gly (配列番号4))、アンチセンスプライマーが5'-TGYTG CATNARNACNGTRTTRTCNCCYTC-3' (配列番号5; 29mer, 対応するアミノ酸配列: Glu Gly Asp Asn Thr Val Leu Met Gln Gln (配列番号6))であるとき、0.9kbp程度に相当する遺伝子断片が増幅された。

[0047] 増幅したDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動後のゲルより回収し、pT7Blue T Vector (宝酒造社製) に組み込み、組み換え体プラスミドを得た。該プラスミド中の挿入DNAの塩基配列を、マルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000 (ベクマン・コールター社製) を用いて決定した。その結果、DNA断片(841bp)が、PCRのプライマー設計に用いたペプチドのアミノ酸配列を正しくコードする塩基配列を両端に有していた。また、決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列中には、既知

のアシルCoAオキシダーゼの内部アミノ酸配列と相同性が認められた。従って、得られた増幅DNA断片は、本発明のアシルCoAオキシダーゼ遺伝子の一部分(部分遺伝子)であることが判明した。

[0048] (3) アシルCoAオキシダーゼ遺伝子の部分断片の取得2

先にクローニングしたCorynebacterium sp. 2-3-1 (FERM BP-6183)由来のアシルCoAオキシダーゼ(特願2003-276393号明細書;アミノ酸配列を配列番号7に、遺伝子の塩基配列を配列番号8に示す)と部分遺伝子配列の相同性が極めて高かったことから、Corynebacterium sp. 2-3-1由来のアシルCoAオキシダーゼの遺伝子配列に基づいてプライマーを作製し、項目(1)で調製した染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。Ex Taq DNA ポリメラーゼ(宝酒造社製)を用い、熱変性94℃、30秒、アニール58℃、30秒、伸長反応72℃の条件下、30サイクル行った結果、Corynebacterium sp. 2-3-1由来アシルCoAオキシダーゼの5'末端側の塩基配列情報をもとに設計したセンスプライマー 5'-AGATCACCGATTGGCTTTGCCTGGG-3' (配列番号9;25 mer)及び項目(2)の遺伝子配列をもとに作製したアンチセンスプライマー 5'-GGCCGTTGTGGCAATGCTGGCGACGT-3' (配列番号10;26 mer)を用いてPCRを行った場合、増幅DNA(約0.6kb p)を得ることができた。

[0049] 本増幅DNA断片1%アガロースゲル電気泳動後のゲルより回収し、pT7Blue T Vector(宝酒造社製)に組み込み、組み換え体プラスミドを得た。該プラスミド中の挿入DNAの塩基配列を、マルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000(ベックマン・コールター社製)を用いて決定した。決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列には、既知のアシルCoAオキシダーゼの内部アミノ酸配列と高い相同性が認められた。また、推定されたアミノ酸配列の上流側には終止コドンの10アミノ酸の後にメチオニンが存在していたことから、このメチオニンをコードするATGが本アシルCoAオキシダーゼをコードする遺伝子の5'末端であると推定された。

[0050] (4) Arthrobacter ureafaciens (IFO 12140) 染色体DNAのサザンブロット解析
次に、項目(1)で調製した染色体DNA2 μ gを、制限酵素SmaIを用い、37℃で5時間消化した。得られた制限酵素消化DNAを0.7%アガロースゲル電気泳動に供

した。泳動後、サザンブロット法により、ナイロン膜(Hybond-N+, アマシャムファルマシアバイオテック社製)にDNAを転写した。ハイブリダイゼーションのプロープとしては、項目(2)で得られたプラスミド遺伝子を鋳型とし、項目(2)で使用したプライマーを用いて、PCR Dig ラベリングミックス(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)存在下でPCR増幅させたものを使用した。PCRの反応条件等は、上記(2)と同様に行った。

[0051] 上記のナイロン膜を2×SSC(0.3M NaCl, 0.03Mクエン酸ナトリウム;pH7.0)で洗浄後、DIGシステムを用い、ユーザーガイド(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)に従い、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行った後のナイロン膜の洗浄は、0.1% SDS含有2×SSC(15mM NaCl, 1.5mMクエン酸ナトリウム;pH7.0)で室温にて5分間、2回ののち、0.1% SDS含有0.1×SSCで68℃にて15分間、2回行った。

[0052] その結果、約2.5kbpの位置にハイブリダイズしたプロープに由来するシグナルが認められた。

[0053] (5)アシルCoAオキシダーゼ遺伝子の部分断片の取得3

上記の結果に基づき、SmaI消化した染色体DNA10 μ gを1.0%アガロースゲル電気泳動で分離し、約2.5kbpの大きさに相当する位置のアガロースゲルを切り出した。ゲルからGENE CLEAN II(フナコシ社製)によりDNA断片を抽出精製し、該DNA断片をSmaI処理したpUC19 Vector(宝酒造社製)に組み込み、組み換え体プラスミドを得た。本プラスミドを鋳型とし、(2)の部分遺伝子配列をもとに作製したセンスプライマー 5'-CAGACCTGGATGTCTACGTCACCTT-3' (配列番号11;25 mer)及びpUC19 Vectorの遺伝子配列をもとに作製したアンチセンスプライマー 5'-GGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT-3' (配列番号12;25 mer)を用いてPCRを行った。Ex Taq DNA ポリメラーゼ(宝酒造社製)を用い、熱変性94℃, 30秒、アニール58℃, 30秒、伸長反応72℃, 3分の条件下、30サイクル行った。結果として増幅DNA(約1.0kbp)を得ることができた。

[0054] 本増幅DNA断片1%アガロースゲル電気泳動後のゲルより回収し、pT7Blue T Vector(宝酒造社製)に組み込み、組み換え体プラスミドを得た。該プラスミド中の挿

入DNAの塩基配列を、マルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000(ベックマン・コールター社製)を用いて決定した。決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列には、既知のアシルCoAオキシダーゼの内部アミノ酸配列と高い相同性が認められ、終止コドンであるTAGが含まれていることがわかった。結果として、アシルCoAオキシダーゼをコードする遺伝子の3'末端まで及び3'末端より下流側193bpの塩基配列情報を得た。

[0055] (6) 全長アシルCoAオキシダーゼ遺伝子のクローニング及びアシルCoAオキシダーゼ生産株の取得

先ず、上記の操作で得られた塩基配列に基づき、アシルCoAオキシダーゼ遺伝子の5'末端あるいは3'末端を含むオリゴヌクレオチド(計30塩基のオリゴヌクレオチド、3'末端側は相補鎖)を設計した。このプライマー中にNdeI部位を組み込んでおき、PCRで増幅した産物を、NdeIを作用させて消化することにより、コーディング領域が得られるようにしておいた。すなわち、5'-ACAGAAGGAAGGCATATGACAG AAGTAGTG-3' (配列番号13; 30 mer)、アンチセンスプライマーとして5'-GG CGTTTGTAACCATATGCTAGCGGGACTT-3' (配列番号14; 30 mer)を合成した。項目(2)で調製した染色体遺伝子を鋳型とし、合成プライマー及びKOD Plus ポリメラーゼ(東洋紡社製)を用い、熱変性94℃, 15秒、アニーリング56℃, 30秒、伸長反応68℃, 4分00秒の条件下、30サイクル行った。結果として増幅DNA(約2.1kbp)が得られ、これをNdeIで消化して、アシルCoAオキシダーゼをコードする領域のDNAを得ることができた。

[0056] 得られたDNAを、大腸菌ラクトースオペロン等に由来するプロモーター、オペレーター及びリボゾーム結合部位等の発現領域を含むDNA配列(The Operon, p. 227, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980を参照)を保有するpBR系ベクターpUTE500K'(特開平08-205861号公報記載)をpUC系に改良したpUTE300K'のNdeI部位に挿入し、組み換え体プラスミドDNA pACO-A300を得た。D. M. Morrisonの方法(Methods in Enzymology, 68, p. 326-331, 1979)に従い、組み換え体プラスミドDNA pACO-A300を用いて大腸菌(E. coli)JM109(宝酒造社製)を形質転換し、形質転換株、大腸菌(E. coli)JM109(pACO-A300)を得

た。菌体よりQIAGEN tip-100(キアゲン社製)を用いて組み換え体プラスミドpACO-A300を抽出して精製し、組み換え体プラスミドを100 μ g得た。

[0057] 該プラスミド中の挿入DNAの塩基配列を、マルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000(ベックマン・コールター社製)を用いて決定した。染色体DNAを鋳型とした複数ロットのPCRを行うことにより、errorが入っていないことを確認した。決定したアシルCoAオキシダーゼ遺伝子の塩基配列を配列番号2に、また、該DNA配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に夫々示した。pACO-A300に挿入されているアシルCoAオキシダーゼ遺伝子のORFは、2109bp、703アミノ酸からなっていることが判明した。なお、pACO-A300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(茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)にブタペスト条約の規定下で2003年8月21日付(原寄託)で国際寄託され、受託番号FERM BP-08456が付与されている。

[0058] 得られた大腸菌(E. coli)JM109(pACO-A300)を、LB-IPTG-amp培地〔バクトトリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)、イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド(1mM)及びアンピシリン(50 μ g/ml)]にて37°Cで10時間振とう培養した後、アシルCoAオキシダーゼ活性を測定したところ、0.2U/mlであった。

[0059] 実施例2:アシルCoAオキシダーゼの製造法

大腸菌(E. coli)JM109(pACO-A300)を実施例1の項目(6)の方法にて50mlの培地で培養し、アシルCoAオキシダーゼを生産させた。本培養液から、特公昭58-40466号公報記載の方法により、精製アシルCoAオキシダーゼ溶液を得た。

[0060] 実施例3:アシルCoAオキシダーゼのNEMに対する安定性の評価

実施例2にて調製した組み換えアシルCoAオキシダーゼ及び市販の精製Arthrobacter sp. 由来アシルCoAオキシダーゼ(Sigma社)及びCandida sp. 由来アシルCoAオキシダーゼ(Sigma社)を夫々0.1mM FADを含む200mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)にて約10U/mlの濃度とし、各酵素溶液に0.1mM FAD及び20mM NEMを含む200mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を夫々等量添加し、NEMの濃度を10mMとした。本酵素液(約5U/ml)を37°Cにて放置し、保存

前及び保存後のサンプルの酵素活性を測定して残存活性比を求めることで安定性を評価した。図1に示したとおり、*Arthrobacter ureafaciens* (IFO 12140) 由来アシルCoAオキシダーゼは、市販の2種のアシルCoAオキシダーゼよりNEM共存下での安定性が高く、4時間放置後も約65%の残存活性が認められた。

- [0061] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許および特許出願は、その全文を参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

- [0062] 本発明によれば、SH試薬共存下において安定性の優れたアシルCoAオキシダーゼが提供される。SH試薬共存下において安定性の優れた、本発明アシルCoAオキシダーゼは、診断用酵素等として測定用キットに有利に利用でき、産業上有用である。

図面の簡単な説明

- [0063] [図1]図1は、本発明アシルCoAオキシダーゼのNEMに対する安定性を示すグラフである。○は*Arthrobacter ureafaciens* (IFO 12140) 由来アシルCoAオキシダーゼ (pACO-A300)、△は*Arthrobacter* sp. 由来アシルCoAオキシダーゼ (Sigma社)、□は*Candida* sp. 由来アシルCoAオキシダーゼ (Sigma社)を用いた結果を示す。

配列表フリーテキスト

- [0064] 配列番号3、5及び9～14: 合成オリゴヌクレオチド (式中、HはA、C又はTを表し、RはA又はGを表し、YはT又はCを表し、NはA、C、G又はTを表す)

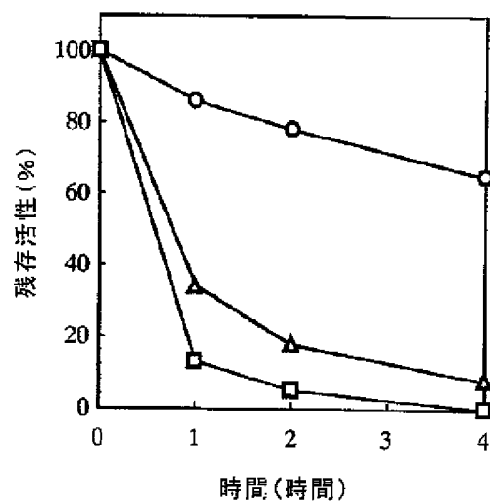
配列番号4及び6: ペプチド

請求の範囲

- [1] 10mMのSH試薬存在下、pH7.5において37℃、4時間の処理で40%以上の残存活性を示すことを特徴とするアシルCoAオキシダーゼ。
- [2] 10mMのSH試薬存在下、pH7.5において37℃、4時間の処理で60%以上の残存活性を示すことを特徴とするアシルCoAオキシダーゼ。
- [3] 以下の(a)又は(b)のアシルCoAオキシダーゼ。
 - (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシルCoAオキシダーゼ活性を有するタンパク質
- [4] 以下の(a)又は(b)のアシルCoAオキシダーゼをコードする遺伝子。
 - (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシルCoAオキシダーゼ活性を有するタンパク質
- [5] 以下の(a)又は(b)のDNAからなるアシルCoAオキシダーゼ遺伝子。
 - (a) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNA
 - (b) (a)の塩基配列からなるDNA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、かつアシルCoAオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA
- [6] 請求項4又は5記載のアシルCoAオキシダーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNA。
- [7] 請求項6記載の組み換え体DNAを含む形質転換体又は形質導入体。
- [8] 請求項7記載の形質転換体又は形質導入体を培地に培養し、培養物からアシルCoAオキシダーゼを採取することを特徴とするアシルCoAオキシダーゼの製造法。

1/1

[図1]



○: Arthrobacter ureafaciens (IFO 12140) 由来

アシルCoAオキシダーゼ (pACO-A300)

△: Arthrobacter sp. 由来アシルCoAオキシダーゼ (Sigma社)

□: Candida sp. 由来アシルCoAオキシダーゼ (Sigma社)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIZUNO, K. et al., "A New Enzymatic Method for Colorimetric Determination of Free Fatty Acids", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, (1980), Vol.108, No.1, pages 6 to 10, full text	1-8
A	JP 57-29998 A (Nippon Shoji Kaisha, Ltd.), 25 June, 1982 (25.06.82), Full text & DE 2944498 A	1-8
A	JP 56-61991 A (Toyo Jozo Co., Ltd.), 27 May, 1981 (27.05.81), Full text & US 4346173 A & GB 2064544 A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 October, 2004 (29.10.04)

Date of mailing of the international search report
22 November, 2004 (22.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011461

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 05-260956 A (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH.), 12 October, 1993 (12.10.93), Full text & EP 0541108 A & DE 4136844 A	1-8
A	JP 2000-316600 A (Toyobo Co., Ltd.), 21 November, 2000 (21.11.00), Par. No. [0006] (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N 15/53, C12N 9/02, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, WPIDS (STN)

SwissProt/PIR/GeneSeq

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MIZUNO, K. et. al., "A New Enzymatic Method for Colorimetric Determination of Free Fatty Acids", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, (1980), Vol.108, No.1, pp.6-10, 全文	1-8
A	JP 57-29998 A, (日本商事株式会社), 1982.06.25, 全文 & DE 2944498 A	1-8
A	JP 56-61991 A, (東洋醸造株式会社), 1981.05.27, 全文 & US 4346173 A & GB 2064544 A	1-8

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.10.2004

国際調査報告の発送日

22.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4B

3334

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 05-260956 A, (ゲゼルシャフト フュア ビオテクノロジー フォルシュング エムベハー), 1993. 10. 12, 全文 & EP 0541108 A & DE 4136844 A	1-8
A	JP 2000-316600 A, (東洋紡績株式会社), 2000. 11. 21, 段落【0006】 (ファミリーなし)	1-8