

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3958884号

(P3958884)

(45) 発行日 平成19年8月15日(2007.8.15)

(24) 登録日 平成19年5月18日(2007.5.18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 19/12 (2006.01)

C 1 2 P 19/12

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/24

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1/06 (2006.01)

C 1 2 N 9/24

C 1 2 R 1:06

請求項の数 9 (全 83 頁)

(21) 出願番号 特願平11-16931

(22) 出願日 平成11年1月26日(1999.1.26)

(65) 公開番号 特開2000-228980(P2000-228980A)

(43) 公開日 平成12年8月22日(2000.8.22)

審査請求日 平成16年7月21日(2004.7.21)

(31) 優先権主張番号 特願平10-258394

(32) 優先日 平成10年9月11日(1998.9.11)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願平10-352252

(32) 優先日 平成10年12月11日(1998.12.11)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-6450

(73) 特許権者 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 山本 拓生

岡山県岡山市桑野525番3

(72) 発明者 丸田 和彦

岡山県岡山市桑野525番3

(72) 発明者 久保田 倫夫

岡山県岡山市四御神1番30

(72) 発明者 福田 恵温

岡山県岡山市阿津2189番地

(72) 発明者 三宅 俊雄

岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号

審査官 松田 芳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに該酵素を用いる糖質の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

還元性澱粉部分分解物に下記の理化学的性質を有する非還元性糖質生成酵素を作用させるか、又は当該非還元性糖質生成酵素とともに下記の理化学的性質を有するトレハロース遊離酵素を作用させて非還元性糖質又はトレハロースを生成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はトレハロースを含む低還元性糖質を採取する工程とを含んでなる糖質の製造方法。

非還元性糖質生成酵素：

(1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。 10

(2) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、 $75,000 \pm 10,000$ ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、 $pI 4.5 \pm 0.5$ 。

(4) 至適温度

pH 6.0、60分間反応で、50。

(5) 至適 pH

50、60分間反応で、pH 6.0。

(6) 温度安定性

pH 7.0、60分間保持で、55℃まで安定。

(7) pH安定性

4℃、24時間保持で、pH 5.0乃至10.0の範囲で安定。

トレハロース遊離酵素：

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、 $62,000 \pm 10,000$ ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、 $pI 4.7 \pm 0.5$ 。

(4) 至適温度

pH 6.0、30分間反応で、50℃乃至55℃。

(5) 至適 pH

50℃、30分間反応で、pH 6.0。

(6) 温度安定性

pH 7.0、60分間保持で、50℃まで安定。

(7) pH安定性

4℃、24時間保持で、pH 4.5乃至10.0の範囲で安定。

【請求項2】

非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素が、アルスロバクター属に属する細菌由来である請求項1記載の糖質の製造方法。

【請求項3】

アルスロバクター属に属する細菌が、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERMBP-6450) である請求項2記載の糖質の製造方法。

【請求項4】

非還元性糖質生成酵素が、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を含有する請求項1乃至3のいずれかに記載の糖質の製造方法。

【請求項5】

トレハロース遊離酵素が、配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列を含有する請求項1乃至3のいずれかに記載の糖質の製造方法。

【請求項6】

還元性澱粉部分分解物が、澱粉又は澱粉質に酸及び/又は澱粉加水分解酵素を作用させて得られるグルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物である請求項1乃至5のいずれかに記載の糖質の製造方法。

【請求項7】

非還元性糖質を生成させる工程において、
- アミラーゼ、
- アミラーゼ、グルコアミラーゼ、澱粉枝切り酵素、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ及び/又は
- グルコシダーゼをさらに作用させる請求項1乃至6のいずれかに記載の糖質の製造方法。

【請求項8】

非還元性糖質が
- グルコシルトレハロース、
- マルトシルトレハロース、
- マルトトリオシルトレハロース、
- マルトテトラオシルトレハロース又は
- マルトペンタオシルトレハロースである請求項1乃至7のいずれかに記載の糖質の製造方法。

【請求項9】

トレハロースが含水結晶又は無水結晶である請求項1乃至8のいずれかに記載の糖質の製造方法。

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに該酵素を用いる糖質の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

トレハロースは2分子のグルコースが還元性基同士で結合してなる二糖類であり、自然界においては、細菌、真菌、藻類、昆虫、甲殻類などに広く分布している。トレハロースは、還元性を示さず、且つ、水分保持作用を有する有用性の高い糖質として古くより知られ、食品、化粧品、医薬品をはじめとする広範な分野での用途が期待されてきた。しかしながらトレハロースは、その効率的な製造方法がかつては確立されていなかったために、その期待の大きさに反して利用の範囲は極めて限られていた。このことから、斯界においては、トレハロースが安価に供給されることが待ち望まれていた。

10

【0003】

先に、本発明者らは、鋭意研究の結果、斯かる要望に応える提案のひとつとして、澱粉原料から酵素的にトレハロースを生成させるトレハロースの製造方法を確立した。この方法は、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する非還元性糖質生成酵素と、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有するトレハロース遊離酵素とを、還元性澱粉部分分解物に作用させることを特徴とする。これらの酵素ならびに当該酵素を用いるトレハロースを含む糖質の製造方法は、同じ特許出願人による特開平7-143876号公報、特開平7-213283号公報、特開平7-322883号公報、特開平7-298880号公報、特開平8-66187号公報、特開平8-66188号公報、特開平8-73504号公報、特開平8-84586号公報及び特開平8-336388号公報に開示されている。斯くしてトレハロースの安価な供給への道が拓かれた。

20

【0004】

更に、この研究の過程で、斯かる非還元性糖質生成酵素が、従来の還元性澱粉部分分解物の抱える問題点を解消し得る新規な非還元性糖質の製造にも有用であるという独自の知見も見出された。各種デキストリンや各種マルトオリゴ糖などの還元性澱粉部分分解物は、甘味料やエネルギー用糖源などとして有用である一方、その還元力故に反応性に富み、アミノ酸や蛋白質との共存下では褐変しやすく、品質が劣化しやすいことが問題となっていた。斯かる問題を解消し得る唯一の方法として、還元性澱粉部分分解物を高圧水素添加法などにより糖アルコールに変換する方法が知られていた。然るに、斯かる方法の実施には多量の熱量が必要な上、水素を使用することから、安全面を考慮に入れた設備を必要とし、結果として、多大な費用と労力を要することにつながっている。これに対し、上記の非還元性糖質生成酵素は、上記でも示したように、還元性澱粉部分分解物に作用して、末端部にトレハロース構造を有する非還元性の糖質を生成する作用を有しており、この作用は酵素作用故に温和な条件下で進行するものである。この作用を利用して、本発明者らは、当該酵素を用いる、従来の還元性澱粉部分分解物における問題点を解消し得る新規な非還元性糖質の効率的な製造方法の確立にも至った。以上によってトレハロースならびに非還元性糖質の用途開発が各方面で盛んになり、その結果、斯かる糖質の用途が多様化するとともに、その需要は諸種の分野において現在急速に伸びつつある。

30

40

【0005】

このような状況下、トレハロースならびにトレハロース構造を有する非還元性糖質の製造のさらなる効率化への期待が斯界では高まっている。斯かる期待に応える方策のひとつは、様々な至適条件を有する非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素を確立し、製造に使用可能な酵素の幅広い給源を提供することにある。これによって、目的とする糖質の製造に併用される他の酵素の至適条件や製造設備、製造する糖質の最終用途などに

50

よって要求される製造条件に応じて、多種の酵素の中から最適のものを選択することができ、より効率的な糖質の製造が可能なものとなる。然るに、現在までに開示された非還元性糖質生成酵素は、その至適温度に基づいて分類すると、約40以下という比較的低温域に至適温度を有する酵素群と、約60以上という比較的高温域に至適温度を有する酵素群とに分けられる。また、現在までに開示されたトレハロース遊離酵素は、同様に分類すると、約45以下という比較的低温域に至適温度を有する酵素群と、約60以上という比較的高温域に至適温度を有する酵素群とに分けられる。これに対して、例えば、50付近というような中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素についてはいずれも未だ開示がない。

【0006】

澱粉原料からの糖質の製造に用いられる糖質関連酵素において、主要なある種の酵素群は中温域に至適温度を有している。これらの酵素は、上記トレハロースならびに非還元性糖質の製造においても必要とされる場合がある。然るに、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素は未だ確立されていないために、これら両酵素のいずれか一方又は双方とともに、上記の如き糖質関連酵素を併用する糖質の製造は、未だ十分に効率的と言えるものが確立されてはいない。また、糖質の製造設備や糖質の最終用途によっては、製造における酵素反応の温度として中温域が要求される場合がある。このような場面に対応し得る、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を用いる効率的な糖質の製造方法も未だ確立されていると言える状況にはない。以上のことから、斯界においては、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素が確立され、斯かる酵素を用いる、非還元性糖質を含む糖質の製造方法が確立されることが待ち望まれている。

【0007】

斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素を提供することにある。

【0008】

この発明の第二の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0009】

この発明の第三の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素の製造方法を提供することにある。

【0010】

この発明の第四の課題は、中温域に至適温度を有するトレハロース遊離酵素を提供することにある。

【0011】

この発明の第五の課題は、斯かるトレハロース遊離酵素をコードするDNAを提供することにある。

【0012】

この発明の第六の課題は、斯かるトレハロース遊離酵素の製造方法を提供することにある。

【0013】

この発明の第七の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素及び/又は斯かるトレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を提供することにある。

【0014】

この発明の第八の課題は、斯かる非還元性糖質生成酵素及び/又は斯かるトレハロース遊離酵素を用いる、非還元性糖質を含む糖質の製造方法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決し得る酵素を産生する微生物を土壌より広く検索した。その結果、兵庫県赤穂市の土壌から新たに分離した微生物が上記課題を解決し得る酵素を

10

20

30

40

50

產生することを見出した。当該微生物より目的とする非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素をそれぞれ単離し、それらの性質を決定したところ、単離されたこれらの酵素は、いずれも中温域に至適温度を有することが確認された。一方、当該微生物を同定したところ、アルスロバクター（*Artthrobaacter*）属に属する新規微生物であることが確認され、アルスロバクター・スピーシーズ S34 と命名された。なお、アルスロバクター・スピーシーズ S34 は、平成 10 年 8 月 6 日付けで、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号、通商産業省工業技術院生命工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号 FERM BP - 6450 を付して受託された。

【0016】

本発明者らは、さらに鋭意研究を続け、上記で確認された酵素をコードする DNA をアルスロバクター・スピーシーズ S34（FERM BP - 6450）より単離し、その塩基配列を解読して、当該酵素のアミノ酸配列を決定した。また、アルスロバクター・スピーシーズ S34（FERM BP - 6450）ならびに、先に得た DNA を常法にしたがい微生物に導入して得た形質転換体は、いずれも所望量の酵素を産生し得ることが確認された。斯くして得られる両酵素は、いずれも、トレハロースならびにトレハロース構造有する非還元性糖質を含む糖質の中温域での製造に有利に用い得るものであることも確認された。この発明は以上の知見に基づき完成されたものである。

【0017】

すなわち、この発明は、前記第一の課題を、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成し、中温域に至適温度を有する新規な非還元性糖質生成酵素により解決するものである。

【0018】

この発明は、前記第二の課題を、斯かる非還元性糖質生成酵素をコードする DNA により解決するものである。

【0019】

この発明は、前記第三の課題を、斯かる非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を培養し、産生した非還元性糖質生成酵素を培養物から採取することを特徴とする非還元性糖質生成酵素の製造方法により解決するものである。

【0020】

この発明は、前記第四の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解し、中温域に至適温度を有する新規なトレハロース遊離酵素により解決するものである。

【0021】

この発明は、前記第五の課題を、斯かるトレハロース遊離酵素をコードする DNA により解決するものである。

【0022】

この発明は、前記第六の課題を、斯かるトレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を培養し、産生した非還元性糖質生成酵素を培養物から採取することを特徴とするトレハロース遊離酵素の製造方法により解決するものである。

【0023】

この発明は、前記第七の課題を、アルスロバクター・スピーシーズ S34（FERM BP - 6450）及びその変異株から選ばれる微生物により解決するものである。

【0024】

この発明は、前記第八の課題を、当該非還元性糖質生成酵素及び／又は当該トレハロース遊離酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させて非還元性糖質を生成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する工程とを含んでなる糖質の製造方法により解決するものである。

【0025】

【発明の実施の形態】

この発明は、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素ならびに該酵素のいずれか

10

20

30

40

50

一方又は双方を用いる糖質の製造方法に関するものである。本明細書でいう非還元性糖質生成酵素とは、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する酵素を意味する。本明細書でいうトレハロース遊離酵素とは、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有する酵素を意味する。本明細書でいう中温域とは、酵素反応による澱粉原料からの糖質の製造において通常用いられる反応温度における中間域を意味する。因みに、斯かる製造においては、多くの場合、約10乃至約100又はその前後の範囲の種々の反応温度が用いられる。この発明の非還元性糖質生成酵素とは、非還元性糖質生成酵素としての作用を有し、中温域、望ましくは、40を越え且つ60未満の範囲に至適温度を有する酵素、より望ましくは、斯かる至適温度に加え、酸性域に至適pHを有する酵素を意味する。この発明のトレハロース遊離酵素とは、トレハロース遊離酵素としての作用を有し、中温域、望ましくは、45を越え且つ60未満の範囲に至適温度を有する酵素、より望ましくは、斯かる至適温度に加え、酸性域に至適pHを有する酵素を意味する。以上の如きこの発明の非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素はその出所・由来により限定されるものではない。

10

【0026】

非還元性糖質生成酵素の活性は以下のようにして測定する。すなわち、基質として1.25% (w/v) マルトペンタオースを含む20mM酢酸緩衝液 (pH 6.0) 4mlに、酵素液1mlを加え50で60分間保持して反応させた後、100で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を脱イオン水で正確に10倍希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法で測定する。対照として、予め100で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。この発明においては、この測定方法を用いて、1分間に1μmolのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義する。また、本明細書でいう当該酵素の至適温度は、この測定方法に準じて求められる。すなわち、反応温度を50を含む適宜の各種温度に設定して、一定量の当該酵素を用いて、この測定方法に準じて種々の温度条件下で反応させ、引き続き、この測定方法にしたがい各反応系における還元力の減少量を求める。そして、求められた還元力の減少量を相互に比較し、最大の値を示した反応系の反応温度が当該酵素の至適温度と求められる。

20

30

【0027】

トレハロース遊離酵素の活性は以下のようにして測定する。すなわち、基質として1.25% (w/v) マルトトリオシルトレハロース (別名、 α -マルトテトラオシル-D-グルコシド) を含む20mM磷酸緩衝液 (pH 6.0) 4mlに、酵素液1mlを加え50で30分間保持して反応させた後、ソモギー銅液を加え反応を停止させ、還元力をソモギー・ネルソン法で測定する。対照として、予め100で10分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。この発明においては、この測定方法を用いて、1分間に1μmolのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素量を1単位と定義する。また、本明細書でいう当該酵素の至適温度は、この測定方法に準じて求められる。すなわち、反応温度を50を含む適宜の各種温度に設定して、一定量の当該酵素を用いて、この測定方法に準じて種々の温度条件下で反応させ、引き続き、この測定方法にしたがい各反応系における還元力の増加量を求める。そして、求められた還元力の増加量を相互に比較し、最大の値を示した反応系の反応温度が当該酵素の至適温度と求められる。

40

【0028】

この発明の非還元性糖質生成酵素を、そのアミノ酸配列に基づいて説明すると、当該酵素は、全体としては配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を、部分アミノ酸配列としては、配列表における配列番号2乃至6に示すアミノ酸配列を含有する場合がある。この発明の非還元性糖質生成酵素には、以上のアミノ酸配列をそっくりそのまま含有する酵素に加えて、斯かるアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有するものであ

50

っても、それが非還元性糖質生成酵素としての作用を有し、且つ、上述の如き至適温度を有している限り包含される。斯かるアミノ酸配列の一部を含有する当該酵素のアミノ酸配列としては、斯かるアミノ酸配列において、この発明の非還元性糖質生成酵素としての性質の発現に関わる部分アミノ酸配列ないしはアミノ酸残基を保持しつつ、それ以外の部分の1箇所又は2箇所以上にアミノ酸の置換、付加及び/又は欠失を導入してなるアミノ酸配列を挙げることができる。ここでいうアミノ酸の置換を導入してなるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の、望ましくは30%未満、より望ましくは20%未満のアミノ酸を、それぞれ性質や構造の類似する他のアミノ酸で置換してなるものが挙げられる。互いに性質や構造の類似するアミノ酸のグループとしては、例えば、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸、塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンとヒスチジン、アミド型アミノ酸であるアスパラギンとグルタミン、ヒドロキシアミノ酸であるセリンとトレオニン、分岐アミノ酸であるバリンとロイシンとイソロイシン、などが挙げられる。また、配列番号1乃至6に示すアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有する当該酵素のアミノ酸配列の別の例としては、配列番号1のアミノ酸配列の蛋白質がとる立体構造と実質的に同等の立体構造をとり得る、配列番号1のアミノ酸配列にアミノ酸の置換、欠失及び/又は付加を導入してなるアミノ酸配列を挙げることができる。蛋白質の立体構造は、例えば、目的とするアミノ酸配列と関連するアミノ酸配列を有し立体構造が判明している蛋白質を慣用の蛋白質立体構造データベースから検索し、検索された立体構造を参照して、立体構造の視覚化のための慣用のソフトウェアを用いて予測することができる。以上のようなこの発明の非還元性糖質生成酵素のアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して、通常57%以上、望ましくは70%以上、より望ましくは80%以上の相同性を示す。

10

20

【0029】

この発明の非還元性糖質生成酵素は、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではないが、当該酵素の具体例として、例えば、微生物由来のものを挙げることができる。斯かる微生物の具体例としてはアルスロバクター属に属する細菌、より具体的には、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 及びその変異株が挙げられる。当該変異株は、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) を、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタン・スルフォネート、紫外線、トランスポゾンなどの慣用の変異源で常法にしたがい処理して生成する変異株を、中温域、通常は、40℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素の産生能を指標として検索することにより得ることができる。アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号1乃至6に示すアミノ酸配列を含有する。アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) の変異株を含むアルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 以外の微生物由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号1乃至6のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。当該酵素の別の具体例としては、非還元性糖質生成酵素としての作用を有し、中温域、通常は、40℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する組換え型蛋白質が挙げられる。斯かる組換え型蛋白質は、後述のように、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAに通常の遺伝子工学的手法を適用して得ることができる。組換え型蛋白質としての当該酵素は、通常、配列表における配列番号1乃至6のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。

30

40

【0030】

以上の如きこの発明の非還元性糖質生成酵素は、下記の性質を有する場合がある。

(1) 作用

グルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(以下、「SDS-PAGE

50

E」と略記する。)により、約75,000±10,000ダルトン。

(3)等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約4.5±0.5。

(4)至適温度

pH6.0、60分間反応で、約50 付近。

(5)至適pH

5.0、60分間反応で、pH約6.0 付近。

(6)温度安定性

pH7.0、60分間保持で、約55 付近まで安定。

(7)pH安定性

4、24時間保持で、pH約5.0乃至約10.0の範囲で安定。

この発明の非還元性糖質生成酵素は、後記に詳述する、この発明による当該酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。

【0031】

この発明は、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを提供するものでもあり、斯かるDNAは、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に極めて有用である。本発明による当該DNAは、当該非還元性糖質生成酵素をコードするDNA全般を包含するものであり、その出所・由来は問わない。斯かるDNAの具体例としては、例えば、配列表における配列番号7に示す塩基配列又は斯かる塩基配列に相補的な塩基配列の一部又は全てを含有するDNAを挙げることができる。配列表における配列番号7に示す塩基配列の全てを有するDNAは、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードする。配列表における配列番号7に示す塩基配列の一部を含有するDNAとは、それにコードされる蛋白質における、この発明の非還元性糖質生成酵素としての性質の発現に関わるアミノ酸配列ないしはアミノ酸残基に対応する塩基を保持しつつ、それ以外の部分における1箇所又は2箇所以上に塩基の置換、付加及び/又は欠失を導入してなる塩基配列のいずれかを含有するDNAを意味する。本発明による当該DNAには、それがコードするアミノ酸配列を変更することなく、遺伝子の縮重に基づいて塩基の1又は複数を他の塩基で置換した塩基配列を有するDNAも当然ながら包含される。また、この発明による当該DNAには、当該非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列に、それ以外の塩基配列、例えば、開始コドン、終止コドン、シャイン・ダルガノ配列などのリボゾーム結合配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、適宜の制限酵素による認識配列、プロモーターやエンハンサーなど遺伝子の発現を調節する塩基配列、ターミネーター等、組換え型蛋白質の産生のために遺伝子工学分野で慣用される諸種の塩基配列から選ばれる1又は複数を連結してなる塩基配列を含有するDNAも包含される。例えば、配列表における配列番号8に示す塩基配列の一部又は全てはリボゾーム結合配列として機能するので、斯る塩基配列をこの発明の非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列の上流に連結してなるDNAは、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に有用である。

【0032】

本発明による、当該非還元性糖質生成酵素をコードするDNAは、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではない。当該DNAは、当該非還元性糖質生成酵素のアミノ酸配列、例えば、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードし得る塩基配列を含有するDNAとのハイブリダイゼーションに基づいて、諸種の給源からのDNAを検索して得ることができる。斯かる給源の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)及びその変異株を含む当該非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物が挙げられる。斯かる検索には、例えば、遺伝子ライブラリーのスクリーニング法や、PCR法、さらにはこれらの変法など、斯界においてDNAの検索ないしはクローン化に通常用いられる方法が適宜適用される。検索の結果、所期のハイブリダイゼーションが確認されたDNAを常法にしたがって採取すれば、当該DNAは得ることができる。斯くして得られる当該DNAは、通常、配列表における配列番号7に示す塩基配

10

20

30

40

50

列の一部又は全てを含有する。例えば、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) からは、通常、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の全てを含有する D N A が得られる。配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の一部を含有する D N A は、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) 以外の、本発明の非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を給源として得られる D N A を同様にして検索することにより得ることができる。また、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列の一部を含有する D N A は、慣用の突然変異導入法から選ばれる 1 又は複数の方法により、以上の如き D N A の 1 箇所又は 2 箇所以上に塩基の置換、付加及び / 又は欠失を導入して得られる D N A より、この発明の非還元性糖質生成酵素としての性質を有する酵素をコードする D N A を選択することによっても得ることができる。また、当該 D N A は、当該非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列、例えば、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列に基づいて、通常の化学合成を適用することによっても得ることができる。いずれにしても、この発明による D N A は、一旦入手されれば、P C R 法や、自律複製可能なベクターを用いる方法などを適用することにより、所望のレベルにまで容易に増幅することができる。

10

【 0 0 3 3 】

この発明による、当該非還元性糖質生成酵素をコードする D N A は、当該 D N A が自律複製可能なベクターに挿入された、組換え D N A としての形態のものをも包含する。斯かる組換え D N A は、上述のように一旦目的とする D N A が入手できれば、通常一般の遺伝子工学的技術により比較的容易に調製することができる。この発明で用いるベクターは適宜の宿主内で自律複製する性質を有するものであれば何を用いてもよく、斯かるベクターの具体例としては、例えば、大腸菌を宿主として用いる、p U C 1 8、p B l u e s c r i p t I I S K (+)、p K K 2 2 3 - 3 及び g t · C 等、枯草菌を宿主として用いる、p U B 1 1 0、p T Z 4、p C 1 9 4、1 1、1 及び 1 0 5 等、2 種類以上の微生物を宿主として用いる、p H Y 3 0 0 P L K、p H V 1 4、T R p 7、Y E p 7 及び p B S 7 等を挙げることができる。斯かるベクターにこの発明の D N A を挿入するには、斯界において慣用の方法が用いられる。具体的には、上述のようにして得られる当該 D N A と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び / 又は超音波により切断した後、当該 D N A 断片とベクター断片を連結する。D N A の切断に塩基配列に特異的に作用する制限酵素、とりわけ、K p n I、A c c I、B a m H I、B s t X I、E c o R I、H i n d I I I、N o t I、P s t I、S a c I、S a l I、S m a I、S p e I、X b a I、X h o I などを用いれば、当該 D N A 断片とベクター断片を連結するのが容易となる。連結には、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外で D N A リガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換え D N A は、適宜の宿主において無限に複製可能である。

20

30

【 0 0 3 4 】

この発明による、当該非還元性糖質生成酵素をコードする D N A は、さらに、当該 D N A が適宜の宿主に導入された、形質転換体としての形態のものをも包含する。斯かる形質転換体は、通常、上述のようにして得られる D N A ないしは組換え D N A を適宜の宿主に導入して形質転換することにより容易に得ることができる。宿主としては、当該組換え D N A におけるベクターに応じて選択される、斯界において慣用される微生物や、植物、動物由来の細胞を用いることができる。宿主微生物としては、例えば、大腸菌、枯草菌、アルスロバクター属の微生物をはじめとする細菌の他、放線菌、酵母、真菌などはいずれも有利に用いることができる。宿主微生物にこの発明による D N A を導入するには、例えば、公知のコンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。なお、この発明による形質転換体において、当該非還元性糖質生成酵素をコードする D N A は、宿主の染色体から独立した状態にあっても、斯かる染色体に組み込まれた状態にあってもよい。宿主の染色体に組み込まれた当該 D N A は、宿主内で安定して保持されるという特徴があり、組換え型蛋白質の製造に有利な場合がある。

40

【 0 0 3 5 】

50

この発明の非還元性糖質生成酵素は、当該非還元性糖質生成酵素の産生能を有する微生物を培養し、産生された非還元性糖質生成酵素を培養物から採取することを特徴とする、この発明による非還元性糖質生成酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。斯かる製造方法で用いる微生物は、当該非還元性糖質生成酵素の産生能を有するものであれば何を用いてもよく、その種類は問わない。斯かる微生物の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) 及びその変異株をはじめとする微生物や、当該非還元性糖質生成酵素をコードするこの発明による D N A を適宜の宿主微生物に導入して得られる形質転換体を挙げることができる。

【 0 0 3 6 】

この発明による非還元性糖質生成酵素の製造方法における培養で用いる栄養培地は、当該微生物が生育でき、当該非還元性糖質生成酵素を産生し得るものであればよく、特定の組成の培地に限定されるものではない。当該培地は、通常、炭素源及び窒素源を含有し、必要に応じて無機成分が添加される。炭素源としては、当該微生物が資化し得るものであればよく、例えば、デキストリン、澱粉、澱粉部分分解物、グルコースなどの糖質、糖蜜及び酵母エキス等の糖含有物のほか、グルコン酸やコハク酸などの有機酸はいずれも有用である。炭素源の濃度は、その種類に応じて適宜選択されるが、通常、30% (w / v) 以下、より望ましくは、15% (w / v) 以下の条件が適用される。窒素源は、通常、アンモニウム塩や硝酸塩などの無機窒素化合物の他、尿素や、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物から適宜選択される。無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、燐酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などから適宜選ばれる塩類が必要に応じて用いられる。

【 0 0 3 7 】

この発明による当該非還元性糖質生成酵素の製造方法における培養条件は、使用する微生物に応じて、それぞれの微生物の生育に適した条件が適宜に選択される。例えば、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) などのアルスロバクター属に属する微生物を使用する場合、培養温度は通常、20乃至50、望ましくは、25乃至37、培養 pH は通常 pH 4 乃至 10、望ましくは、pH 5 乃至 9、培養時間は10乃至150時間から選ばれ、好気条件下で培養される。一方、当該非還元性糖質生成酵素をコードする D N A を宿主微生物に導入してなる形質転換体を使用する場合、宿主の微生物種やベクターの種類にもよるが、培養温度は通常、20乃至65、培養 pH は通常、pH 2 乃至 9、培養時間は通常、1乃至6日間から選ばれ、好気条件下で培養される。斯くして得られる培養物は、通常、主としてその菌体画分に当該酵素を含有する。一方、枯草菌などを宿主として得た形質転換体を培養する場合には、形質転換に用いるベクターの種類によっては、斯かる培養物は、主としてその上清画分に当該酵素を含有する場合もある。以上のようにして得られる培養物における当該酵素の含量は、用いる微生物の種類や培養条件などにもよるが、通常、培養物 1 m l 当たりに換算すると 0 . 0 1 乃至 1 , 0 0 0 単位である。

【 0 0 3 8 】

以上のようにして得られる培養物から、この発明の非還元性糖質生成酵素を採取する。培養物からの当該酵素の採取の方法は問わないが、例えば、当該酵素活性が主として認められる菌体又は培養上清のいずれかの画分を分離して採取し、さらに必要に応じて、採取した画分を適宜の精製手段に供して、当該非還元性糖質生成酵素を含有する精製された画分を採取する。培養物における菌体と培養上清との分離には、通常の固液分離手段、例えば、遠心分離のほか、プレコートフィルターや平膜、中空糸膜などを用いる濾過などはいずれも有利に適用できる。斯くして分離される菌体含有画分及び培養上清から所望の画分を採取する。採取する画分が菌体含有画分である場合、斯かる菌体を破碎して菌体破碎物としたり、さらには、菌体破碎物からその可溶性画分を上記の固液分離手段によって、その可溶性画分としての菌体抽出液及び菌体不溶性画分に分離し、所望のいずれかの画分を採

10

20

30

40

50

取することも随意である。菌体不溶性画分は、更に必要に応じて、常法により可溶化して用いることもできる。菌体の破碎には、通常の、超音波処理、界面活性剤処理、リゾチームやグルカナゼなどの細胞壁破壊酵素による処理、機械的磨砕、機械的圧力の負荷などは、いずれも有利に適用できる。また、菌体の破碎には、培養物そのものを直接これらの菌体の破碎方法のいずれかで処理し、上述の固液分離手段のいずれかを適用して液体画分を採取して菌体抽出液を得ることも有利に実施できる。

【0039】

以上のようにして得られる画分から当該非還元性糖質生成酵素をさらに精製するには、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動などの糖質関連酵素を精製するための斯界における慣用の方法が適用され、必要に応じてこれらは適宜組合せて適用される。斯様な方法によって分離される画分の中から、非還元性糖質生成酵素の活性測定に基づき、所期の活性を示した画分を回収すれば、所望のレベルにまで精製された当該酵素を採取することができる。例えば、下記に詳述する実施例に記載の方法によれば、当該酵素は電気泳動的に均質な状態にまで精製することができる。以上のようにして、この発明の製造方法によってこの発明の非還元性糖質生成酵素は、培養物、培養上清画分、菌体含有画分、菌体破碎物、菌体抽出液、菌体不溶性画分とその可溶化物、部分精製酵素含有画分、精製酵素含有画分などとして得られる。当該画分は、さらにトレハロース遊離酵素を含有する場合がある。なお、以上のようにして得られるこの発明の非還元性糖質生成酵素は、常法にしたがい固定化して用いることも随意である。斯かる固定化の方法としては、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが挙げられる。以上のようにして得られる当該非還元性糖質生成酵素は、いずれも、後述するこの発明の糖質の製造方法を含む各種糖質の製造において有利に用いることができる。とりわけ、当該非還元性糖質生成酵素は、中温域に至適温度を有す上、望ましくは、酸性域に至適pHを有しているので、後述するこの発明のトレハロース遊離酵素の他、酸性域に至適pHを有する澱粉枝切り酵素、中温域で良好な活性を示すシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼなどとの併用による糖質の製造に極めて有用である。

【0040】

次に、この発明のトレハロース遊離酵素を、そのアミノ酸配列に基づいて説明すると、当該酵素は、全体としては配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列を、部分アミノ酸配列としては、配列表における配列番号10乃至16に示すアミノ酸配列を含有する場合がある。この発明のトレハロース遊離酵素には、以上のアミノ酸配列をそっくりそのまま含有する酵素に加えて、斯かるアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有するものであっても、それがトレハロース遊離酵素としての作用を有し、且つ、上述の如き至適温度を有している限り包含される。斯かるアミノ酸配列の一部を含有する当該酵素の具体例としては、斯かるアミノ酸配列において、この発明のトレハロース遊離酵素としての性質の発現に関わるアミノ酸配列ないしはアミノ酸残基を保持しつつ、それ以外の部分の1箇所又は2箇所以上にアミノ酸の置換、付加及び/又は欠失を導入してなるアミノ酸配列のいずれかを含有する酵素を挙げることができる。ここでいうアミノ酸の置換を導入してなるアミノ酸配列としては、例えば、配列番号9に示すアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の、望ましくは30%未満、より望ましくは20%未満のアミノ酸を、それぞれ性質や構造の類似する他のアミノ酸で置換してなるものが挙げられる。互いに性質や構造の類似するアミノ酸のグループとしては、例えば、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸、塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンとヒスチジン、アミド型アミノ酸であるアスパラギンとグルタミン、ヒドロキシアミノ酸であるセリンとトレオニン、分岐アミノ酸であるバリンとロイシンとイソロイシン、などが挙げられる。また、配列番号9乃至16に示すアミノ酸配列から選ばれるいずれかの配列の一部を含有する当該酵素のアミノ酸配列の別の例としては、配列番号9のアミノ酸配列の蛋白質がとる立体構造と実質

10

20

30

40

50

的に同等の立体構造をとり得る、配列番号9のアミノ酸配列にアミノ酸の置換、欠失及び/又は付加を導入してなるアミノ酸配列を挙げることができる。蛋白質の立体構造は、例えば、目的とするアミノ酸配列と関連するアミノ酸配列を有し立体構造が判明している蛋白質を慣用の蛋白質立体構造データベースから検索し、検索された立体構造を参照して、立体構造の視覚化のための慣用のソフトウェアを用いて予測することができる。以上のようなこの発明のトレハロース遊離酵素のアミノ酸配列は、配列番号9に示すアミノ酸配列に対して、通常60%以上、望ましくは70%以上、より望ましくは80%以上の相同性を示す。

【0041】

この発明のトレハロース遊離酵素は、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではないが、当該酵素の具体例として、例えば、微生物由来のものを挙げることができる。斯かる微生物の具体例としてはアルスロバクター属に属する細菌、より具体的には、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)及びその変異株が挙げられる。当該変異株は、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)を、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタン・スルフォネート、紫外線、トランスボゾンなどの慣用の変異源で常法にしたがい処理して生成する変異株を、中温域、通常は、45℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有するトレハロース遊離酵素の産生能を指標として検索することにより得ることができる。アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号9乃至16に示すアミノ酸配列を含有する。アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)の変異株を含む、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)以外の微生物由来の当該酵素は、通常、配列表における配列番号9乃至16のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。当該酵素の別の具体例としては、トレハロース遊離酵素としての作用を有し、中温域、通常は45℃を越え且つ60℃未満の範囲に至適温度を有する組換え型蛋白質が挙げられる。斯かる組換え型蛋白質は、後述のように、この発明のトレハロース遊離酵素をコードするDNAに慣用の遺伝子工学的手法を適用して得ることができる。組換え型蛋白質としての当該酵素は、通常、配列表における配列番号9乃至16のいずれかに示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。

【0042】

以上の如きこの発明のトレハロース遊離酵素は、下記の理化学的性質を有する場合がある。

(1) 作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間の結合を特異的に加水分解する。

(2) 分子量

SDS-PAGEにより、約62,000±5,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約4.7±0.5。

(4) 至適温度

pH6.0、30分間反応で、約50℃乃至約55℃付近。

(5) 至適pH

5.0、30分間反応で、pH約6.0付近。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、約50℃付近まで安定。

(7) pH安定性

4.0、24時間保持で、pH約4.5乃至約10.0の範囲で安定。

この発明のトレハロース遊離酵素は、後記に詳述する、この発明による当該酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。

【0043】

この発明は、この発明のトレハロース遊離酵素をコードするDNAを提供するものでもあり、斯かるDNAは、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に極めて有用である。本発明による当該DNAは、当該トレハロース遊離酵素をコードするDNA全般を包含するものであり、その出所・由来は問わない。斯かるDNAの具体例としては、例えば、配列表における配列番号17に示す塩基配列又は斯かる塩基配列に相補的な塩基配列の一部又は全てを含有するDNAを挙げることができる。配列表における配列番号17に示す塩基配列の全てを有するDNAは、配列番号9に示すアミノ酸配列をコードする。配列表における配列番号17に示す塩基配列の一部を含有するDNAとは、それにコードされる蛋白質における、この発明のトレハロース遊離酵素としての性質の発現に関わるアミノ酸配列ないしはアミノ酸残基に対応する塩基を保持しつつ、それ以外の部分における1箇所又は2箇所以上に塩基の置換、付加及び/又は欠失を導入してなる塩基配列のいずれかを含有するDNAを意味する。本発明による当該DNAには、それがコードするアミノ酸配列を変更することなく、遺伝子の縮重に基づいて塩基の1又は複数を他の塩基で置換した塩基配列を有するDNAも当然ながら包含される。また、この発明による当該DNAには、当該トレハロース遊離酵素をコードする塩基配列に、それ以外の塩基配列、例えば、開始コドン、終止コドン、シャイン・ダルガノ配列などのリボゾーム結合配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、適宜の制限酵素による認識配列、プロモーターやエンハンサーなど遺伝子の発現を調節する塩基配列、ターミネーター等、組換え型蛋白質の産生のために遺伝子工学分野で慣用される諸種の塩基配列から選ばれる1又は複数を連結してなる塩基配列を含有するDNAも包含される。例えば、配列表における配列番号8に示す塩基配列の一部又は全てはリボゾーム結合配列として機能するので、斯る塩基配列をこの発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列の上流に連結してなるDNAは、組換え型蛋白質としての当該酵素の製造に有用である。

【0044】

本発明による、当該トレハロース遊離酵素をコードするDNAは、上述のように、特定の出所・由来に限定されるものではない。当該DNAは、当該トレハロース遊離酵素のアミノ酸配列、例えば、配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列の少なくとも一部をコードし得る塩基配列を含有するDNAとのハイブリダイゼーションに基づいて、諸種の給源からのDNAを検索して得ることができる。斯かる給源の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)及びその変異株を含む当該トレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物が挙げられる。斯かる検索には、例えば、遺伝子ライブラリーのスクリーニング法や、PCR法、さらにはこれらの変法など、斯界においてDNAの検索ないしはクローン化に通常用いられる方法が適宜適用される。検索の結果、所期のハイブリダイゼーションが確認されたDNAを常法にしたがって採取すれば、当該DNAは得ることができる。斯くして得られる当該DNAは、通常、配列表における配列番号17に示す塩基配列の一部又は全てを含有する。例えば、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)からは、通常、配列表における配列番号17に示す塩基配列の全てを含有するDNAが得られる。配列表における配列番号17に示す塩基配列の一部を含有するDNAは、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)以外の、本発明のトレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を給源として得られるDNAを同様にして検索することにより得ることができる。また、配列表における配列番号17に示す塩基配列の一部を含有するDNAは、慣用の突然変異導入法から選ばれる1又は複数の方法により、以上の如きDNAの1箇所又は2箇所以上に塩基の置換、付加及び/又は欠失を導入して生成されるDNAより、この発明のトレハロース遊離酵素としての性質を有する酵素をコードするDNAを選択することによっても得ることができる。また、当該DNAは、当該トレハロース遊離酵素をコードする塩基配列、例えば、配列表における配列番号17に示す塩基配列に基づいて、通常の化学合成を適用することによっても得ることができる。いずれにしても、この発明によるDNAは、一旦入手されれば、PCR法や、自律複製可能なベクターを用いる方法などを適用することにより、所望のレベル

10

20

30

40

50

にまで容易に増幅することができる。

【0045】

この発明による、当該トレハロース遊離酵素をコードするDNAは、当該DNAが自律複製可能なベクターに挿入された、組換えDNAとしての形態のものをも包含する。斯かる組換えDNAは、上述のように一旦目的とするDNAが入手できれば、通常一般の遺伝子工学的技術により比較的容易に調製することができる。この発明で用いるベクターは適宜の宿主内で自律複製する性質を有するものであれば何を用いてもよく、斯かるベクターの具体例としては、例えば、大腸菌を宿主として用いる、pUC18、pBluescript II SK(+）、pKK223-3及びgt⁺ C等、枯草菌を宿主として用いる、pUB110、pTZ4、pC194、11、1及び105等、2種類以上の微生物を宿主として用いる、pHY300PLK、pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7等を挙げることができる。斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において慣用の方法が用いられる。具体的には、上述のようにして得られる当該DNAと自律複製可能なベクターとを制限酵素及び/又は超音波により切断した後、当該DNA断片とベクター断片を連結する。DNAの切断に塩基配列に特異的に作用する制限酵素、とりわけ、KpnI、AccI、BamHI、BstXI、EcoRI、HindIII、NotI、PstI、SacI、SalI、SmaI、SpeI、XbaI、XhoIなどを用いれば、当該DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。連結には、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、適宜の宿主において無限に複製可能である。

10

20

【0046】

この発明による、当該トレハロース遊離酵素をコードするDNAは、さらに、当該DNAが適宜の宿主に導入された、形質転換体としての形態のものをも包含する。斯かる形質転換体は、通常、上述のようにして得られるDNAないしは組換えDNAを適宜の宿主に導入して形質転換することにより容易に得ることができる。宿主としては、当該組換えDNAにおけるベクターに応じて選択される、斯界において慣用される微生物を用いることができる。斯かる宿主微生物としては、例えば、大腸菌、枯草菌、アルスロバクター属の微生物をはじめとする細菌の他、放線菌、酵母、真菌などはいずれも有利に用いることができる。斯かる宿主にこの発明によるDNAを導入するには、例えば、公知のコンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。この発明による形質転換体において、当該トレハロース遊離酵素をコードするDNAは、宿主微生物の染色体と独立した状態にあっても、斯かる染色体に組み込まれた状態にあってもよい。宿主微生物の染色体に組み込まれた当該DNAは、宿主内で安定して保持されるという特徴があり、組換え型蛋白質の製造に有利な場合がある。

30

【0047】

なお、以上ならびに先述の、組換えDNA及び形質転換体を含むこの発明によるDNAを得るための個々の方法や、斯かるDNAを用いる組換え型蛋白質の産生の方法はいずれも斯界において慣用となっている。例えば、ジェイ・サムブルックら、『モレキュラー・クロニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版(1989年)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行には、所期のDNAの取得や、取得したDNAの物質生産への利用のための方法が種々詳述されている。また、例えば、特許第2576970号明細書には、目的とする遺伝子を欠損させた細菌を宿主として用いる形質転換DNAの安定化方法が、特開昭63-157987号公報には、枯草菌で効率的に所期のDNAを発現させるベクターが、特表平5-502162号公報には、細菌染色体への所期のDNAへの安定な組み込みの方法が、特表平8-506731号公報には澱粉分解酵素の遺伝子工学的手法を用いる効率的な産生方法が、特表平9-500543号公報や特表平10-500024号公報には組換え型蛋白質の効率的な産生のための真菌を用いる宿主-ベクター系がそれぞれ開示されている。この発明においては、以上の如き斯界における慣用の方法はいずれも有利に適用できる。

40

50

【 0 0 4 8 】

ところで、斯界においては、所望のDNAが上述のようにして得られている場合、斯かるDNAを適宜の動植物体に導入してなる、いわゆる、トランスジェニック動物やトランスジェニック植物を得ることは慣用となっている。この発明の非還元性糖質生成酵素ないしはトレハロース遊離酵素をコードするDNAにおける、適宜の宿主に導入された形態のDNAには、斯かるトランスジェニック動物ないしトランスジェニック植物も包含される。トランスジェニック動物を得るには、概略としては、先ず、当該酵素をコードするDNAを、必要に応じてプロモーターやエンハンサーなど所望の他のDNAとともに、宿主動物の種に応じて選択される適宜のベクターに組み込み、斯かる組換えDNAをマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法や当該DNAを含有する組換えウイルスの感染などの方法により、宿主として用いる動物の受精卵や胚性幹細胞に導入する。宿主動物としては、マウス、ラット、ハムスターなど実験動物として汎用される齧歯類のほか、山羊、羊、ブタ、牛などの家畜として常用される哺乳動物も飼育の容易さの点で有用である。次に、このようにして得られる、当該DNAの導入された細胞を、斯かる細胞と同種の偽妊娠雌動物の卵管内又は子宮内に移植する。その後、自然分娩や帝王切開などにより生まれる新生児の中から、ハイブリダイゼーション法やPCR法などを適用して当該酵素をコードするDNAが導入されたトランスジェニック動物を選択すればよい。斯くしてトランスジェニック動物としての形態のこの発明のDNAは得ることができる。なお、トランスジェニック動物に関しては、例えば、村松正實、岡山博人、山本雅編集、『実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック』、1996年、羊土社発行、269乃至283頁に、その手法が詳述されている。一方、トランスジェニック植物を得るには、例えば、先ず、植物への感染性を有するアグロバクテリウム属微生物のプラスミドをベクターとして用いて、斯かるベクターに、当該酵素をコードするDNAを組み込み、得られる組換えDNAを植物体や植物のプロトプラストに導入したり、重金属の微粒子を当該酵素をコードする塩基配列を含むDNAでコートし、斯かる微粒子をパーティクルガンを用いて植物体や植物のプロトプラストに直接注入する。宿主植物としては種々のものを用いることができるが、通常、ジャガイモ、大豆、小麦、大麦、米、トウモロコシ、トマト、レタス、アルファルファ、リンゴ、桃、メロンなどの食用の植物が用いられる。斯くして得られる植物体ないしは植物のプロトプラストに、ハイブリダイゼーション法やPCR法を適用して所期のDNAを含むものを選択し、プロトプラストの場合にはそれを植物体として再生させれば、トランスジェニック植物としての形態のこの発明のDNAは得ることができる。なお、トランスジェニック植物に関しては、ジェーン・ケイ・セトロウ編集、『ジェネティック・エンジニアリング』、第16巻、1994年、プレナム・プレス発行、93乃至113頁に、その手法が種々概説されている。以上の如きトランスジェニック動物ないしはトランスジェニック植物の形態のこの発明のDNAは、この発明の非還元性糖質生成酵素及び/又はトレハロース遊離酵素の給源として、また、トレハロース又はトレハロース構造有する非還元性糖質を含有する食用の動植物として利用することができる。

【 0 0 4 9 】

この発明のトレハロース遊離酵素は、当該トレハロース遊離酵素の産生能を有する微生物を栄養培地に培養し、産生されたトレハロース遊離酵素を培養物から採取することを特徴とする、この発明によるトレハロース遊離酵素の製造方法によって所望量を得ることができる。斯かる製造方法で用いる微生物は、当該トレハロース遊離酵素の産生能を有するものであればいずれでもよく、その種類は問わない。斯かる微生物の具体例としては、例えば、アルスロバクター属に属する細菌、より望ましくは、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450) 及びその変異株等の微生物や、当該トレハロース遊離酵素をコードするこの発明によるDNAを適宜の宿主微生物に導入して得られる形質転換体を挙げることができる。

【 0 0 5 0 】

この発明によるトレハロース遊離酵素の製造方法で用いる栄養培地は、当該微生物が生育でき、当該トレハロース遊離酵素を産生し得るものであればいずれでもよく、特定の組成

10

20

30

40

50

の培地に限定されるものではない。当該培地は、通常、炭素源及び窒素源を含有し、必要に応じて無機成分が添加される。炭素源としては、当該微生物が資化できるものであればよく、例えば、デキストリン、澱粉、澱粉部分分解物、グルコースなどの糖質、糖蜜及び酵母エキス等の糖含有物のほか、グルコン酸やコハク酸などの有機酸はいずれも有用である。炭素源の濃度は、その種類に応じて適宜選択されるが、通常、30% (w/v) 以下、より望ましくは、15% (w/v) 以下の条件が適用される。窒素源は、通常、アンモニウム塩や硝酸塩などの無機窒素化合物のほか、尿素や、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物から適宜選択される。無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、磷酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などから適宜選ばれる塩類が必要に応じて用いられる。

10

【0051】

この発明による当該トレハロース遊離酵素の製造方法における培養条件は、使用する微生物に応じて、それぞれの微生物の生育に適した条件が適宜に選択される。例えば、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP-6450) などのアルスロバクター属に属する微生物を使用する場合、培養温度は通常、20乃至50、望ましくは、25乃至37、培養 pH は通常 pH 4 乃至 10、望ましくは、pH 5 乃至 9、培養時間は 10 乃至 150 時間から選ばれ、好気条件下で培養される。一方、当該トレハロース遊離酵素をコードする DNA を宿主微生物に導入してなる形質転換体を使用する場合、宿主の微生物種やベクターの種類にもよるが、培養温度は通常、20乃至65、培養 pH は通常、pH 2 乃至 9、培養時間は通常、1乃至6日間から選ばれ、好気条件下で培養される。斯くして得られる培養物は、通常、主としてその菌体画分に当該酵素を含有する。一方、枯草菌などを宿主として得た形質転換体を培養する場合には、形質転換に用いるベクターの種類によっては、斯かる培養物は、主としてその上清画分に当該酵素を含有する場合もある。以上のようにして得られる培養物における当該酵素の含量は、用いる微生物の種類や培養条件などにもよるが、通常、培養物 1 ml 当たりに換算すると 0.01 乃至 3,000 単位である。

20

【0052】

以上のようにして得られる培養物から、この発明のトレハロース遊離酵素を採取する。培養物からの当該酵素の採取の方法は問わないが、例えば、当該酵素活性が主として認められる菌体又は培養上清のいずれかの画分を分離して採取し、さらに必要に応じて、採取した画分を適宜の精製手段に供して、当該トレハロース遊離酵素を含有する精製された画分を採取する。培養物における菌体と培養上清との分離には、通常の固液分離手段、例えば、遠心分離のほか、プレコートフィルターや平膜、中空糸膜などを用いる濾過などはいずれも有利に適用できる。斯くして分離される菌体含有画分及び培養上清から所望の画分を採取する。採取する画分が菌体含有画分である場合、斯かる菌体を破碎して菌体破碎物としたり、さらには、菌体破碎物からその可溶性画分を上記の固液分離手段によって、その可溶性画分としての菌体抽出液及び菌体不溶性画分に分離し、所望のいずれかの画分を採取することも随意である。菌体不溶性画分は、更に必要に応じて、常法により可溶化して用いることもできる。菌体の破碎には、通常の、超音波処理、界面活性剤処理、リゾチームやグルカナナーゼなどの細胞壁破壊酵素による処理、機械的磨砕、機械的圧力の負荷などは、いずれも有利に適用できる。また、菌体の破碎には、培養物そのものを直接これらの菌体の破碎方法のいずれかで処理し、上述の固液分離手段のいずれかを適用して液体画分を採取して菌体抽出液を得ることも有利に実施できる。

30

40

【0053】

以上のようにして得られる画分から当該トレハロース遊離酵素をさらに精製するには、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動などの糖質関連酵素を精製するための斯界における慣用の方法が適用され、必要に応じてこれらは適宜組合せて適用され

50

る。斯様な方法によって分離される画分の中から、トレハロース遊離酵素の活性測定に基づき、所期の活性を示した画分を回収すれば、所望のレベルにまで精製された当該酵素を採取することができる。例えば、下記に詳述する実施例に記載の方法によれば、当該酵素は電気泳動的に均質な状態にまで精製することができる。以上のようにして、この発明の製造方法によってこの発明のトレハロース遊離酵素は、培養物、培養上清画分、菌体含有画分、菌体破砕物、菌体抽出液、菌体不溶性画分とその可溶化物、部分精製酵素含有画分、精製酵素含有画分などとして得られる。当該画分は、さらに非還元性糖質生成酵素を含有する場合がある。なお、以上のようにして得られるこの発明のトレハロース遊離酵素は、常法にしたがい固定化して用いることも随意である。斯かる固定化の方法としては、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが挙げられる。以上のようにして得られる当該トレハロース遊離酵素は、いずれも、後述するこの発明の糖質の製造方法を含む各種糖質の製造において有利に用いることができる。とりわけ、当該トレハロース遊離酵素は、中温域に至適温度を有す上、望ましくは、酸性域に至適pHを有しているのも、後述するこの発明のトレハロース遊離酵素の他、酸性域に至適pHを有する澱粉枝切り酵素、中温域で良好な活性を示すシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼなどとの併用による糖質の製造に極めて有用である。

10

【0054】

この発明は、以上に説明したこの発明の酵素を用いる、非還元性糖質を含む糖質の製造方法を提供するものでもある。この発明の糖質の製造方法は、当該非還元性糖質生成酵素及び/又は当該トレハロース遊離酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させて非還元性糖質を生成させる工程と、該工程で生成した非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する工程を含んでなる。斯かる糖質の製造方法においては、この発明以外の非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素、さらには他の糖質関連酵素から選ばれる1又は複数を併用することを妨げない。斯かる糖質の製造方法で用いる還元性澱粉部分分解物は、その給源や調製方法によって限定されるものではない。この発明でいう非還元性糖質とは、トレハロースをはじめとするトレハロース構造有する非還元性糖質全般を意味する。

20

【0055】

この発明の糖質の製造方法で使用する還元性澱粉部分分解物は、例えば、澱粉又は澱粉質を公知の方法で液化して得ることができる。斯かる澱粉は、とうもろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。斯かる澱粉の液化は、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは、濃度10% (w/w) 以上、より望ましくは、約20乃至50% (w/w) の澱粉乳とし、これを機械的処理、酸処理又は酵素処理することにより行われる。液化の程度は比較的低いものが適しており、望ましくは、DE10未満のもの、より望ましくは、DE10未満のものが好適である。酸で液化する場合には、塩酸、磷酸、蔞酸などを用い、その後、炭酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸ナトリウムなどで所望のpHに中和して利用すればよい。酵素で液化する場合には、
- アミラーゼ、とりわけ、耐熱性の液化型 - アミラーゼの使用が適している。また、斯かる澱粉の液化物に、さらに、
- アミラーゼ、マルトトリオース生成アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ、澱粉枝切り酵素などの糖質関連酵素などをさらに作用させて得られる反応産物を還元性澱粉部分分解物として用いることも随意である。なお、これら澱粉関連酵素の酵素学的性質は、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ』、アミラーゼ研究会編、パーガモン・プレス発行(1988年)、18乃至81頁、125乃至142頁に詳述されている。

30

40

【0056】

このようにして得られる還元性澱粉部分分解物に、当該非還元性糖質生成酵素及び/又は当該トレハロース遊離酵素と、必要に応じて、
- アミラーゼ、
- アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼやブルナーゼなどの澱粉枝切り酵素、シクロマルトデキ

50

トリン・グルカノトランスフェラーゼ、
- グルコシダーゼ、
- フラクトフラノシダーゼをはじめとする糖質関連酵素から選ばれる1又は複数の酵素とを作用させる。酵素を作用させるにあたっては、用いる酵素が作用し得る条件、通常、pH 4乃至10、温度20乃至70、望ましくは、pH 5乃至7、温度30乃至60 から適宜選ばれる条件が採用される。とりわけ、40 を越え且つ60 未満若しくは45 を越え60 未満の中温域で、弱酸性乃至酸性の条件下で反応を行うと、より効率的に非還元製糖質を生成せしめることができる。還元性澱粉部分分解物にこれらの酵素を作用させる順序は問わず、いずれかの酵素を先に作用させ、他の酵素を後に作用させることも、用いる複数の酵素を同時に作用させることも随意である。

【0057】

酵素の使用量は、酵素の作用条件・作用時間や、非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質の最終用途などに応じて適宜選ばれる。通常、還元性澱粉部分分解物の固形分1g当たり、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素の場合、いずれも、約0.01乃至約100単位、澱粉枝切り酵素の場合、約1乃至約10,000単位、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの場合、約0.05乃至約500単位から選ばれる。斯かる酵素作用により得られる反応液は、通常、非還元性糖質としてトレハロース、
- グルコシルトレハロース、
- マルトシルトレハロース、
- マルトトリオシルトレハロース、
- マルトテトラオシルトレハロース又は
- マルトペンタオシルトレハロースを含有する。当該製造方法において、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素とともに澱粉枝切り酵素及びシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを併用する場合、トレハロース及びトレハロース構造有する非還元性糖質のうちの比較的低分子のものが多量に生成されるという特徴がある。

【0058】

斯くして得られる反応液から非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を採取する。斯かる工程には、糖質の製造に慣用される方法が適宜適用される。具体的には、例えば、斯かる反応液を濾過、遠心分離などして不要物を除去した後、活性炭を用いる脱色ならびにH型・OH型イオン交換樹脂を用いる脱塩などにより精製し、さらに濃縮して、シラップ状製品として採取する。必要に応じてさらに精製し、高純度の非還元性糖質製品として採取することも随意である。さらなる精製には、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーを用いる分画、アルコール及びアセトンなどの有機溶媒を用いる分別沈澱、適度な分離性能を有する膜を用いる分離、さらには、酵母での発酵処理、アルカリ処理などにより残存している還元性糖質の分解除去などの方法を1種又は2種以上組み合わせで適用することができる。とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去し、含量を向上させた非還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0059】

このようにして得られる非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質を、必要により、アミラーゼ、例えば、
- アミラーゼ、
- アミラーゼ、グルコアミラーゼなどや、又は
- グルコシダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、同じ特許出願人による特開平8-73482号公報に開示された方法に準じて、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。とりわけ、当該非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼ又は
- グルコシダーゼを作用させることにより容易にトレハロースを製造することができる。即ち、これらの非還元性又は低還元性糖質にグルコアミラーゼ又は
- グルコシダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換樹脂を用いるカラムク

10

20

30

40

50

ロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させて含水結晶又は無水結晶としてのトレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0060】

トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約60% (w/w) 以上、固形分濃度約65乃至90% (w/w) のトレハロース高含有液を助晶缶にとり、必要に応じて、0.1乃至20% (w/v) の種晶共存下で、温度95 以下、望ましくは10乃至90 の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスキットを製造する。また、減圧濃縮しながら晶析させる連続晶析法を採用することも有利に実施できる。マスキットからトレハロース含水結晶又はこれを含む含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

10

【0061】

分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜(母液)とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、固形分濃度70乃至85% (w/w)、晶出率20乃至60%程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、60乃至100 の熱風で乾燥し、次いで30乃至60 の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分10乃至20% (w/w)、晶出率10乃至60%程度のマスキットを約0.1乃至3日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

20

【0062】

また、無水結晶トレハロースを製造するには、上記のようにして得られる含水結晶トレハロースを、例えば、70 乃至160 の範囲の温度で常圧乾燥又は減圧乾燥、より望ましくは、80 乃至100 の範囲の温度で減圧乾燥するか、あるいは、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で50乃至160 、望ましくは80乃至140 の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

30

【0063】

このようにして製造される非還元性糖質又はこれを含む低還元性糖質は、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元力が低いにもかかわらず低粘度であり、平均グルコース重合度が低いもの場合には、良質で上品な甘味を有している。このようにして得られる糖質は、例えば、同じ特許出願人による特開平8-66187号公報、特開平8-66188号公報、特開平8-73482号公報、特開平8-73506号公報、特開平8-73504号公報、特開平8-336363号公報、特開平9-9986号公報、特開平9-154493号公報、特開平9-252719号公報、特開平10-66540号公報、特開平10-168093号公報、特願平9-236441号明細書、特願平9-256219号明細書、特願平9-268202明細書、特願平9-274962号明細書、特願平9-320519号明細書、特願平9-338294号明細書、特願平10-55710号明細書、特願平10-67628号明細書、特願平10-134553号明細書及び特願平10-214375号明細書などに開示されているように、食品分野、化粧品分野及び医薬品分野などにおいて有利に利用することができる。

40

【0064】

次に、実施例によりこの発明をさらに具体的に説明する。

50

【 0 0 6 5 】

【実施例 1】

非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を産生する微生物 中温域に至適温度を有する非還元性糖質生成酵素及び／又はトレハロース遊離酵素を産生する微生物を土壌より広く検索したところ、兵庫県赤穂市の土壌から分離した微生物の 1 株が、目的とする酵素を産生し得るものであると認められた。そこで、この微生物を『微生物の分類と同定』、(長谷川武治編、学会出版センター、1985年)に準拠して同定試験に供した。同定試験の結果を以下にまとめた。

【 0 0 6 6 】

細胞形態に関する試験結果を以下に示す。

10

(1) 肉汁寒天培養、37

通常 0.4 乃至 0.5 × 0.8 乃至 1.2 μm の桿菌。単独。多形性あり。運動性なし。無孢子。非抗酸性。グラム陽性。

(2) E Y G 寒天培養、37

桿菌 - 球菌の生育サイクルを示す。

【 0 0 6 7 】

培養的性質に関する試験結果を以下に示す。

(1) 肉汁寒天平板培養、37

形状： 円形 大きさは 2 日間で 1 乃至 2 mm

周縁： 全縁

20

隆起： 凸状

光沢： 湿光

表面： 平滑

色調： 半透明、クリーム色

(2) 肉汁寒天斜面培養、37

生育度： 良好

形状： 糸状

(3) 酵母エキス・ペプトン寒天斜面培養、37

生育度： 良好

形状： 糸状

30

(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27

液化しない。

【 0 0 6 8 】

生理学的性質に関する試験結果を以下に示す。

(1) メチルレッド試験： 陰性

(2) V P 試験： 陽性

(3) インドールの生成： 陰性

(4) 硫化水素の生成： 陰性

(5) 澱粉の加水分解： 陽性

(6) ゼラチンの液化： 陰性

40

(7) クエン酸の利用： 陽性

(8) 無機窒素源の利用： アンモニウム塩は利用しない。硝酸塩は利用する。

(9) 色素の生成： なし

(10) ウレアーゼ： 陰性

(11) オキシダーゼ： 陰性

(12) カタラーゼ： 陽性

(13) 生育の範囲： pH 4.5 乃至 8.0。温度 20 乃至 50。最適温度 30 乃至 45。

(14) 酸素に対する態度： 好気性

(15) 炭素源の利用性：

50

L - アラビノース： 利用しない
 D - グルコース： 利用する
 D - フラクトース： 利用しない
 D - ガラクトース： 利用しない
 L - ラムノース： 利用しない
 D - キシロース： 利用しない
 D - マンノース： 利用する
 ラフィノース： 利用しない
 トレハロース： 利用しない
 スクロース： 利用しない
 マルトース： 利用しない
 ラクトース： 利用しない
 D - ゼルシトール： 利用しない
 D - マンニトール： 利用しない
 グルコン酸： 利用する
 こはく酸： 利用する
 ニコチン酸： 利用しない
 L - マレイン酸： 利用する

10

酢酸： 利用する

乳酸： 利用する

20

(1 6) 糖からの酸生成：

L - アラビノース： 僅かに生成する
 D - グルコース： 僅かに生成する
 D - フラクトース： 生成しない
 D - ガラクトース： 僅かに生成する
 L - ラムノース： 僅かに生成する
 D - キシロース： 僅かに生成する
 グリセロール： 僅かに生成する
 ラフィノース： 生成しない
 トレハロース： 僅かに生成する
 スクロース： 僅かに生成する
 マルトース： 僅かに生成する
 ラクトース： 生成しない

30

(1 7) アミノ酸の利用： L - グルタミン酸ナトリウム、L - アスパラギン酸ナトリウム、L - ヒスチジン、L - アルギニンいずれも利用しない。

(1 8) アミノ酸の脱炭酸： L - リジン、L - オルニチン、L - アルギニンいずれも脱炭酸しない。

(1 9) D N a s e： 陰性

(2 0) 細胞壁の N - アシル型： アセチル

(2 1) 細胞壁の主要ジアミノ酸： リジン

40

(2 2) D N A の G - C 含量： 7 1 . 2 %

【 0 0 6 9 】

以上の菌学的性質を、『バーjeeズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー』、第 2 巻 (1 9 8 4 年) を参考にして、公知の菌株とその異同を検討した。その結果、上記微生物は、アルスロバクター (*A r t h r o b a c t e r*) 属に属する新規微生物であることが判明した。本発明者等は、上記微生物を新規微生物アルスロバクター・スピーシーズ (*A r t h r o b a c t e r s p.*) S 3 4 と命名した。なお、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 は、平成 1 0 年 8 月 6 日付けで、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号にある通商産業省工業技術院生命工業技術研究所、特許微生物寄託センターに、微生物受託番号 F E R M B P - 6 4 5 0 を付して受託された。

50

【 0 0 7 0 】

引き続き、上記微生物アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) と、米国の微生物寄託機関『アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) 』に寄託されている、アルスロバクター属に属する微生物のタイプ株との D N A の相同性を、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー』、第 1 巻 (1 9 8 4 年) に記載の D N A - D N A ハイブリダイゼーション法に準じて調べた。すなわち、先ず、後記表 1 に示す 1 2 種のタイプ株をそれぞれ常法にしたがって培養し、培養物から菌体を採取した。また、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) を後記実施例 2 - 1 における種培養の方法で培養し、培養物から菌体を採取した。常法にしたがって、それぞれの菌体から D N A を採取し、その 2 μ g ずつを制限酵素 P s t I で消化した。これら消化物をアマシャム製ナイロン膜『H y b o n d - N + 』上に個々にスポットした後、常法にしたがい、アルカリ処理の後、中和、乾燥させて、D N A を該ナイロン膜上に固定した。続いて、先に得た、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) 由来の D N A を 1 μ g とり、これを、制限酵素 P s t I で消化した。該消化物を、アマシャム製 [- ³²P] d C T P とファルマシア製 D N A 標識キット『レディー・トゥー・ゴー、D N A ラベリング・キット』とを用いて放射性同位元素で標識し、プローブを得た。このプローブと、先に準備した、D N A を固定したナイロン膜とを、2 0 m l のアマシャム製ハイブリダイゼーション用緩衝液『ラピッド・ハイブリダイゼーション・バッファー』中で、6 5 °C で振盪しつつ、2 時間ハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜を常法にしたがって洗浄し、乾燥させた後、常法にしたがいオートラジオグラフィーに供した。オートラジオグラフィーで認められたハイブリダイゼーションのシグナルを、ファルマシア製画像解析システム『イメージ・マスター』を用いて解析し、それぞれのシグナルの強度を数値化した。得られた数値に基づいて、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) 由来の D N A のスポットにおけるシグナルの強度を 1 0 0 とした場合の、タイプ株由来の D N A のスポットにおけるシグナルの相対強度 (%) を算出し、アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) とそれぞれのタイプ株との D N A の相同性を示す指標とした。結果を表 1 に示す。

【 0 0 7 1 】

【表 1】

10

20

30

微生物株名	ハイブリダイゼーションのシグナル の相対強度 (%)
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i> (ATCC 13752)	42.0
<i>Arthrobacter aurescens</i> (ATCC 13344)	12.4
<i>Arthrobacter citreus</i> (ATCC 11624)	36.2
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> (ATCC 15481)	31.6
<i>Arthrobacter globiformis</i> (ATCC 8010)	55.1
<i>Arthrobacter nicotianae</i> (ATCC 15236)	18.8
<i>Arthrobacter oxydans</i> (ATCC 14358)	28.3
<i>Arthrobacter pascens</i> (ATCC 13346)	24.6
<i>Arthrobacter protophormiae</i> (ATCC 19271)	29.3
<i>Arthrobacter ramosus</i> (ATCC 13727)	98.6
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> (ATCC 7562)	42.3
<i>Arthrobacter viscous</i> (ATCC 19584)	0.0
<i>Arthrobacter</i> sp. S34 (FERM BP-6450)	100

10

20

【0072】

表1に示すように、ハイブリダイゼーションのシグナルの相対強度(%)は、アルスロバクター・ラモサス(*Arthrobacter ramosus*)のタイプ株(ATCC 13727)由来のDNAのスポットにおいて98.6%という高値を示した。このことから、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)は、本実施例で用いた12種のタイプ株のうちでは、アルスロバクター・ラモサス(ATCC 13727)と最も高いDNAの相同性を有していることが判明した。以上実施例1に示した結果は、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)がアルスロバクター・ラモサス(ATCC 13727)と近縁の新規微生物であることを示している。

30

【0073】

【実施例2】

非還元性糖質生成酵素

【0074】

【実施例2-1】

40

酵素の産生

1.0%(w/v)デキストリン(松谷化学工業株式会社製、商品名『パインデックス#4』)、0.5%(w/v)ペプトン、0.1%(w/v)酵母エキス0.1、0.1%(w/v)燐酸ナトリウム0.1、0.06%(w/v)燐酸二カリウム、0.05%(w/v)硫酸マグネシウム及び水からなる培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120で20分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)を接種し、温度37、260rpmの攪拌条件下で48時間培養したものを種培養物とした。

【0075】

50

容量30lのファーマンターに、0.05% (w/v) 消泡剤 (信越化学工業株式会社製、商品名『KM-75』) を含むこと以外は種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて殺菌、冷却して温度37とした後、種培養物を培地に対して1% (v/v) の割合で接種し、温度37、pH5.5乃至7.5に保ちつつ、約72時間通気攪拌培養した。

【0076】

得られた培養物の一部を採り、遠心分離して菌体と上清液とに分離した。この菌体を超音波で破碎し遠心分離して上清を回収して菌体抽出液を得た。培養上清と菌体抽出液それぞれの非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、培養上清には当該酵素活性が僅かであったのに対して、菌体抽出液には当該酵素活性が培養物1mlあたりに換算して約0.1単位認められた。

【0077】

【実施例2-2】

酵素の精製

実施例2-1の方法にしたがって得た培養物約80lを、8,000rpmで30分間遠心分離することにより、湿重量で約800gの菌体を得た。その菌体を2lの10M磷酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁し超音波ホモジナイザー (株式会社エスエムテ製、『モデルUH-600』) で処理した。処理液を、10,000rpmで30分間遠心分離し、その上清約2lを回収した。この上清液に飽和度0.7になるように硫酸を加え溶解させ、4、24時間放置した後、10,000rpmで30分間遠心分離し、硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mM磷酸緩衝液 (pH7.0) に溶解させた後、同じ緩衝液に対して48時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した。この透析内液約1lを、約1.3lの陰イオン交換樹脂 (三菱化学株式会社製、商品名『セパピーズFP-DA13ゲル』) を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い0Mから0.6Mまで直線的に濃度が上昇する食塩を含む10mM磷酸緩衝液 (pH7.0) で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分の非還元性糖質生成酵素活性を測定した。その結果、約0.2Mの食塩を含む緩衝液でカラムから溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

【0078】

合一した溶液に硫酸を濃度1Mになるように加え4で12時間放置した後、10,000rpmで30分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清を疎水性ゲル (東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール650Mゲル』) を用いる疎水性カラムクロマトグラフィーに供した。ゲル量は約300ml、ゲルは使用に先立って、1M硫酸を含む10mM磷酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化した。溶出は、通液に伴い1Mから0Mまで直線的に濃度が下降する硫酸を含む10mM磷酸緩衝液 (pH7.0) で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分の非還元性糖質生成酵素活性を測定した。その結果、約0.75Mの硫酸で溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

【0079】

合一した溶液を10mM磷酸緩衝液 (pH7.0) に対して透析し、その透析内液を10,000rpmで30分間遠心分離した。この上清を回収し、約40mlの陰イオン交換樹脂 (東ソー株式会社製、商品名『DEAE-トヨパール650Sゲル』) を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い0Mから0.2Mまで直線的に濃度が上昇する食塩水溶液で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分の非還元性糖質生成酵素活性を測定した。その結果、約0.15M食塩で溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。合一した液を、引き続き、約380mlの『ウルトロゲルAcA44ゲル』 (フランス、セブラコル社製) を用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供し、顕著な当該酵素活性の認められた画分を回収した。以上の、精製の各工程における非還元性糖質生成酵素の酵素活性量、比活性、収率を表2に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

【表 2】

工 程	非還元性糖質生成酵素 の活性量 (単位)	比 活 性 (単位／m g 蛋白)	収 率 (%)
菌体の抽出液	8, 0 0 0	—	1 0 0
硫酸塩析後の透析内液	7, 5 0 0	0. 2	9 4
セパビーズカラム溶出液	5, 2 0 0	0. 7	6 5
疎水カラム溶出液	2, 6 0 0	6. 3	3 3
トヨパールカラム溶出液	9 1 0	6 7. 4	1 1
ゲル濾過溶出液	5 9. 0	1 6 8	0. 7

10

【 0 0 8 1 】

20

上記のゲル濾過クロマトグラフィーで溶出され回収した溶液を、常法にしたがい、7. 5 % (w / v) ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動法に供したところ、単一の蛋白質バンドが確認された。この結果は、上記で得た、ゲル濾過クロマトグラフィーからの溶出物が、電気泳動的に均質な状態にまで精製された、非還元性糖質生成酵素の精製標品であることを意味している。

【 0 0 8 2 】

【実施例 2 - 3】

酵素の性質

【 0 0 8 3 】

【実施例 2 - 3 (a)】

30

作用

基質として、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、またはマルトヘプタオースの 2 0 % 水溶液を調製し、それぞれに実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を基質固形分 1 g 当たり 2 単位の割合で加え、5 0 、p H 6 . 0 で 4 8 時間反応させた。反応産物を脱塩した後、『M C I ゲル C K 0 4 S S カラム』（三菱化学株式会社製）2 本を直列につないだカラムを用いる高速液体クロマトグラフィー（以下、「H P L C」という。）で分析し、各反応産物中の糖質の組成比を求めた。H P L C において、カラムはカラムオープン『C O - 8 0 2 0』（東ソー株式会社製造）を用いて 8 5 に保持し、移動相として水を流速 0 . 4 m l / 分で通液し、溶出物を示差屈折計『R I - 8 0 2 0』（東ソー株式会社製造）で分析した。結果を表 3 に示す。

40

【 0 0 8 4 】

【表 3】

基 質	反 応 産 物	溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコース	グルコース	57.2	100.0
マルトース	マルトース	50.8	100.0
マルトトリオース	グルコシルトレハロース	43.2	36.2
	マルトトリオース	46.2	63.8
マルトテトラオース	マルトシルトレハロース	38.9	87.2
	マルトテトラオース	42.3	12.8
マルトペンタオース	マルトトリオシルトレハロース	35.4	93.0
	マルトペンタオース	38.4	7.0
マルトヘキサオース	マルトテトラオシルトレハロース	32.7	93.8
	マルトヘキサオース	35.2	6.2
マルトヘプタオース	マルトペンタオシルトレハロース	30.2	94.2
	マルトヘプタオース	32.4	5.8

【0085】

表3の結果から明らかなように、それぞれの反応産物は、残存する基質と新たに生成した非還元性糖質 - グルコシルトレハロース、 - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース又は - マルトペンタオシルトレハロース（表3においては、それぞれ、グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトトリオシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース又はマルトペンタオシルトレハロースと表示した。）とからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されなかった。各反応産物における非還元性糖質の組成比をその生成率として評価すると、グルコース重合度3の - グルコシルトレハロースは比較的低いものの、グルコース重合度4以上の - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース、 - マルトペンタオシルトレハロースはいずれも約85%以上という高い生成率であることが判明した。なお、グルコース及びマルトースからの非還元性糖質の生成は確認されなかった。

【0086】

【実施例2 - 3 (b)】

分子量

実施例2 - 2の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を、分子量マーカー（日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製）と並行して、10%（w/v）ポリアクリルアミドゲルを用いる、通常のSDS - PAGEに供した。泳動後、分子量マーカーの泳動位置と比較した結果、当該酵素の分子量は約75,000 ± 10,000ダルトンであった。

【0087】

【実施例2 - 3 (c)】

等電点

実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を、両性電解質『アンフォライン』（スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製）を 2 %（w / v）の濃度で含有するポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動法に供した。泳動後、ゲルの pH を測定した結果、当該酵素の等電点は約 4.5 ± 0.5 であった。

【 0 0 8 8 】

【実施例 2 - 3（d）】

至適温度及び至適 pH

実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を用いて、当該酵素活性に対する温度の影響及び pH の影響を調べた。温度の影響を調べる際には、適宜の各温度で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。pH の影響を調べる際には、適宜の 20 mM 緩衝液を用いて適宜の各 pH 条件下で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。それぞれの操作において、各反応系に認められた基質の還元力の減少量の相対値（%）を算出し、相対酵素活性（%）とした。結果を図 1（温度の影響）及び図 2（pH の影響）に示す。図 1 で横軸は反応温度を、図 2 で横軸は反応 pH をそれぞれ示す。図 1 に示されるように、当該酵素の至適温度は、pH 6.0、60 分間反応で、約 50 付近であった。図 2 に示されるように、当該酵素の至適 pH は、50、60 分間反応で、pH 約 6.0 付近であった。

【 0 0 8 9 】

【実施例 2 - 3（e）】

温度安定性及び pH 安定性

実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を用いて、当該酵素の温度安定性及び pH 安定性を調べた。温度安定性は、当該酵素の精製標品を 20 mM 燐酸緩衝液（pH 7.0）で希釈し、適宜の各温度に 60 分間保持し、水冷した後、希釈液に残存する酵素活性を活性測定法にしたがい調べた。pH 安定性は、当該酵素の精製標品を適宜の各 pH の 50 mM 緩衝液で希釈し、4 で 24 時間保持した後、pH を 6 に調整し、希釈液に残存する酵素活性を活性測定法に従って調べた。結果を図 3（温度安定性）及び図 4（pH 安定性）に示す。図 3 で横軸は酵素の保持温度を、図 4 で横軸は酵素の保持 pH をそれぞれ示す。図 3 に示されるように、当該酵素は約 55 付近まで安定であった。図 4 に示されるように、当該酵素は、pH 約 5.0 乃至約 10.0 の範囲で安定であった。

【 0 0 9 0 】

以上の結果は、実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素が、中温域に至適温度を有するこの発明の非還元性糖質生成酵素であることを示している。

【 0 0 9 1 】

【実施例 2 - 4】

部分アミノ酸配列

実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品の一部を蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約 80 μ g を N 末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N 末端アミノ酸配列は、『プロテインシーケンサー モデル 473A』（米国、アプライドバイオシステムズ社製造）を用い、N 末端から 20 残基まで分析した。得られた配列は、配列表における配列番号 4 に示すアミノ酸配列であった。

【 0 0 9 2 】

実施例 2 - 2 の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品の一部を 10 mM トリス - 塩酸緩衝液（pH 9.0）に対して透析した後、限外濾過膜（東ソー株式会社製、商品名『ウルトラセント - 30』）を用い、常法にしたがい操作して、濃度約 1 mg / ml にまで濃縮した。この濃縮液（0.2 ml）に 10 μ g のトリプシン試薬（和光純薬株式会社販売、商品名『TPCK - トリプシン』）を加え、30、22 時間反応させて当該酵素を消化し、ペプチドを生成させた。反応産物を、『マイクロボンドスフェア C18 カラム』（直径 3.9 mm × 長さ 150 mm、ウォーターズ社製）を用いる逆相 HPLC に供し、ペプチドを分離した。温度は室温で行った。溶出は、通液に伴い 60 分間で 24 %（

v / v) から 48 % (v / v) まで直線的に濃度が上昇するアセトニトリルを含む 0.1 % (v / v) トリフルオロ酢酸水溶液で、流速 0.9 ml / 分で行った。カラムから溶出されたペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 2 個のペプチド、『S5』(保持時間約 23 分)及び『S8』(保持時間約 30 分)を分取し、それぞれを真空乾燥した後、50 µl の 0.1 % (v / v) トリフルオロ酢酸を含む 50 % (v / v) アセトニトリル水溶液に溶解した。これらのペプチド溶液をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 20 残基までアミノ酸配列を分析した。ペプチド『S5』からは、配列表における配列番号 5 に示すアミノ酸配列が、またペプチド『S8』からは、配列表における配列番号 6 に示すアミノ酸配列が得られた。

【0093】

10

【実施例 3】

非還元性糖質生成酵素をコードする DNA

【0094】

【実施例 3 - 1】

遺伝子ライブラリーの作製と検索

培養温度を 27 °C とし、培養時間を 24 時間としたこと以外は実施例 2 - 1 と同様にして、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERM BP - 6450) を培養した。遠心分離により培養物から菌体を分離し、適量のトリス - EDTA - 食塩緩衝液 (以下、「TES 緩衝液」いう。)(pH 8.0) に浮遊させ、リゾチームを当該菌体浮遊液の体積に対し 0.05 % (w / v) の割合で加えた後、37 °C で 30 分間インキュベートした。この処理物を -80 °C で 1 時間保持して凍結させた後、ここに、予め TES 緩衝液 (pH 9.0) を加えて 60 °C に加温しておいた TES 緩衝液 / フェノール混液を加えて十分に攪拌し、さらに氷冷後遠心分離して形成された上層を採取した。この上層に、2 倍容の冷エタノールを加えて生成した沈澱を採取し、SSC 緩衝液 (pH 7.1) の適量に溶解後、7.5 µg のリボヌクレアーゼ及び 125 µg のプロテアーゼを加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。ここに、クロロホルム / イソアミルアルコール混液を加えて攪拌後、静置して形成される上層を採取し、この上層に冷エタノールを加えて生成した沈澱を採取した。沈澱を冷 70 % (v / v) エタノールで濯ぎ真空乾燥して、DNA を得た。得られた DNA は、濃度約 1 mg / ml となるように SSC 緩衝液 (pH 7.1) に溶解し、-80 °C で凍結した。

20

30

【0095】

上記で得た DNA 溶液を 50 µl とり、ここに制限酵素 Kpn I を約 50 単位加え、37 °C で 1 時間インキュベートして DNA を消化した。消化した DNA の 3 µg と、予め制限酵素 Kpn I で消化しておいたストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミドベクター『pBluescript II SK (+)』0.3 µg とを、宝酒造製『DNA ライゲーション・キット』を用いて、添付の説明書にしたがって操作して連結した。通常のコンピテントセル法にしたがって、この連結産物でストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌『Epicurian Coli XL1 - Blue』株 100 µl を形質転換して遺伝子ライブラリーを作製した。

【0096】

40

作製した遺伝子ライブラリーを、常法により調製した、10 g / l トリプトン、5 g / l 酵母エキス、5 g / l 塩化ナトリウム、75 mg / l アンピシリンナトリウム塩及び 50 mg / l 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - 2 - ガラクトシドを含む寒天平板培地 (pH 7.0) に植菌し、37 °C で 18 時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約 5,000 個を、常法にしたがって、アマシャム製ナイロン膜『Hybond - N+』上に固定した。別途、実施例 2 - 4 の方法で明らかにした、配列表における配列番号 5 に示すアミノ酸配列における第 1 乃至 8 番目までのアミノ酸配列に基づき、配列表における配列番号 18 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法にしたがい [- ³²P] ATP 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位体標識してプローブを得た。このプローブを用いて、先に得たナイロン膜上に固定されたコロニーを、

50

通常のコロニー・ハイブリダイゼーション法に従って検索した。ハイブリダイゼーションは、適量のプローブを添加したハイブリダイゼーション液（ $6 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト液及び 100 mg/l 変性サケ精子DNAを含む）中で、 65°C で16時間実施した。ハイブリダイゼーションを終えた上記ナイロン膜は、 $6 \times \text{SSC}$ で 65°C で30分間洗浄した後、 0.1% （ w/v ）SDSを含む $2 \times \text{SSC}$ で 65°C で2時間さらに洗浄した。洗浄後のナイロン膜を常法にしたがいオートラジオグラフィーに供して認められたシグナルに基づき、プローブと顕著なハイブリダイゼーションを示したコロニーを選択した。選択した形質転換体を『GY1』と命名した。

【0097】

【実施例3-2】

塩基配列の解読

この形質転換体『GY1』を常法にしたがい、 $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリンナトリウム塩を含むL-プロス培地（ $\text{pH} 7.0$ ）に植菌し、 37°C で24時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を取り出し、通常のアリカリ-SDS法により組換えDNAを抽出した。当該組換えDNAを『pGY1』と命名した。組換えDNA『pGY1』を、上記プローブを用いて通常のサザン分析法により分析し、分析結果に基づき制限酵素地図を作成した。作成した制限酵素地図を図5に示す。図5に示すように、組換えDNA『pGY1』は、図中太線で示されるアルスロバクター・スピーシーズS34（FERM BP-6450）由来の約5,500塩基対からなる塩基配列を含有し、そして、斯かる組換えDNAは、制限酵素EcoRIによる2箇所の認識部位の間の約4,000塩基対からなる領域に、図中太線の領域内の黒色矢印で示すように、当該非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列を含有することが判明した。そこで、組換えDNA『pGY1』を制限酵素EcoRIで完全に消化した後、通常のアガロースゲル電気泳動法を用いて、約4,000塩基対のDNA断片を分離精製した。このDNA断片と、予め制限酵素EcoRIで消化しておいたストラタジーン・クローニング・システムズ製プラスミドベクター『pBluescript II SK(+)』とを、通常のリガーレーション法で連結した。引き続き常法にしたがって、連結産物でストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌『XL1-Blue』株を形質転換した。このようにして得られた形質転換体より常法にしたがい組換えDNAを抽出し、上記の約4,000塩基対のDNA断片を含有することを常法にしたがって確認し、『pGY2』と命名した。また、ここで得た、組換えDNA『pGY2』が導入されてなる形質転換体を『GY2』と命名した。

【0098】

組換えDNA『pGY2』の塩基配列を、通常のアセキシ法により分析したところ、当該組換えDNAは、アルスロバクター・スピーシーズS34（FERM BP-6450）に由来する、配列表における配列番号19に示す、3252塩基対からなる塩基配列を含有していた。この塩基配列は、配列番号19に併記したアミノ酸配列をコードし得るものであった。このアミノ酸配列と、実施例2-4の方法で確認された本発明の非還元性糖質生成酵素の部分アミノ酸配列である、配列表における配列番号4乃至6に示すアミノ酸配列とを比較した。その結果、配列表における配列番号4、5及び6に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号19に併記したアミノ酸配列における第2乃至21番目、619乃至638番目及び第98乃至117番目のアミノ酸配列と完全に一致した。以上のことは、実施例2で得た本発明の非還元性糖質生成酵素が、配列表における配列番号19に併記したアミノ酸配列における第2乃至757番目のアミノ酸からなる配列、すなわち、配列番号1に示すアミノ酸配列を有することを示している。また、以上のことは、当該酵素はアルスロバクター・スピーシーズS34（FERM BP-6450）においては、配列表における配列番号19に示す塩基配列における第746乃至3013番目の塩基からなる配列、すなわち、配列番号7に示す塩基配列によりコードされていることをも示している。以上に示した組換えDNA『pGY2』の構造は図6にまとめている。

【0099】

実施例2の方法で得られるこの発明の非還元性糖質生成酵素の、上記で明らかにしたアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列と、非還元性糖質生成酵素としての作用を有する公知の他の酵素のアミノ酸配列とを、ディー・ジェイ・リップマンら、『サイエンス』、227巻、1435乃至1441頁(1985年)に記載の方法にしたがって、市販のソフトウェア(商品名『ジェネティクス・マック(GENETYX-MAC)、バージョン8』、ソフトウェア開発株式会社販売)を用いて比較し、それぞれ相同性(%)を求めた。公知の酵素として、特開平7-322883号公報に開示されたアルスロバクター・スピーシーズ(*Arthrobacter* sp.) Q36由来のもの、特開平7-322883号公報に開示されたリゾビウム・スピーシーズ(*Rhizobium* sp.) M-11由来のもの、特開平8-84586号公報に開示されたスルフォロパス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC 33909由来のもの及び、再公表特許WO95/34642号公報に開示されたスルフォロパス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*) KM1由来のものを用いた。以上の公知の酵素は上記公報に記載のとおり、いずれも中温域以外に至適温度を有するものである。なお、以上の公知の酵素のアミノ酸配列は、米国国立予防衛生研究所作成のDNAデータベース『ジェンバンク(GenBank)』から、それぞれのアクセッション番号『D63343』、『D64128』、『D78001』及び、『D83245』により入手することもできる。求められた相同性を表4に示す。

【0100】

【表4】

アミノ酸配列(*)の比較の対象とした酵素の由来	アミノ酸配列の相同性
<i>Rhizobium</i> sp. M-11 (D78001)	56.9%
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36 (D63343)	56.6%
<i>Sulfolobus solfataricus</i> KM1 (D64128)	33.2%
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC 33909 (D83245)	31.4%

*: 括弧内には、データベース『ジェンバンク』におけるそれぞれのアクセッション番号を示した。

【0101】

表4に示すように、実施例2によるこの発明の非還元性糖質生成酵素は、中温域以外に至適温度を有する公知の酵素のうちではリゾビウム・スピーシーズM-11由来の酵素と最も高い56.9%というアミノ酸配列の相同性を示した。この結果は、この発明の非還元性糖質生成酵素が、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して57%以上の相同性を有するアミノ酸配列を通常は含有することを意味している。また、アミノ酸配列の比較結果から、実施例2による当該酵素と上記の4種類の公知の酵素は、配列表における配列番号2及び3に示すアミノ酸配列を共通して含有していることが判明した。実施例2による当該酵素は、配列表における配列番号1のアミノ酸配列における第84乃至89番目及び第277乃至282番目のアミノ酸からなる部分に見られるとおり、配列番号2及び3のアミノ酸配列を部分アミノ酸配列として含有している。上記で比較の対象とした4種類の酵素も、いずれも、それぞれ対応する部分にこれらの部分アミノ酸配列を含有している。実施例2による当該酵素ならびに比較の対象とした酵素がいずれも共通して還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有していることから、上記で見出された配列表における配列番号2及び3に示す部分アミノ酸配列が斯かる作用の発現に関わっていることが示唆された。したがってこの結果は、この発明の非還元性糖質生成酵素が、配列表における配列番号2及び3に示すアミノ酸配列を含有するとともに中温域に至適温度を有することにより特徴づけられることを示している。

【0102】

【実施例3-3】

DNAを導入してなる形質転換体

配列表における配列番号7に示す塩基酸配列における5'末端及び3'末端の配列に基づいて、それぞれ、配列表における配列番号20及び21に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがい化学合成した。センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、これらのオリゴヌクレオチドをそれぞれ85ngと、鋳型として、実施例3-2の方法で得た組換えDNA『pGY2』を100ngとを反応管で混合し、耐熱性DNAポリメラーゼ試薬(宝酒造製、商品名『Pyrobest』)1.25単位、同試薬に添付された緩衝液5μlとdNTP混合液4μlをさらに加え、滅菌蒸留水で全量を50μlとして、PCRを行った。PCRの温度制御は、95℃1分間の後、98℃20秒間、70℃30秒間及び72℃4分間を25サイクル、最後に、72℃10分間とした。PCR産物としてのDNAを常法にしたがい回収して、約2,300塩基対のDNAを得た。このDNAと、予め制限酵素EcoRIで切断し、宝酒造製『DNA Blunting Kit』を用いて平滑化しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』とを混合し、通常のライゲーション法により連結した。引き続き、連結産物を常法にしたがって操作して、上記約2,300塩基対のDNAが挿入された組換えDNAを得た。得られた組換えDNAを通常のジデオキシ法により解読したところ、当該組換えDNAは、配列表の配列番号7に示す塩基配列における5'末端及び3'末端に、それぞれ、5'-ATG-3'及び5'-TGA-3'で示される塩基配列が付加された塩基配列を含んでいた。当該組換えDNAを『pGY3』と命名した。以上に示した組換えDNA『pGY3』の構造は図7にまとめている。

【0103】

組換えDNA『pGY3』を、常法にしたがい予めコンピテント化しておいた大腸菌LE392株(ATCC 33572)に導入して形質転換体を得た。斯かる形質転換体より、通常のアルカリ-SDS法によりDNAを抽出し、抽出されたDNAが『pGY3』であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を『GY3』と命名した。斯くして、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードするDNAを導入してなる形質転換体を得た。

【0104】

【実施例3-4】

DNAを導入してなる形質転換体

ファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』におけるプロモーターの3'末端側下流の塩基配列にもとづいて、配列表における配列番号22及び23に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがって合成し、それぞれの5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて燐酸化した。燐酸化した該オリゴヌクレオチドを常法にしたがいてアニーリングさせた後、これと、あらかじめ制限酵素EcoRI及びPstIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』とを通常のライゲーション法により連結した。常法にしたがい、連結産物を大腸菌株に導入し、斯る大腸菌株を培養後、培養物から通常のアルカリ-SDS法によりDNAを抽出した。得られたDNAは、プラスミドベクター『pKK223-3』と同様の構造を有する一方、そのプロモーターの下流に、制限酵素EcoRI、XbaI、SpeI及びPstIによる認識配列をこの順序で含有していた。斯くして得たDNAをプラスミドベクター『pKK4』と命名した。

【0105】

配列表における配列番号7に示す塩基配列における5'末端及び3'末端部分の配列に基づいて化学合成した、配列番号24及び25に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いたこと以外は実施例3-3と同様にしてPCRを行った。PCR産物としてのDNAを常法にしたがい回収して、約2,300塩基対のDNAを得た。このDNAを制限酵素XbaI及びSpeIで切断した後、これと、制限酵素XbaI及びSpeIであらかじめ切断しておいた上記プラスミドベクター『pKK4』とを通常のライゲーション法により連結した。連結産物を常法に

したがって操作して、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列を含有する組換え DNA を得た。斯くして得た組換え DNA を『p K G Y 1』と命名した。

【0106】

引き続き、ロバート・エム・ホートンらが、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第 217 巻、270 乃至 279 頁(1993 年)に報告している、2 段階の PCR を適用する『オーバーラップ・エクステンション法』により、上記で得た組換え DNA 『p K G Y 1』における配列番号 7 の塩基配列の 5' 末端上流部分の塩基配列を改変した。先ず、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、プラスミドベクター『p K K 4』の塩基配列に基づいて常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 26 及び 27 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、鋳型として、上記で得た組換え DNA 『p K G Y 1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3 - 3 と同様にして PCR を行った(「第 1 段 PCR - A」という)。これと並行して、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 7 の塩基配列に基づいてそれぞれ常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 28 及び 29 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、鋳型として、上記で得た組換え DNA 『p K G Y 1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3 - 3 と同様にして PCR を行った(「第 1 段 PCR - B」という)。第 1 段 PCR - A の産物としての DNA を常法にしたがって回収し、約 390 塩基対の DNA を得た。第 1 段 PCR - B の産物としての DNA を常法にしたがい回収して、約 930 塩基対の DNA を得た。

【0107】

鋳型として、第 1 段 PCR - A 及び第 1 段 PCR - B の産物として得た DNA の混合物を、センスプライマーとして、第 1 段 PCR - A で用いた配列表における配列番号 26 の塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列に基づき常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 30 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3 - 3 と同様にして PCR を行った(「第 2 段 PCR - A」という)。この PCR の産物としての DNA を常法にしたがい回収し、約 1,300 塩基対の DNA を得た。

【0108】

第 2 段 PCR - A の産物として得た DNA を制限酵素 E c o R I 及び B s i W I で切断し、生成した約 650 塩基対の DNA を常法にしたがい回収した。一方、上記で得た組換え DNA 『p K G Y 1』を制限酵素 E c o R I 及び B s i W I で切断し、生成した約 6,300 塩基対の DNA を常法にしたがい回収した。これらの DNA を通常のライゲーション法により連結し、連結産物を常法にしたがい操作して、第 2 段 PCR - A の産物由来の約 650 塩基対の DNA を含有する組換え DNA を得た。通常のジデオキシ法により DNA を解読したところ、得られた組換え DNA は、5' 末端から 3' 末端に向けて、配列表における配列番号 8 に示す塩基配列、5' - A T G - 3' で表される塩基配列、配列表における配列番号 7 に示す塩基配列及び、5' - T G A - 3' で表される塩基配列が、この順序で連結された塩基配列を含有していた。斯くして得た組換え DNA を『p G Y 4』と命名した。なお、組換え DNA 『p G Y 4』の構造は、配列表における配列番号 8 に示す塩基配列を含有すること以外は、実施例 3 - 3 の方法で得た組換え DNA 『p G Y 3』の構造と実質的に同一である。

【0109】

組換え DNA 『p G Y 4』を、宝酒造製の大腸菌コンピテント細胞『B M H 7 1 - 1 8 m u t S』に常法にしたがい導入して形質転換体を得た。斯る形質転換体より通常のアルカリ - S D S 法により DNA を抽出し、抽出された DNA が『p G Y 4』であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を『G Y 4』と命名した。斯くして、この発明の非還元性糖質生成酵素をコードする DNA を導入してなる形質転換体を得た。

【0110】

【実施例 4】

非還元性糖質生成酵素の製造

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

【実施例 4 - 1】

アルスロバクター属微生物を用いる酵素の製造

アルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0) を、実施例 2 - 1 の方法に準じて、ファーマンターで約 7 2 時間培養した。培養後、S F 膜を用いて菌体を濃縮して約 8 l の菌体懸濁液を回収し、更に、その菌体懸濁液を高圧菌体破碎装置（大日本製薬株式会社製、『ミニラボ』）で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離し、約 8 . 5 l の遠心上清を得た。上清中の非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、培養物 1 m l 当たりに換算すると、約 0 . 1 単位の当該酵素活性が認められた。この上清に飽和度約 0 . 7 になるように硫酸を加えて硫酸塩析し、遠心分離で沈殿物を回収し、10 m M 磷酸緩衝液（p H 7 . 0 ）に溶解後、同緩衝液に対して透析した。得られた透析内液を、イオン交換樹脂量を約 2 l としたこと以外は、実施例 2 - 2 に記載の陰イオン交換樹脂（三菱化学株式会社製、商品名『セパビーズ F P - D A 1 3 ゲル』）を用いる方法に準じてイオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。回収した画分を 1 M 硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析内液を遠心分離して形成された上清を回収した。回収した上清を、ゲル量を約 3 0 0 m l としたこと以外は、実施例 2 - 2 に記載の疎水性ゲル（東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール 6 5 0 M ゲル』）を用いる方法に準じて疎水性カラムクロマトグラフィーに供し、非還元性糖質生成酵素活性画分を回収した。回収した酵素の至適温度が 4 0 を越え且つ 6 0 未満の範囲の中温域にあること及び、至適 p H が p H 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くして、約 2 , 6 0 0 単位のこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。

10

20

【 0 1 1 2 】

【実施例 4 - 2】

形質転換体を用いる酵素の製造

16 g / l ポリペプトン、10 g / l 酵母エキス及び 5 g / l 塩化ナトリウムを含む水溶液を 5 0 0 m l 容三角フラスコに 1 0 0 m l 入れ、オートクレーブで 1 2 1 で 1 5 分間処理し、冷却し、無菌的に p H 7 . 0 に調製した後、アンピシリンナトリウム塩 10 m g を無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実施例 3 - 2 の方法で得た形質転換体『G Y 2』を接種し、37 で約 2 0 時間通気攪拌培養したものを種培養物とした。次に 10 l 容ファーマンタに、種培養に用いたのと同じ組成の培地を種培養の場合に準じて 7 l 調製し、種培養物を 7 0 m l 接種し、約 2 0 時間通気攪拌培養した。得られた培養物から、常法にしたがい、遠心分離して菌体を回収した。回収した菌体を、10 m M 磷酸緩衝液（p H 7 . 0 ）に懸濁し、超音波処理して菌体を破碎し、さらに遠心分離により不溶物を除去し、上清を回収して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液を 10 m M 磷酸緩衝液（p H 7 . 0 ）に対して透析した。透析内液を回収し、回収した液が非還元性糖質生成酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が 4 0 を越え且つ 6 0 未満の範囲の中温域にあること及び、至適 p H が p H 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。本実施例における培養においては、培養物 1 m l 当たりに換算すると約 0 . 2 単位の当該酵素が産生されていた。

30

【 0 1 1 3 】

対照として、ストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌『X L 1 - B l u e』株を、アンピシリンを含まないこと以外は上記と同一の組成の培地を用い、上記と同一の条件で培養し、さらに上記と同様に菌体抽出液を得、透析した。得られた透析内液には、非還元性糖質生成酵素活性は認められなかった。このことは、形質転換体『G Y 2』がこの発明の非還元性糖質生成酵素の製造に有用であることを示している。

40

【 0 1 1 4 】

【実施例 4 - 3】

形質転換体を用いる酵素の製造

実施例 3 - 3 の方法で得た形質転換体『G Y 3』を、1 % (w / v) マルトース、3 % (w / v) ポリペプトン、1 % (w / v) 『ミースト P I G』（アサヒビール食品株式会

50

社製)、0.1%(w/v) 燐酸一水素カリウム、100 μg/ml アンピシリン及び水からなる液体培地(pH 7.0)を用いたこと以外は実施例4-2と同様にして培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物1mlあたりに換算すると約15単位産生されていた。この上清を実施例2-2に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品が非還元性糖質生成酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が40を越え且つ60未満の範囲の中温域にあること及び、至適pHがpH 7未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。

【0115】

【実施例4-4】

形質転換体を用いる酵素の製造

実施例3-4の方法で得た形質転換体『GY4』を、2%(w/v) マルトース、4%(w/v) ペプトン、1%(w/v) 酵母エキス、0.1% 燐酸二水素ナトリウム、200 μg/ml アンピシリン及び水からなる液体培地(pH 7.0)を用いたこと以外は実施例4-2と同様にして培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の非還元性糖質生成酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物1mlあたりに換算すると約60単位産生されていた。この上清を実施例2-2に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品が非還元性糖質生成酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が40を越え且つ60未満の範囲の中温域にあること及び、至適pHがpH 7未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明の非還元性糖質生成酵素を得た。

【0116】

【実施例5】

トレハロース遊離酵素

【0117】

【実施例5-1】

酵素の産生

実施例2-1の方法にしたがって、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)をファーマンターで培養した。引き続き、実施例2-2の方法にしたがって、得られた培養物の一部を採り、菌体と上清液に分離した後、菌体抽出液を得た。この培養上清と菌体抽出液のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、培養上清には当該酵素活性が僅かであるのに対して、菌体抽出液には当該酵素活性が、培養物1mlあたりに換算して約0.3単位確認された。

【0118】

【実施例5-2】

酵素の精製

実施例2-1の方法にしたがって得た培養物約80lを、8,000rpmで30分間遠心分離することにより、湿重量で約800gの菌体を得た。その菌体を2lの10M 燐酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し超音波ホモジナイザー(株式会社エスエムテール製、『モデルUH-600』)で処理した。処理液を、10,000rpmで30分間遠心分離し、その上清約2lを回収した。この上清液に飽和度0.7になるように硫酸を加え溶解させ、4、24時間放置した後、10,000rpmで30分間遠心分離し、硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mM 燐酸緩衝液(pH 7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して48時間透析し、10,000rpmで30分間遠心分離して不溶物を除去した。この透析内液約1lを、約1.3lの陰イオン交換樹脂(三菱化学株式会社製、商品名『セパビーズFP-DA13ゲル』)を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い0Mから0.6Mまで直線的に濃度が上昇する食塩を含む10mM 燐酸緩衝液(pH 7.0)で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分のトレハロース遊離酵素活性を測定した。その結果、約0.2Mの食塩を含む緩衝液でカラムから溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した

10

20

30

40

50

。

【 0 1 1 9 】

合一した溶液に硫安を濃度 1 M になるように加えて 4 で 1 2 時間放置した後、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清を疎水性ゲル（東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール 6 5 0 M ゲル』）を用いる疎水性カラムクロマトグラフィーに供した。ゲル量は約 3 0 0 m l とした。ゲルは使用に先立って、1 M 硫安を含む 1 0 m M 燐酸緩衝液（p H 7 . 0 ）で平衡化した。溶出は、通液に伴い 1 M から 0 M まで直線的に濃度が下降する硫安水溶液で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分のトレハロース遊離酵素活性を測定した。その結果、約 0 . 5 M の硫安を含む緩衝液で溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。

10

【 0 1 2 0 】

合一した溶液を 1 0 m M 燐酸緩衝液（p H 7 . 0 ）に対して透析し、その透析内液を、1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離した。この上清を回収し、約 4 0 m l の陰イオン交換樹脂（東ソー株式会社製、商品名『D E A E - トヨパール 6 5 0 S ゲル』）を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、通液に伴い 0 M から 0 . 2 M まで直線的に濃度が上昇する食塩水溶液で行った。カラムからの溶出物を分画採取し、各画分のトレハロース遊離酵素活性を測定した。その結果、約 0 . 1 5 M の食塩で溶出された画分に顕著な当該酵素活性が認められ、これらの画分を合一した。合一した液を引き続き、約 3 8 0 m l の『ウルトロゲル A c A 4 4 ゲル』（フランス、セブラコル社製）を用いるゲル濾過クロマトグラフィーに供し、顕著な当該酵素活性の認められた画分を回収した。以上の、精製の各工程におけるトレハロース遊離酵素の酵素活性量、比活性、収率を表 5 に示す。

20

【 0 1 2 1 】

【表 5】

工 程	トレハロース遊離酵素 の活性量 (単位)	比 活 性 (単位／m g 蛋白)	収 率 (%)
菌体の抽出液	2 4 , 0 0 0	—	1 0 0
硫安塩析後の透析内液	2 2 , 5 0 0	0 . 6	9 4
セパビーズカラム溶出液	1 5 , 6 0 0	2 . 0	6 5
疎水カラム溶出液	6 , 4 0 0	2 5 . 3	2 7
トヨパールカラム溶出液	4 , 0 0 0	1 3 1	1 7
ゲル濾過溶出液	2 4 6	7 1 3	1 . 0

30

40

【 0 1 2 2 】

上記のゲル濾過クロマトグラフィーで溶出され回収した溶液を、常法にしたがい、7 . 5 % (w / v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、単一の蛋白質バンドが確認された。この結果は、上記で得た、ゲル濾過クロマトグラフィーからの溶出物が、電気泳動的に均質な状態にまで精製された、トレハロース遊離酵素の精製標品であることを示している。

【 0 1 2 3 】

【実施例 5 - 3】

50

酵素の性質

【0124】

【実施例5-3(a)】

作用

後記実施例8-3の方法で得た、トレハロース構造有する非還元性糖質としての - グルコシルトレハロース、 - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース、 - マルトペンタオシルトレハロース及び、還元性糖質としてのマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースのいずれか1種の糖質を固形分濃度2%(w/v)となるよう水に溶解させて基質水溶液を調製した。それぞれの基質水溶液に、実施例5-2の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を基質固形分1g当たり2単位の割合で加え、50℃、pH6.0で48時間反応させた。反応産物を実施例2-3(a)の方法に準じて脱塩した後HPLCで分析し、各反応産物中の糖質の組成比を求めた。結果を表6に示す。なお、表6においては、 - グルコシルトレハロース、 - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース及び - マルトペンタオシルトレハロースは、それぞれ、グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトトリオシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース及びマルトペンタオシルトレハロースと表示した。

10

【0125】

【表6】

20

基 質	反 応 産 物	溶 出 時 間 (分)	組 成 比 (%)
グルコシルトレハロース	トレハロース	4 8 . 5	1 6 . 8
	グルコース	5 7 . 2	8 . 2
	グルコシルトレハロース	4 3 . 3	7 5 . 0
マルトシルトレハロース	トレハロース	4 8 . 5	4 4 . 1
	マルトース	5 0 . 8	4 4 . 4
	マルトシルトレハロース	3 8 . 9	1 1 . 5
マルトトリオシルトレハロース	トレハロース	4 8 . 5	4 0 . 5
	マルトトリオース	4 6 . 2	5 9 . 0
	マルトトリオシルトレハロース	3 5 . 4	0 . 5
マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	4 8 . 5	3 5 . 0
	マルトテトラオース	4 2 . 1	6 4 . 2
	マルトテトラオシルトレハロース	3 2 . 7	0 . 3
マルトヘンタオシルトレハロース	トレハロース	4 8 . 5	2 9 . 5
	マルトヘンタオース	3 8 . 2	7 0 . 2
	マルトヘンタオシルトレハロース	3 0 . 2	0 . 3
マルトトリオース	マルトトリオース	4 6 . 2	1 0 0 . 0
マルトテトラオース	マルトテトラオース	4 2 . 1	1 0 0 . 0
マルトヘンタオース	マルトヘンタオース	3 8 . 2	1 0 0 . 0
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	3 5 . 2	1 0 0 . 0
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	3 2 . 6	1 0 0 . 0

【 0 1 2 6 】

表 6 の結果から明らかなように、実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質のトレハロース部分とグリコシル部分との間の結合を特異的に加水分解し、トレハロースとグルコース重合度 1 以上の還元性糖質とを生成した。一方、マルトトリオース以下のマルトオリゴ糖は、トレハロース遊離酵素によって全く作用をうけなかった。

【 0 1 2 7 】

【 実施例 5 - 3 (b) 】

10

20

30

40

50

分子量

実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を、分子量マーカー（日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製）と並行して、10%（w/v）ポリアクリルアミドゲルを用いる、通常の SDS - PAGE に供した。泳動後、分子量マーカーの泳動位置と比較した結果、当該酵素の分子量は約 62,000 ± 5,000 ダルトンであった。

【0128】

【実施例 5 - 3（c）】

等電点

実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を、常法にしたがい、両性電解質『アンフォライン』（スウエーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製）を 2%（w/v）の濃度で含有するポリアクリルアミドゲルを用いる等電点電気泳動に供した。泳動後、ゲルの pH を測定した結果、当該酵素の等電点は約 4.7 ± 0.5 であった。

【0129】

【実施例 5 - 3（d）】

至適温度及び至適 pH

実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を用いて、当該酵素活性に対する温度の影響及び pH の影響を調べた。温度の影響を調べる際には、適宜の各温度で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。pH の影響を調べる際には、適宜の 20 mM 緩衝液を用いて適宜の各 pH 条件下で反応させたこと以外は活性測定法にしたがって操作した。それぞれの操作において、各反応系に認められた還元力の増加量の相対値（%）を算出し、相対酵素活性（%）とした。結果を図 8（温度の影響）及び図 9（pH の影響）に示す。図 8 で横軸は反応温度を、図 9 で横軸は反応 pH をそれぞれ示す。図 8 に示されるように、当該酵素の至適温度は、pH 6.0、30 分間反応で、約 50 乃至約 55 付近であった。図 9 に示されるように、当該酵素の至適 pH は、50、30 分間反応で pH 約 6.0 付近であった。

【0130】

【実施例 5 - 3（e）】

温度安定性及び pH 安定性

実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品を用いて、当該酵素の温度安定性及び pH 安定性を調べた。温度安定性は、当該酵素の精製標品を 20 mM 燐酸緩衝液（pH 7.0）で希釈し、適宜の各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定して調べた。pH 安定性は、当該酵素の精製標品を適宜の各 pH の 50 mM 緩衝液で希釈し、4 で 24 時間保持した後、pH を 6 に調整し、残存する酵素活性を測定して調べた。結果を図 10（温度安定性）及び図 11（pH 安定性）に示す。図 10 で横軸は酵素の保持温度を、図 11 で横軸は酵素の保持 pH をそれぞれ示す。図 10 に示されるように、当該酵素は約 50 付近まで安定であった。図 11 に示されるように、当該酵素は、pH 約 4.5 乃至約 10.0 の範囲で安定であった。

【0131】

以上の結果は、実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素が、中温域に至適温度を有するこの発明のトレハロース遊離酵素であることを示している。

【0132】

【実施例 5 - 4】

部分アミノ酸配列

実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品の一部を蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約 80 µg を N 末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N 末端アミノ酸配列は、『プロテインシーケンサー モデル 473A』（米国、アプライドバイオシステムズ社製造）を用い、N 末端から 20 残基まで分析した。得られた配列は、配列表における配列番号 14 に示すアミノ酸配列であった。

【0133】

実施例 5 - 2 の方法で得たトレハロース遊離酵素の精製標品の一部を 10 mM トリス - 塩

10

20

30

40

50

酸緩衝液 (pH 9.0) に対して透析した後、限外濾過膜 (東ソー株式会社製、商品名『ウルトラセント - 30』) を用い、常法にしたがい操作して、濃度約 1 mg/ml にまで濃縮した。この濃縮液 (0.2 ml) に 10 µg のリジルエンドペプチダーゼ試薬 (和光純薬株式会社販売) を加え、30、22 時間反応させて当該酵素を消化し、ペプチドを生成させた。反応産物を、『ノバパック C18 カラム』 (直径 4.5 mm × 長さ 150 mm、ウォーターズ社製) を用いる逆相 HPLC に供し、ペプチドを分離した。温度は室温で行った。溶出は、通液に伴い 60 分間で 24% (v/v) から 48% (v/v) まで直線的に濃度が上昇するアセトニトリルを含む 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液で、流速 0.9 ml/分で行った。カラムから溶出されたペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 2 個のペプチド、『RT 18』 (保持時間約 18 分) 及び『RT 33』 (保持時間約 33 分) を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200 µl の 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む 50% (v/v) アセトニトリル水溶液に溶解した。これらのペプチド溶液をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 20 残基までアミノ酸配列を分析した。ペプチド『RT 18』からは、配列表における配列番号 15 に示すアミノ酸配列が、またペプチド『RT 33』からは、配列表における配列番号 16 に示すアミノ酸配列が得られた。

【0134】

【実施例 6】

トレハロース遊離酵素をコードする DNA

【0135】

【実施例 6 - 1】

遺伝子ライブラリーの作製と検索

実施例 3 - 1 の方法にしたがって、アルスロバクター・スピーシーズ S34 (FERMBP - 6450) の遺伝子ライブラリーを作製した。引き続き、この遺伝子ライブラリーを、プローブとしてこの発明のトレハロース遊離酵素をコードし得る塩基配列のオリゴヌクレオチドを下記のとおり調製して用いたこと以外は実施例 3 - 1 に記載の条件でコロニーハイブリダイゼーション法を実施して検索した。プローブは、実施例 5 - 4 で明らかにした、配列表の配列番号 15 に示すアミノ酸配列における第 12 乃至 20 番目のアミノ酸からなる配列に基づいて化学合成した、配列表における配列番号 31 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、常法にしたがい [- ³²P] ATP 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位体標識して調製した。斯かるプローブと顕著なハイブリダイゼーションを示した形質転換体を選択した。

【0136】

実施例 3 - 2 の方法にしたがって、上記で選択した形質転換体より組換え DNA を抽出し、本実施例におけるプローブを用いて通常のサザン分析法により分析した。分析の結果に基づき作成した制限酵素地図は、図 5 に示した実施例 3 - 1 乃至 3 - 2 で得た組換え DNA『pGY1』の場合と一致した。そして、図 5 に示されるように、本実施例による組換え DNA は、図中斜線矢印で示される、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列を、制限酵素 Pst I 及び Kpn I による認識部位の間の約 2,200 塩基対からなる領域内に含有していることが判明した。そこで、以下、組換え DNA『pGY1』を用いて、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする DNA の塩基配列の解読を進めた。

【0137】

【実施例 6 - 2】

塩基配列の解読

実施例 3 - 2 の方法で得た組換え DNA『pGY1』を、常法にしたがい、制限酵素 Pst I で完全に消化した。消化産物を、通常のアガロースゲル電気泳動法を用いて、生成された約 3,300 塩基対の DNA 断片を除去し、生成された約 5,200 塩基対の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片を常法にしたがって連結反応に供し、常法にしたがって連結産物でストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌株『XL1 - Blue』

10

20

30

40

50

e』株を形質転換した。得られた形質転換体より常法により組換えDNAを抽出した。この組換えDNAが、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列を含む約2,200塩基対からなる領域を含有することを常法により確認し、『pGZ2』と命名した。ここで得た、組換えDNA『pGZ2』が導入されてなる形質転換体を『GZ2』と命名した。

【0138】

組換えDNA『pGZ2』の塩基配列を、通常ジデオキシ法により分析したところ、当該組換えDNAは、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)に由来する、配列表における配列番号32に示す、2,218塩基対からなる塩基配列を含有していた。この塩基配列は、配列番号32に併記したアミノ酸配列をコードし得るものであった。このアミノ酸配列と、実施例5-4で確認されたこの発明のトレハロース遊離酵素の部分アミノ酸配列である、配列表における配列番号14乃至16のアミノ酸配列とを比較した。その結果、配列表における配列番号14、15及び16に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号32に併記したアミノ酸配列における第1乃至20番目、第298乃至317番目及び第31乃至50番目のアミノ酸配列と完全に一致した。以上のことは、実施例5で得たこの発明のトレハロース遊離酵素が、配列表における配列番号32に併記したアミノ酸配列、すなわち、配列番号9に示すアミノ酸配列を有することを示している。また、以上のことは、当該酵素は、アルスロバクター・スピーシーズS34(FERM BP-6450)においては、配列表における配列番号32に示す塩基配列における第477乃至2,201番目の塩基からなる配列、すなわち、配列番号17に示す塩基配列によりコードされていることをも示している。以上に示した組換えDNA『pGZ2』の構造は図12にまとめている。

【0139】

実施例5の方法で得られるこの発明のトレハロース遊離酵素の、上記で明らかにしたアミノ酸配列と、トレハロース遊離酵素としての作用を有する公知の他の酵素のアミノ酸配列とを、実施例3-2に準じて比較し、それぞれ相同性(%)を求めた。公知の酵素として、特開平7-298880号公報に開示されたアルスロバクター・スピーシーズQ36由来のもの、特開平7-298880号公報に開示されたリゾビウム・スピーシーズM-11由来のもの、特開平8-336388号公報に開示されたスルフォロバス・アシドカルダリウスATCC33909由来のもの及び、再公表特許WO95/34642号公報に開示されたスルフォロバス・ソルファタリカスKM1由来のものをを用いた。以上の公知の酵素は上記公報に記載のとおり、いずれも中温域以外に適温度を有するものである。なお、以上の公知の酵素のアミノ酸配列は、米国国立予防衛生研究所作成のDNAデータベース『ジェンバンク(GenBank)』から、それぞれのアクセッション番号『D63343』、『D64130』、『D78001』及び『D83245』により入手することもできる。求められた相同性を表7に示す。

【0140】

【表7】

アミノ酸配列(*)の比較の対象とした酵素の由来	アミノ酸配列の相同性
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36 (D63343)	59.9%
<i>Rhizobium</i> sp. M-11 (D78001)	59.1%
<i>Sulfolobus solfataricus</i> KM1 (D64130)	37.7%
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC 33909 (D83245)	36.0%

*: 括弧内には、データベース『ジェンバンク』におけるそれぞれのアクセッション番号を示した。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 1 】

表 7 に示すように、実施例 5 によるこの発明のトレハロース遊離酵素は、中温域以外に至適温度を有する公知の酵素のうちではアルスロバクター・スピーシーズ Q 3 6 由来の酵素と最も高い 5 9 . 9 % というアミノ酸配列の相同性を示した。この結果は、この発明のトレハロース遊離酵素が、配列番号 9 に示すアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を通常は含有することを意味している。また、アミノ酸配列の比較結果から、実施例 5 による当該酵素と上記の 4 種類の公知の酵素は、配列表における配列番号 1 0 及び 1 3 に示すアミノ酸配列を共通して含有していることが判明した。実施例 5 による当該酵素は、配列表における配列番号 9 のアミノ酸配列における第 1 4 8 乃至 1 5 3 番目、第 1 8 5 乃至 1 9 0 番目、第 2 4 8 乃至 2 5 4 番目及び第 2 8 5 乃至 2 9 1 番目のアミノ酸からなる部分に見られるとおり、配列番号 1 0 乃至 1 3 のアミノ酸配列を部分アミノ酸配列として含有している。上記で比較の対象とした 4 種類の酵素も、いずれも、それぞれ対応する部分にこれらの部分アミノ酸配列を含有している。実施例 5 による当該酵素ならびに比較の対象とした酵素がいずれも共通して、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度 3 以上の非還元性糖質におけるトレハロース部分とそれ以外の部分との間を特異的に加水分解する作用を有していることから、上記で見出された配列表における配列番号 1 0 及び 1 3 に示す部分アミノ酸配列が斯かる作用の発現に関わっていることが示唆された。したがってこの結果は、この発明のトレハロース遊離酵素が、配列表における配列番号 1 0 及び 1 3 に示すアミノ酸配列を含有するとともに中温域に至適温度を有することにより特徴づけられることを示している。

【 0 1 4 2 】

【実施例 6 - 3】

DNA を導入してなる形質転換体

配列表における配列番号 1 7 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端の配列に基づいて、それぞれ、配列表における配列番号 3 3 及び 3 4 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがい化学合成した。センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、これらのオリゴヌクレオチドそれぞれ 8 5 n g と、鋳型として、実施例 6 - 2 の方法で得た組換え DNA 『 p G Z 2 』 1 0 0 n g とを反応管で混合し、他の試薬の添加量は実施例 3 - 3 に準じて P C R を行った。P C R の温度制御は、9 5 ° C 1 分間の後、9 8 ° C 2 0 秒間、7 0 ° C 3 0 秒間及び 7 2 ° C 4 分間を 2 5 サイクル、最後に 7 2 ° C 1 0 分間とした。P C R 産物における DNA を常法にしたがい回収して、約 1 , 7 0 0 塩基対の DNA を得た。この DNA と、予め制限酵素 E c o R I で切断し、宝酒造製 『 DNA B l u n t i n g K i t 』 を用いて平滑化しておいたファルマシア製プラスミドベクター 『 p K K 2 3 3 - 3 』 とを混合し、通常のライゲーション法により連結した。引き続き、連結産物を常法にしたがって操作して、上記の約 1 , 7 0 0 塩基対の DNA が挿入された組換え DNA を得た。得られた組換え DNA を通常のジデオキシ法により解読したところ、当該組換え DNA は、配列表の配列番号 1 7 に示す塩基配列における 3' 末端に 5' - T G A - 3' で示される塩基配列が付加された塩基配列を含有していた。当該組換え DNA を 『 p G Z 3 』 と命名した。以上に示した組換え DNA 『 p G Z 3 』 の構造は図 1 3 にまとめている。

【 0 1 4 3 】

組換え DNA 『 p G Z 3 』 を、常法にしたがい予めコンピテント化しておいた大腸菌 L E 3 9 2 株 (A T C C 3 3 5 7 2) に導入して形質転換体を得た。斯かる形質転換体より、通常のアルカリ - S D S 法により DNA を抽出し、抽出された DNA が 『 p G Z 3 』 であることを常法にしたがって確認し、当該形質転換体を 『 G Z 3 』 と命名した。斯くして、この発明のトレハロース遊離酵素をコードする DNA を導入してなる形質転換体を得た。

【 0 1 4 4 】

【実施例 6 - 4】

DNA を導入してなる形質転換体

配列表における配列番号 17 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端部分の配列に基づいて化学合成した、配列番号 35 及び 36 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いたこと以外は実施例 6-3 と同様にして PCR を行った。PCR 産物としての DNA を常法にしたがい回収して、約 1,700 塩基対の DNA を得た。この DNA を制限酵素 XbaI 及び SpeI で切断した後、これと、制限酵素 XbaI 及び SpeI であらかじめ切断しておいた、実施例 3-4 の方法で得たプラスミドベクター『pKK4』とを、通常のライゲーション法により連結した。連結産物を常法にしたがって操作して、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列を含有する組換え DNA を得た。斯くして得た組換え DNA を『pKGZ1』と命名した。

10

【0145】

引き続き、実施例 3-4 と同様に、『オーバーラップ・エクステンション法』により上記で得た組換え DNA『pKGZ1』における配列番号 17 の塩基配列の 5' 末端上流部分の塩基配列を改変した。まず、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、プラスミドベクター『pKK4』の塩基配列に基づいて常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 26 及び 37 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、鋳型として、上記で得た組換え DNA『pKGZ1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った(「第 1 段 PCR-C」という)。これと並行して、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 17 の塩基配列に基づいてそれぞれ常法にしたがい化学合成した、配列表における配列番号 38 及び 39 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、鋳型として、上記で得た組換え DNA『pKGZ1』をそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った(「第 1 段 PCR-D」という)。第 1 段 PCR-C の産物としての DNA を常法にしたがって回収し、約 390 塩基対の DNA を得た。第 1 段 PCR-D の産物としての DNA を常法にしたがい回収して、約 590 塩基対の DNA を得た。

20

【0146】

鋳型として、第 1 段 PCR-C 及び第 1 段 PCR-D の産物として得た DNA の混合物を、センスプライマーとして、第 1 段 PCR-C で用いた配列表における配列番号 26 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、第 1 段 PCR-D で用いた配列表における配列番号 39 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例 3-3 と同様にして PCR を行った(「第 2 段 PCR-B」という)。この PCR の産物としての DNA を常法にしたがい回収し、約 950 塩基対の DNA を得た。

30

【0147】

第 2 段 PCR-B の産物として得た DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、生成した約 270 塩基対の DNA を常法にしたがい回収した。一方、上記で得た組換え DNA『pKGZ1』を制限酵素 EcoRI で切断し、生成した約 6,100 塩基対の DNA を常法にしたがい回収した。これらの DNA を通常のライゲーション法により連結し、連結産物を常法にしたがい操作して、第 2 段 PCR-B の産物由来の約 270 塩基対の DNA を含有する組換え DNA を得た。通常のジデオキシ法により DNA を解読したところ、得られた組換え DNA は、5' 末端から 3' 末端に向けて、配列表における配列番号 8 に示す塩基配列、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列及び、5'-TGA-3' で表される塩基配列がこの順序で連結された塩基配列を含有していた。斯くして得た組換え DNA を『pGZ4』と命名した。なお、組換え DNA『pGZ4』の構造は、配列表における配列番号 8 に示す塩基配列を含有すること以外は、実施例 6-3 の方法で得た組換え DNA『pGZ3』の構造と実質的に同一である。

40

【0148】

組換え DNA『pGZ4』を、宝酒造製の大腸菌コンピテント細胞『BMH71-18mutS』に常法にしたがい導入して形質転換体を得た。斯る形質転換体より通常のアルカリ-SDS 法により DNA を抽出し、抽出された DNA が『pGZ4』であることを常法

50

にしたがって確認し、当該形質転換体を『GZ4』と命名した。斯くして、この発明のトレハロース遊離酵素をコードするDNAを導入してなる形質転換体を得た。

【0149】

【実施例7】

トレハロース遊離酵素の製造

【0150】

【実施例7-1】

アルスロバクター属微生物を用いる酵素の製造

アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450)を、実施例2-1の方法にしたがって、ファーマンターで約72時間培養した。培養後、SF膜を用いて菌体を濃縮して約8lの菌体懸濁液を回収し、更に、その菌体懸濁液を高圧菌体破碎装置(大日本製薬株式会社製、『ミニラボ』)で処理して菌体を破碎し、菌体破碎物を得た。この菌体破碎物を遠心分離し、形成された上清約8.5lを回収し、菌体抽出液を得た。得られた菌体抽出液のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、培養物1mlあたりに換算すると、約0.3単位の当該酵素活性が認められた。この菌体抽出液に飽和度約0.7になるように硫酸を加えて硫酸塩析し、遠心分離で沈殿物を回収し、10mM磷酸緩衝液(pH7.0)に溶解後、同緩衝液に対して透析した。得られた透析内液を、イオン交換樹脂量を約2lとしたこと以外は、実施例5-2に記載の陰イオン交換樹脂(三菱化学株式会社製、商品名『セパピーズFP-DA13ゲル』)を用いる方法に準じてイオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、トレハロース遊離酵素活性画分を回収した。回収した画分を1M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析内液を遠心分離して形成された上清を回収した。回収した上清を、ゲル量を約350mlとしたこと以外は、実施例5-2に記載の疎水性ゲル(東ソー株式会社製、商品名『ブチルトヨパール650Mゲル』)を用いる方法に準じて疎水性カラムクロマトグラフィーに供し、トレハロース遊離酵素活性画分を回収した。回収した酵素が45を越え且つ60未満の範囲の中温域に至適温度を有することと、pH7未満の酸性域に至適pHを有することを確認した。斯くして、約6,400単位のこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。

【0151】

【実施例7-2】

アルスロバクター属微生物を用いる酵素の製造

実施例7-1の方法にしたがって、アルスロバクター・スピーシーズS34 (FERM BP-6450)を培養した。培養物1lに対して100mgのリゾチーム剤(長瀬産業製、商品名『卵白リゾチーム』)を加えた後、通気を停止し、温度・攪拌条件は培養の場合と同じ条件下で培養物を24時間処理して菌体を破碎した。この菌体破碎物を10,000rpmの連続遠心分離に供して上清を回収し、菌体抽出液を得た。引き続き実施例7-1の方法にしたがって、斯かる菌体抽出液を硫酸塩析に供し、塩析物を透析し、透析内液を『セパピーズFP-DA13ゲル』(三菱化学株式会社製)を用いるイオン交換カラムクロマトグラフィーに供してトレハロース遊離酵素活性画分を回収した。回収した画分は、この発明のトレハロース遊離酵素を約16,500単位とともに、この発明の非還元性糖質生成酵素を約5,500単位含むものであった。斯くして、この発明の非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素を含有する酵素剤を得た。

【0152】

【実施例7-3】

形質転換体を用いる酵素の製造

16g/l ポリペプトン、10g/l 酵母エキス及び5g/l 塩化ナトリウムを含む水溶液を500ml容三角フラスコに100ml入れ、オートクレーブで121で15分間処理し、冷却し、無菌的にpH7.0に調製した後、アンピシリンナトリウム塩10mgを無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実施例6-2の方法で得た形質転換体『GZ2』を接種し、37で約20時間通気攪拌培養したものを種培養物とした。次に10l容ファーマンターに、種培養に用いたのと同じ組成の培地を種培養の

場合に準じて7 l調製し、種培養物を70 ml接種し、約20時間通気攪拌培養した。得られた培養物から、常法にしたがい、遠心分離して菌体を回収した。回収した菌体を、10 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、超音波処理して菌体を破碎し、さらに遠心分離により不溶物を除去し、上清を回収して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液を10 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、回収した液がトレハロース遊離酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が45 を越え且つ60 未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。本実施例における培養においては、培養物 1 ml 当たりに換算すると約0.5 単位の当該酵素が産生されていた。

【0153】

対照として、ストラタジーン・クローニング・システムズ製大腸菌『XL1-Blue』株を、アンピシリンを含まないこと以外は上記と同一の組成の培地を用い、上記と同一の条件で培養し、さらに上記と同様に菌体抽出液を得、透析した。得られた透析内液には、トレハロース遊離酵素は認められなかった。このことは、形質転換体『GZ2』がこの発明のトレハロース遊離酵素の製造に有用であることを示している。

【0154】

【実施例7-4】

形質転換体を用いる酵素の製造

実施例6-3の方法で得た形質転換体『GZ3』を、1% (w/v) マルトース、3% (w/v) ポリペプトン、1% (w/v) 『ミーストPIG』(アサヒビール食品株式会社製)、0.1% (w/v) 燐酸一水素カリウム、100 µg/ml アンピシリン及び水からなる液体培地 (pH 7.0) を用いたこと以外は実施例7-3と同様にして培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物 1 ml 当たりに換算すると約70 単位産生されていた。この上清を実施例5-2に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品がトレハロース遊離酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が45 を越え且つ60 未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。

【0155】

【実施例7-5】

形質転換体を用いる酵素の製造

実施例6-4の方法で得た形質転換体『GZ4』を、実施例4-4の方法で培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中のトレハロース遊離酵素活性を測定したところ、当該酵素は、培養物 1 ml 当たりに換算すると約250 単位産生されていた。この上清を実施例5-2に記載の方法にしたがって精製し、この精製標品がトレハロース遊離酵素活性を示し、当該酵素の至適温度が45 を越え且つ60 未満の範囲の中温域にあること及び、至適 pH が pH 7 未満の酸性域にあることを確認した。斯くしてこの発明のトレハロース遊離酵素を得た。

【0156】

【実施例8】

糖質の製造

【0157】

【実施例8-1】

非還元性糖質含有シラップの製造

濃度6% (w/w) の馬鈴薯澱粉乳を加熱して糊化した後、pH 4.5、温度50 に調整し、澱粉固形分1 g 当たり2,500 単位のイソアミラーゼ剤(株式会社林原生物化学研究所製)を加えて20時間反応させた。反応物をpH 6.5に調整し、120 で10分間オートクレーブした後、40 まで冷却し、同温度に維持しつつ、これに、澱粉固形分1 g 当たり150 単位の液化型 - アミラーゼ剤(ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール60L』)を加えて20時間反応させた。この反応物を12

10

20

30

40

50

0 で20分間オートクレーブした後、53℃まで冷却し、pH5.7に調整後、同温度に維持しつつ、澱粉固形分1g当たり1単位の実施例4-1の方法で得た非還元性糖質生成酵素を加えて96時間反応させた。斯くして得た反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過した後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、濃縮して固形分濃度約70%(w/w)のシラップ状物を原料澱粉固形分当たり約90%の収率で得た。

【0158】

DEが24と低く、非還元性糖質として - グルコシルトレハロース、 - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース及び - マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ11.5%、5.7%、29.5%、3.5%及び2.8%含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

10

【0159】

【実施例8-2】

非還元性糖質含有シラップの製造

濃度33%(w/w)のとうもろこし澱粉乳に最終濃度0.1%(w/w)となるように炭酸カルシウムを加え、pH6.5に調整後、これに、澱粉固形分当たり0.2%(w/w)の液化型 - アミラーゼ剤(ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール60L』)を加えて95℃で15分間反応させて澱粉を液化した。この澱粉液化液を120℃で10分間オートクレーブした後、53℃に冷却し、同温度に維持しつつ、澱粉固形分1g当たり、1単位のシュードモナス・スツッチェリ由来マルトテオラオース生成アミラーゼ剤(株式会社林原生物化学研究所製)及び2単位の実施例4-2の方法で得た非還元性糖質生成酵素を加えて48時間反応させた。引き続き反応物に、澱粉固形分1g当たり15単位の - アミラーゼ剤(上田化学製、商品名『 - アミラーゼ2A』)を加え、65℃でさらに2時間反応させた後、120℃で10分間オートクレーブし、次いで冷却した。斯くして得た反応物を濾過した後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、濃縮して固形分濃度約70%(w/w)のシラップを原料澱粉固形分当たり約90%の収率で得た。

20

【0160】

DEが18.5と低く、非還元性糖質として - グルコシルトレハロース、 - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース及び - マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たりそれぞれ9.3%、30.1%、0.9%、0.8%及び0.5%含む本品は、温和で上品な甘味に加えて適度の粘度と保湿性を有しており、甘味剤、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

30

【0161】

【実施例8-3】

非還元性糖質の製造

マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース(いずれも株式会社林原生物化学研究所製)のいずれかの還元性澱粉部分分解物の20%(w/w)水溶液それぞれに、還元性澱粉部分分解物の固形分1g当たり2単位ずつの実施例2-2の方法で得た非還元性糖質生成酵素の精製標品を加え、50℃、pH6.0で48時間作用させ、それぞれの還元性澱粉部分分解物から、非還元性糖質としての - グルコシルトレハロース、 - マルトシルトレハロース、 - マルトトリオシルトレハロース、 - マルトテトラオシルトレハロース及び - マルトペンタオシルトレハロースを生成させた。これら反応物を、それぞれ、常法に従って、加熱による酵素失活、濾過、脱色、脱塩、濃縮した後、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(Na⁺型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製、商品名『XT-1016』)を用いるカラムクロマトグラフィーに供し、反応物中の糖質を分画した。このカラムクロマトグラ

40

50

フィーにおいて、カラム内温度は55℃、糖液の樹脂に対する負荷量は約5% (v/v)とし、移動相として55℃の温水をSV0.13の流速で通液した。カラムからの溶出液の内、固形分重量当たりの上記のいずれかの非還元性糖質の組成比が95% (w/w)以上の溶出液をそれぞれ採取した。採取したそれぞれの溶出液に水酸化ナトリウムを0.1Nになるように加え、100℃で2時間加熱して残存する還元性糖質を分解した。斯くして得た反応物を、それぞれ、活性炭にて脱色し、H型及びOH型のイオン交換樹脂で脱塩し、濃縮、真空乾燥の後、粉碎して、純度99.0%以上のα-グルコシルトレハロース、β-マルトシルトレハロース、α-マルトトリオシルトレハロース、β-マルトテトラオシルトレハロース及びα-マルトペンタオシルトレハロース粉末を得た。

【0162】

高純度の非還元性糖質を含み、DEの極めて低いこれらの製品は、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0163】

【実施例8-4】

非還元性糖質を含む結晶性粉末の製造

マルトペンタオース（株式会社林原生物化学研究所製）の20% (w/w)水溶液を調製した。この水溶液に、マルトペンタオース固形分1g当たり2単位の実施例4-3の方法で得た非還元性糖質生成酵素を加え、50℃で48時間反応させた。この反応によりマルトペンタオースの約75%がβ-マルトトリオシルトレハロースに変換された。この反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製した。

【0164】

その後、60℃で減圧しながら固形分濃度約75% (w/w)まで濃縮し、種結晶としてβ-マルトトリオシルトレハロース結晶を約0.01% (w/v)加え、24時間放置した後、晶出したβ-マルトトリオシルトレハロース結晶を遠心分離で回収し、さらに少量の冷水で洗浄した後、常法により乾燥して非還元性糖質含量の高い結晶性粉末を原料固形分当たり約50%の収率で得た。

【0165】

DEが0.2未満と極めて低く、非還元性糖質としてβ-マルトトリオシルトレハロースを固形分当たり99.0% (w/w)以上含む低甘味の本品は、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0166】

【実施例8-5】

含水結晶トレハロースの製造

トウモロコシ澱粉を30% (w/w)になるように水中に懸濁し、懸濁液に炭酸カルシウムを0.1% (w/w)加えた。pH6.0に調整後、澱粉固形分当たり0.2% (w/w)の液化型α-アミラーゼ剤（ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール60L』）を加え、95℃で15分間反応させて澱粉を糊化・液化した。得られた澱粉液化液を120℃で30分間オートクレーブした後、51℃に冷却し、pH5.7に調整後、同温度で維持しつつ、澱粉固形分1g当たり、300単位のイソアミラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）、2単位のシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ剤（株式会社林原生物化学研究所製）、2単位の実施例4-1の方法で得た非還元性糖質生成酵素及び、10単位の実施例7-1の方法で得たトレハロース遊離酵素を加え、64時間反応させた。この反応物を97℃で30分間加熱して酵素を失活させた後、50℃に調整し、澱粉固形分1g当たり10単位のグルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業製、商品名『グルコチーム』）を加えて24時間反応させた。斯くして得た反応物を95℃で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、固形分濃度約60%

10

20

30

40

50

(w/w)まで濃縮して、固形分当たりトレハロースを84.1%(w/w)含むシラップを得た。このシラップを減圧下で固形分濃度約83%(w/w)にまで濃縮し、助晶機にとり、シラップの容量に対して約0.1%(w/v)の含水結晶トレハロースを種晶として加えて約2時間攪拌助晶した。晶出したトレハロースを遠心分離で回収し、少量の水で洗い蜜を除き、45の温風で乾燥させ、純度約99%のトレハロースの含水結晶を原料澱粉当たり約50%の収率で得た。

【0167】

本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

10

【0168】

【実施例8-6】

無水結晶トレハロースを含む結晶性粉末の製造

実施例8-5の方法でトレハロースの含水結晶を調製し、これを、ジャケット付き回転式真空乾燥機を用いて減圧乾燥した。減圧乾燥は、温度90、気圧-300乃至-350 mmHgの条件で、約7時間行った。減圧乾燥後、温度を常温に、気圧を常圧に戻して、製品を回収し、製品重量当たり無水結晶トレハロースを90%(w/w)以上含む結晶性粉末を得た。

【0169】

無水結晶トレハロースには含水物の水分を吸収し、トレハロース含水結晶に変わる性質がある。無水結晶トレハロース含量の高い本品は、水分を含有している飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする各種組成物ならびにそれら組成物の原料及び中間加工物を脱水又は乾燥するための安全で無害な脱水剤として有用である。また、まるやかで上品な甘味を有する本品は、甘味剤、呈味改善剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする組成物一般に有利に配合使用できる。

20

【0170】

【実施例8-7】

トレハロース含有シラップの製造

濃度27%(w/w)のタピオカ澱粉乳に、最終濃度0.1%(w/w)となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH6.0に調整し、これに、澱粉固形分当たり0.2%(w/w)の液化型 - アミラーゼ剤(ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『ターマミール60L』)を加え、95で15分間反応させ、澱粉を糊化・液化した。この澱粉液化液を2 kg/cm²で30分間オートクレーブした後、53に冷却し、pH5.7に調整し、同温度に維持しつつ、これに、澱粉固形分1 g当たり、500単位のプルランナーゼ剤(ノボ・ノルディスク・インダストリー製、商品名『プロモザイム200L』)、1単位のシュードモナス・スツッチェリ由来のマルトテトラオース生成アミラーゼ剤(株式会社林原生物化学研究所製)及び、約2単位の非還元性糖質生成酵素とともに約6単位のトレハロース遊離酵素を含有する実施例7-2の方法で得た酵素剤を加えて72時間反応させた。斯くして得た反応物を97で15分間保った後、冷却し、濾過して濾液を採取した。この濾液を、常法により、活性炭を用いる脱色処理及びイオン交換樹脂を用いる脱塩処理により精製し、更に濃縮して固形分濃度70%(w/w)のシラップを、原料固形分当たり約92%の収率で得た。

30

40

【0171】

本品は固形分当たりトレハロースを35.2%、 - グルコシルトレハロースを3.4%、グルコースを1.8%、マルトースを37.2%、マルトトリオースを9.1%およびマルトテトラオース以上のオリゴ糖を13.3%含有しており、まるやかで上品な甘味、低い還元性、低い粘度、適度の保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0172】

【実施例8-8】

50

無水結晶トレハロースを含む結晶性粉末の製造

アミロース（株式会社林原生物化学研究所製、商品名『EX-I』）1重量部を水15重量部に加熱溶解し、温度53、pH5.7に調整した。これに、アミロース固形分1g当たり、2単位の実施例4-3の方法で得た非還元性糖質生成酵素及び6単位の実施例7-4の方法で得たトレハロース遊離酵素を加え、48時間反応させた。反応物を97で30分間加熱して酵素を失活させ、50、pH5.0に調整後、グルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業製、商品名『グルコチーム』）をアミロース固形分1g当たり10単位加え、さらに40時間反応させた。斯くして得た反応物を95で10分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過した後、常法により、活性炭を用いる脱色及びイオン交換樹脂を用いる脱塩により精製し、固形分濃度約60%（w/w）まで濃縮して固形分当たりトレハロースを82.1%含むシラップを得た。

10

【0173】

このシラップを実施例8-3と同様にしてカラムクロマトグラフィーに供し、固形分当たりトレハロースを約98%（w/w）含む画分を採取し、減圧下で加熱しながら固形分濃度約85%（w/w）まで濃縮してシラップを得た。このシラップに、その容量に対して約2%（w/v）の無水結晶トレハロースを種晶として加え、攪拌しながら120で5分間混合後、プラスチック製バットに分注し、100で減圧乾燥して結晶化させた。その後、バットからブロック状物を取り出し、切削機により粉碎したところ、結晶化率約70%の無水結晶トレハロースを含む水分含量約0.3%（w/w）の固状物を、原料アミロース固形分当たり約70%の収率で得た。この固状物を常法にしたがって粉碎し、無水結晶トレハロースを含む結晶性粉末を得た。

20

【0174】

無水結晶トレハロースには含水物の水分を吸収し、トレハロース含水結晶に変わる性質があるので、無水結晶トレハロース含量の高い本品は、水分を含有している飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする各種組成物ならびにそれら組成物の原料及び中間加工物を脱水又は乾燥するための安全で無害な脱水剤として有用である。また、まろやかで上品な甘味を有する本品は、甘味剤、呈味改善剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品及び医薬品をはじめとする組成物一般に有利に配合使用できる。

【0175】

【発明の効果】

30

以上説明したように、この発明は、中温域に至適温度を有し、望ましくは、酸性域に至適pHを有する、新規な非還元性糖質生成酵素ならびにトレハロース遊離酵素の発見に基づくものである。この発明の両酵素は、例えば、斯かる酵素を産生する微生物の培養によりその所望量を得ることができる。また、この発明による両酵素をコードするそれぞれのDNAは、組換え型蛋白質としての両酵素の製造に極めて有用であり、当該DNAを導入してなる形質転換体を用いる場合にも、この発明の両酵素の所望量を得ることができる。この発明の両酵素は、トレハロースをはじめとするトレハロース構造を有する非還元性糖質の中温域・酸性域での製造に有利に用いることができる。とりわけ、中温域・酸性域に至適条件を有する他の糖質関連酵素との併用により糖質を製造する際には、目的の糖質を極めて効率的に得ることができる。しかも、この発明の両酵素はアミノ酸配列まで明らかにされた酵素であり、飲食物や医薬品への配合使用を前提とする当該非還元性糖質の製造に安心して使用し得る。斯くして得られる非還元性糖質ないしは斯かる非還元性糖質を含む低還元性糖質は、温和で上品な甘味を有し、そして、何よりも、糖質中の還元性基を有しないか又は大幅に低減しているので、着色や変質の懸念なく飲食物、化粧品、医薬品を始めとする組成物一般に有利に配合使用できる実益がある。

40

【0176】

この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

【0177】

【配列表】

50

配列

Pro	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Ile	Ser	Ala	Glu	Phe	Thr	Leu	Phe	10
1				5				10						15		
Asp	Ala	Ala	Arg	Ile	Val	Pro	Tyr	Leu	His	Arg	Leu	Gly	Ala	Asp	Trp	
			20					25					30			
Leu	Tyr	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	His	Gly	
		35					40				45					
Tyr	Asp	Val	Val	Asp	His	Ser	Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	
	50					55				60						20
Glu	Gly	Leu	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Ala	His	Glu	Arg	Gly	Met	Gly	
65					70				75					80		
Val	Val	Val	Asp	Ile	Val	Pro	Asn	His	Val	Gly	Val	Ala	Thr	Pro	Lys	
			85					90					95			
Ala	Asn	Arg	Trp	Trp	Trp	Asp	Val	Leu	Ala	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser	Glu	
		100						105				110				
Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Asp	Ile	Asp	Trp	Glu	Phe	Gly	Gly	Gly	Arg	Leu	30
	115						120				125					
Arg	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Glu	Leu	Asp	Ala	Leu	Arg	
	130					135				140						
Val	Asp	Gly	Asp	Glu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Glu	His	Arg	Phe	Pro	Ile	Ala	
145				150					155					160		
Glu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Arg	Glu	Val	His	Asp	Arg	Gln	His	
			165					170				175				40
Tyr	Glu	Leu	Met	Ser	Trp	Arg	Arg	Ala	Asp	His	Asp	Leu	Asn	Tyr	Arg	

180	185	190	
Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala Ala Val Arg Val Glu Asp Pro			
195	200	205	
Arg Val Phe Asp Asp Thr His Arg Glu Ile Gly Arg Trp Ile Ala Glu			
210	215	220	
Gly Leu Val Asp Gly Leu Arg Val Asp His Pro Asp Gly Leu Arg Ala			
225	230	235	240
Pro Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gly Arg Pro			10
245	250	255	
Ile Trp Val Glu Lys Ile Ile Glu Gly Asp Glu Arg Met Pro Pro Gln			
260	265	270	
Trp Pro Ile Ala Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Ala Leu Ala Gly Ile Asp			
275	280	285	
Arg Val Leu Val Asp Pro Ala Gly Glu His Pro Leu Thr Gln Ile Val			20
290	295	300	
Asp Glu Ala Ala Gly Ser Pro Arg Arg Trp Ala Glu Leu Val Pro Glu			
305	310	315	320
Arg Lys Arg Ala Val Ala Arg Gly Ile Leu Asn Ser Glu Ile Arg Arg			
325	330	335	
Val Ala Arg Glu Leu Gly Glu Val Ala Gly Asp Val Glu Asp Ala Leu			
340	345	350	30
Val Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ser Val Tyr Arg Ser Tyr Leu Pro Phe			
355	360	365	
Gly Arg Glu His Leu Asp Glu Ala Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala			
370	375	380	
Pro Gln Leu Glu Ala Asp Leu Ala Ala Val Gly Ala Ala Leu Ala Asp			
385	390	395	400
Pro Gly Asn Pro Ala Ala Leu Arg Phe Gln Gln Thr Ser Gly Met Ile			40
405	410	415	

Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Asn Ala Phe Tyr Arg Tyr Pro Arg Leu
 420 425 430
 Thr Ser Leu Thr Glu Val Gly Gly Asp Pro Ser Leu Phe Ala Ile Asp
 435 440 445
 Ala Ala Ala Phe His Ala Ala Gln Arg Asp Arg Ala Ala Arg Leu Pro
 450 455 460
 Glu Ser Met Thr Thr Leu Thr Thr His Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp
 465 470 475 480
 Thr Arg Ala Arg Ile Thr Ala Leu Ala Glu Ala Pro Glu Arg Trp Arg
 485 490 495
 Arg Phe Leu Thr Glu Val Gly Gly Leu Ile Gly Thr Gly Asp Arg Val
 500 505 510
 Leu Glu Asn Leu Ile Trp Gln Ala Ile Val Gly Ala Trp Pro Ala Ser
 515 520 525
 Arg Glu Arg Leu Glu Ala Tyr Ala Leu Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly
 530 535 540
 Glu Ser Thr Asp Trp Ile Asp Gly Asp Pro Ala Phe Glu Glu Arg Leu
 545 550 555 560
 Thr Arg Leu Val Thr Val Ala Val Glu Glu Pro Leu Val His Glu Leu
 565 570 575
 Leu Glu Arg Leu Val Asp Glu Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly
 580 585 590
 Leu Ala Ala Lys Leu Leu Gln Leu Leu Ala Pro Gly Thr Pro Asp Val
 595 600 605
 Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Trp Asp Arg Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn
 610 615 620
 Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala Ser Glu Leu Leu Asp Arg Leu
 625 630 635 640
 Asp Gly Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp Glu Thr Gly Ala Val Lys Thr

10

20

30

40

645 650 655
Leu Val Val Ser Arg Ala Leu Arg Leu Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu
660 665 670
Phe Thr Ala Tyr His Pro Val Thr Ala Arg Gly Ala Gln Ala Glu His
675 680 685
Leu Ile Gly Phe Asp Arg Gly Gly Ala Ile Ala Leu Ala Thr Arg Leu
690 695 700
Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Gly Gly Trp Gly Asp Thr Val Val Asp
705 710 715 720
Val Gly Glu Arg Ser Leu Arg Asp Glu Leu Thr Gly Arg Glu Ala Arg
725 730 735
Gly Ala Ala Arg Val Ala Glu Leu Phe Ala Asp Tyr Pro Val Ala Leu
740 745 750
Leu Val Glu Thr

10

20

【 0 1 7 8 】

配列番号 : 2

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

30

配列

Asp Ile Val Pro Asn His

1

5

【 0 1 7 9 】

配列番号：3

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

10

Gly Thr Thr Gly Tyr Asp

1

5

【 0 1 8 0 】

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe

1

5

10

15

Asp Ala Ala Arg

20

30

【 0 1 8 1 】

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

40

配列

Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala

1

5

10

15

Ser Glu Leu Leu

20

【 0 1 8 2 】

配列番号 : 6

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

10

Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu

1

5

10

15

Tyr Ala Asp Tyr

20

【 0 1 8 3 】

配列番号：7

配列の長さ：2268

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

```
CCCGCCAGTA CCTACCGCCT TCAGATCTCG GCGGAGTTCA CCCTCTTCGA CGCGGCGCGC 60
ATCGTGCCCT ACCTGCACCG CCTCGGCGCC GACTGGCTGT ACCTCTCGCC GCTGCTCGAG 120
TCCGAGTCGG GCTCCTCGCA CGGCTACGAC GTGGTCGACC ACTCCCGCGT CGACGCCGCC 180
CGCGGCGGGC CGGAGGGGCT CGCCGAGCTC TCCCGTGCGG CGCACGAGCG CGGCATGGGC 240
GTCGTCGTCG ACATCGTGCC CAACCACGTC GCGCTCGCA CGCCGAAGGC GAACCGCTGG 300
TGGTGGGACG TTCTGGCCCG TGGACAGCGG TCGGAGTACG CCGACTACTT CGACATCGAC 360
TGGGAGTTCT GCGGCGGCAG GCTGCGCCTG CCCGTGCTCG GCGACGGCCC CGACGAGCTC 420
GACGCGCTGA GAGTGGATGG CGACGAGCTC GTCTACTACG AGCACCGCTT CCCGATCGCC 480
GAGGGCACCG GCGGCGGCAC CCCGCGCGAG GTGCACGACC GGCAGCACTA CGAGCTGATG 540
TCGTGGCGGC GGGCCGACCA CGACCTCAAC TACCGCCGCT TCTTCGCCGT GAACACGCTC 600
GCCGCCGTAC GCGTCGAAGA CCCGCGCGTG TTCGACGACA CCCACCGCGA GATCGGCCGC 660
TGGATCGCCG AGGGCCTCGT CGACGGCCTG CGCGTCGACC ACCCCGACGG GCTGCGCGCC 720
CCCGGCGACT ACCTGCGCCG TCTCGCCGAG CTCGCCAAG GCAGGCCGAT CTGGGTCGAG 780
AAGATCATCG AGGGCGACGA GCGGATGCCC CCGCAGTGGC CCATCGCCGG CACCACGGGC 840
TACGACGCGC TGGCCGGGAT CGACCGGGTG CTCGTCGACC CCGCGGGCGA GCATCCGCTC 900
ACCCAGATCG TCGACGAGGC GGCAGGCAGC CCCCGGCGCT GGGCCGAGCT GGTTCOCGAG 960
CGCAAGCGGG CCGTCGCCCC CGGCATCCTG AACTCCGAGA TCCGCCGCGT CGCCCGCGAA 1020
CTCGGAGAGG TCGCCGGCGA CGTCGAAGAC GCGCTCGTCG AGATCGCCGC CGCCCTGTCC 1080
GTCTACCGCA GCTACCTGCC GTTCGGGCGC GAGCACCTCG ACGAAGCCGT GGCCGCCGCG 1140
CAGGCCGCGC CCCCCAGCT CGAGGCCGAC CTCGCCGCCG TCGGCGCAGC GCTCGCCGAC 1200
CCGGGCAACC CCGCCGCGCT CCGCTTCCAG CAGACCAGCG GCATGATCAT GGCCAAGGGC 1260
GTCGAGGACA ACGCGTTCTA CCGCTACCCC CGGCTCACCT CGCTGACCGA GGTGCGGGGA 1320
GACCCGAGCC TGTTGCGGAT CGACGCGGCC GCCTTCCACG CGGCGCAGCG CGACCGCGCC 1380
```

10

20

30

40

GCCCCGGCTGC CCGAGTCGAT GACGACGCTG ACCACCCACG ACACCAAGCG CAGCGAAGAC 1440
ACCCGGGGCGC GGATCACC GC GCTCGCCGAG GCCCCCGAAC GCTGGCGGGC GTTCCTGACC 1500
GAGGTCGGCG GGCTCATCGG AACGGGCGAC CGGGTGCTGG AGAACCTGAT CTGGCAGGCG 1560
ATCGTCGGCG CGTGGCCGGC GAGCCGGGAG CGGCTCGAGG CCTACGCGCT GAAGGCCGCG 1620
CGCGAAGCCG GCGAGTCGAC CGACTGGATC GACGGCGACC CCGCGTTTCA AGAGCGGCTG 1680
ACCCGCCTGG TCACGGTCGC CGTCGAGGAG CCGCTCGTGC ACGAGCTGCT CGAGCGGCTC 1740
GTCGACGAGC TGACGGCGGC CGGGTACTCC AACGGCCTCG CGGCGAAGCT GCTGCAGCTG 1800
CTCGCCCCCG GAACCCCCGA CGTGTACCAG GGCACGGAAC GCTGGGACCG GTCGCTGGTG 1860
GACCCGGACA ACCGTCGCCC CGTGGATTTC GCCGCGGCAT CCGAGCTGCT CGACCGCCTC 1920
GACGGCGGCT GCGGGCCGCC CGTCGACGAG ACCGGCGCGG TCAAGACGCT CGTCGTCTCC 1980
CGCGCGCTGC GGCTGCGCCG CGACCGGCCC GAGCTGTTCA CCGCGTACCA CCCGGTCACG 2040
GCGCGCGGCG CGCAGGCCGA GCACCTGATC GGCTTCGACC GCGGCGGCGC GATCGCCCTG 2100
GCCACCCGCC TGCCGCTCGG CCTCGCCGCC GCAGGCGGCT GGGGCGACAC GGTGCTCGAC 2160
GTCGGCGAGC GGAGCCTGCG CGACGAGCTG ACCGGCCGCG AGGCCCGCGG AGCGGCGCGC 2220
GTGGCCGAGT TGTTGCGCGA CTACCCCGTC GCCCTGCTGG TGGAGACA 2268

10

20

【 0 1 8 4 】

配列番号 : 8

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

30

配列

TTTTTTAATA AAATCAGGAG GAAAAAAT

28

【 0 1 8 5 】

配列番号 : 9

配列の長さ : 575

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ポリペプチド

配列

Met Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr	10
1 5 10 15	
Leu Val Val Gly Gln Gly Arg Ala Glu Leu Pro Leu Thr Arg Asp Glu	
20 25 30	
Asn Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro Asp Leu	
35 40 45	
Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Val Asp Gly Lys Gly Pro Phe Ala Asp Pro	20
50 55 60	
Arg Ser Leu Arg Gln Pro Arg Gly Val His Glu Leu Gly Arg Glu Phe	
65 70 75 80	
Asp Pro Ala Arg Tyr Ala Trp Gly Asp Asp Gly Trp Arg Gly Arg Asp	
85 90 95	
Leu Thr Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Thr Pro	
100 105 110	
Glu Gly Thr Leu Asp Ser Ala Ile Arg Arg Leu Asp His Leu Val Arg	30
115 120 125	
Leu Gly Val Asp Ala Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly	
130 135 140	
Thr His Gly Trp Gly Tyr Asp Gly Val Leu Trp Tyr Ala Val His Glu	
145 150 155 160	
Pro Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Cys His	
165 170 175	40
Ala Arg Gly Leu Ala Val Val Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly	

180	185	190
Pro Ser Gly Asn His Leu Pro Asp Phe Gly Pro Tyr Leu Gly Ser Gly		
195	200	205
Ala Ala Asn Thr Trp Gly Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Pro Leu Ser		
210	215	220
Asp Glu Val Arg Arg Tyr Ile Ile Asp Asn Ala Val Tyr Trp Leu Arg		
225	230	235
Asp Met His Ala Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Arg		
245	250	255
Asp Ala Arg Ala Leu His Leu Leu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Val Asp		
260	265	270
Glu Leu Ala Gly Glu Leu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser		
275	280	285
Asp Leu Asn Asp Pro Lys Leu Ile Arg Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr		
290	295	300
Gly Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp Val His His Ala Val His Ala		
305	310	315
Asn Val Thr Gly Glu Thr Val Gly Tyr Tyr Ala Asp Phe Gly Gly Leu		
325	330	335
Gly Ala Leu Val Lys Val Phe Gln Arg Gly Trp Phe His Asp Gly Thr		
340	345	350
Trp Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Leu Asp Pro Asp		
355	360	365
Ile Pro Phe Arg Arg Leu Val Ala Phe Ala Gln Asp His Asp Gln Val		
370	375	380
Gly Asn Arg Ala Val Gly Asp Arg Met Ser Ala Gln Val Gly Glu Gly		
385	390	395
Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Thr Pro		
405	410	415

10

20

30

40

Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Trp Gly Ala Arg Thr Pro Trp Gln Phe
420 425 430
Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Glu Ala Thr Ala Arg Gly
435 440 445
Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro
450 455 460
Asp Pro Gln Asp Pro Ala Thr Phe Ala Arg Ser His Leu Asp Trp Ser
465 470 475 480
Glu Pro Glu Arg Glu Pro His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Thr Asp
485 490 495
Leu Ile Ala Leu Arg Arg Glu Leu Pro Val Asp Ala Pro Ala Arg Glu
500 505 510
Val Asp Ala Asp Glu Ala Arg Gly Val Phe Ala Phe Ser Arg Gly Pro
515 520 525
Leu Arg Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Pro Val Gly Val Pro Glu
530 535 540
His Gly Gly Leu Val Leu Ala Tyr Gly Glu Val Arg Ala Gly Ala Ala
545 550 555 560
Gly Leu His Leu Asp Gly Pro Gly Ala Ala Ile Val Arg Leu Glu
565 570 575

10

20

【 0 1 8 6 】

30

配列番号 : 10

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

40

Trp Gly Tyr Asp Gly Val

1

5

【 0 1 8 7 】

配列番号 : 11

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

10

Asp Val Val Tyr Asn His

1

5

【 0 1 8 8 】

配列番号 : 12

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

20

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

Arg Leu Asp Ala Val His Ala

1

5

【 0 1 8 9 】

30

配列番号 : 13

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

配列

40

Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn

1

5

【 0 1 9 0 】

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

10

Met Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr

1

5

10

15

Leu Val Val Gly

20

【0191】

配列番号：15

配列の長さ：20

20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr Gly Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp

1

5

10

15

30

Val His His Ala

20

【0192】

配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

40

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Asp Glu Asn Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro

1

5

10

15

Asp Leu Val Asp

20

50

【 0 1 9 3 】

配列番号 : 17

配列の長さ : 1725

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

ATGAACCGAC	GATTCCCGGT	CTGGGCGCCC	CAGGCCGCGC	AGGTGACGCT	CGTCGTGGGC	60
CAAGGCCGCG	CCGAACTCCC	GCTGACCCGC	GACGAGAACG	GATGGTGGGC	TCTTCAGCAG	120
CCGTGGGACG	GCGGCCCCGA	CCTCGTCGAC	TACGGCTACC	TCGTCGACGG	CAAGGGCCCC	180
TTCGCCGACC	CGCGGTGCT	GCGGCAGCCG	CGCGGCGTGC	ACGAGCTCGG	CCGCGAATTC	240
GACCCCGCCC	GCTACGCGTG	GGCGACGAC	GGATGGCGCG	GCCGAGACCT	CACCGGAGCC	300
GTGATCTACG	AACTGCACGT	CGGCACCTTC	ACCCCTGAGG	GAACGCTGGA	CAGCGCCATC	360
CGTCGCCTCG	ACCACCTGGT	GCGCCTCGGC	GTGACGCGGG	TCGAGCTGCT	GCCCGTCAAC	420
GCGTTCAACG	GCACCCACGG	CTGGGGCTAC	GACGGGGTGC	TCTGGTACGC	GGTGCACGAG	480
CCCTACGGCG	GCCCGGAGGC	GTACCAGCGC	TTGTCGACG	CCTGCCACGC	CCGCGGCCTC	540
GCCGTGCTGC	AGGACGTGCT	CTACAACCAC	CTGGGCCCCG	GCGGCAACCA	CCTGCCCCGAC	600
TTCGGCCCCCT	ACCTCGGGTC	GGGCGCCGCC	AACACCTGGG	GCGACGCGCT	GAACCTCGAC	660
GGGCCGCTCT	CCGACGAGGT	GCGGCGGTAC	ATCATCGACA	ACGCGGTGTA	CTGGCTGCGC	720
GACATGCACG	CCGACGGGCT	GCGGCTCGAC	GCCGTGCACG	CGCTGCGCGA	CGCCCGCGCG	780
CTGCACCTGC	TCGAAGAGCT	CGCCGCCCGC	GTGACGAGC	TGGCGGGCGA	GCTCGGCCGG	840
CCGCTGACGC	TCATCGCCGA	GAGCGACCTG	AACGACCCGA	AGCTGATCCG	CTCCCGCGCG	900
GCGCACGGCT	ACGGCCTCGA	CGCCAGTGG	GACGACGACG	TGCACCACGC	GGTGCACGCC	960
AACGTGACCG	GCGAGACCGT	CGGCTACTAC	GCCGACTTCG	GCGGGCTCGG	CGCCCTCGTC	1020
AAGGTGTTCC	AGCGCGGCTG	GTTCCACGAC	GGCACCTGGT	CGAGCTTCCG	CGAGCGGCAC	1080
CACGGCCGGC	CGCTCGACCC	CGACATCCCG	TTCCGCCGGC	TCGTCGCCTT	CGCGCAGGAT	1140
CACGACCAGG	TCGGCAACCG	AGCGGTGCGC	GACCGCATGT	CGGCGCAGGT	CGGCGAGGGT	1200
TCGCTCGCCG	CCGCGGCGGC	GCTCGTGCTG	CTCGGCCCGT	TCACCCCGAT	GCTGTTTCATG	1260
GGCGAGGAGT	GGGGCGCGCG	CACCCCGTGG	CAGTTCTTCA	CCTCCCACCC	CGAGCCCGAG	1320
CTGGGGGAGG	CGACGGCGCG	CGGGCGCATC	GCCGAGTTCG	CCCGCATGGG	CTGGGACCCG	1380

10

20

30

40

GCAGTCGTGC CCGACCCGCA GGACCCGGCC ACCTTCGCCC GCTCGCACCT GGACTGGTCC 1440
GAGCCCGAGC GGGAAACGCA CGCGGGCCTG CTCGCCCTTCT ACACCGACCT GATCGCGCTG 1500
CGGCGCGAGC TGCCGGTCGA TCGCCCGGCG CGCGAGGTGG ATGCCGACGA GGC GCGCGGC 1560
GTCTTCGCGT TCAGCCGCGG CCCGCTGCGG GTCACGGTCG CGCTGCGCCC CGGACCGGTC 1620
GGGGTGCCCG AGCACGGGGG CCTCGTGCTC GCCTACGGCG AGGTGCGCGC CGGCGCCGCC 1680
GGACTGCACC TCGACGGGCC GGGAGCCGCG ATCGTGCGCC TCGAG 1725

【 0 1 9 4 】

10

配列番号 : 18

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GCSAACCGST GGTGGTGGGA CGT

23

20

【 0 1 9 5 】

配列番号 : 19

配列の長さ : 3252

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

10

生物名 : アルスロバクター・スピーシーズ

株名 : S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0)

配列の特徴

特徴を表す記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..742

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

20

存在位置 : 743..3013

特徴を決定した方法 : E

配列

ATGCCGACGA CGAACTTGAG CGCGTTCTCG GGCACCCGCG AGAGCGGTCC GCGCACGGCG 60
GCGCCCAGTG CCACGACGAG CACGATCGCG GCGAGCGCCG CGACGACGGC GACCGGCAGG 120
CGCCCCTGAT TGCTGGCGAA GGTGAGCACG ATGAAGACCA CCTCGAGGCC CTCGAGCAAC 180
ACACCTTTGA ACGACACGGT GAACGCGTAC CAATCGGAGA CCCCGAACCG GCTCTCGCGC 240
CGGGCGCTCT CGGCCGCCTC GACCTGACGC CGGAAGGCAG CCTCCTCGTC ACGGAGAGCC 300
CTGCGCCCTG CCGCGCGCAG CACCGCCTTG CGCAGCCAGC CGAGCCCGAA GACGAGCAGC 360
AACCCGCCGA CGACGAGGCG CAGCACGGCC AGCGGCAGCA GCAGGATCGC GGGACCGACG 420
AGCGCGACGG CCGCGGCCAG CACCACCACG GCGACGGCGG CACCTGTCAG CGCCGACCGC 480
CAGCTGCGGG TGGCGCCGAC CGCGACGACG ATCGTGGTCG CCTCCACCGC CTCGACCACG 540
CAGGCGAGGA ACACGGCGGC GAACAGGGCG ACGGCGGTCA TCGGCCAGC AGACGGTTGA 600
CCATCACGGC ACGCTAGCGC CATTGCTCAC AGGAAGGGCC AAGACGCCCG CAACGCGGCA 660
CCCGTGGACG GCGCGTACCG GCGTGTGACC GATCGTGTCA ACCGGTGGCG CCCGCCCCGA 720

30

40

GCACCTGCGT AGATTCGGCC TC GTG CCC GCC AGT ACC TAC CGC CTT CAG ATC	772	
Met Pro Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Gln Ile		
1 5 10		
TCG GCG GAG TTC ACC CTC TTC GAC GCG GCG CGC ATC GTG CCC TAC CTG	820	
Ser Ala Glu Phe Thr Leu Phe Asp Ala Ala Arg Ile Val Pro Tyr Leu		
15 20 25		
CAC CGC CTC GGC GCC GAC TGG CTG TAC CTC TCG CCG CTG CTC GAG TCC	868	10
His Arg Leu Gly Ala Asp Trp Leu Tyr Leu Ser Pro Leu Leu Glu Ser		
30 35 40		
GAG TCG GGC TCC TCG CAC GGC TAC GAC GTG GTC GAC CAC TCC CGC GTC	916	
Glu Ser Gly Ser Ser His Gly Tyr Asp Val Val Asp His Ser Arg Val		
45 50 55		
GAC GCC GCC CGC GGC GGG CCG GAG GGG CTC GCC GAG CTC TCC CGT GCG	964	
Asp Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gly Leu Ala Glu Leu Ser Arg Ala		20
60 65 70		
GCG CAC GAG CGC GGC ATG GGC GTC GTC GTC GAC ATC GTG CCC AAC CAC	1012	
Ala His Glu Arg Gly Met Gly Val Val Val Asp Ile Val Pro Asn His		
75 80 85 90		
GTC GGC GTC GCG ACG CCG AAG GCG AAC CGC TGG TGG TGG GAC GTT CTG	1060	
Val Gly Val Ala Thr Pro Lys Ala Asn Arg Trp Trp Trp Asp Val Leu		
95 100 105		30
GCC CGT GGA CAG CGG TCG GAG TAC GCC GAC TAC TTC GAC ATC GAC TGG	1108	
Ala Arg Gly Gln Arg Ser Glu Tyr Ala Asp Tyr Phe Asp Ile Asp Trp		
110 115 120		
GAG TTC GGC GGC GGC AGG CTG CGC CTG CCC GTG CTC GGC GAC GGC CCC	1156	
Glu Phe Gly Gly Gly Arg Leu Arg Leu Pro Val Leu Gly Asp Gly Pro		
125 130 135		
GAC GAG CTC GAC GCG CTG AGA GTG GAT GGC GAC GAG CTC GTC TAC TAC	1204	40
Asp Glu Leu Asp Ala Leu Arg Val Asp Gly Asp Glu Leu Val Tyr Tyr		

140	145	150		
GAG CAC CGC TTC CCG ATC GCC GAG GGC ACC GGC GGC GGC ACC CCG CGC	1252			
Glu His Arg Phe Pro Ile Ala Glu Gly Thr Gly Gly Gly Thr Pro Arg				
155	160	165	170	
GAG GTG CAC GAC CGG CAG CAC TAC GAG CTG ATG TCG TGG CGG CGG GCC	1300			
Glu Val His Asp Arg Gln His Tyr Glu Leu Met Ser Trp Arg Arg Ala				
175	180	185		10
GAC CAC GAC CTC AAC TAC CGC CGC TTC TTC GCC GTG AAC ACG CTC GCC	1348			
Asp His Asp Leu Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Thr Leu Ala				
190	195	200		
GCC GTA CGC GTC GAA GAC CCG CGC GTG TTC GAC GAC ACC CAC CGC GAG	1396			
Ala Val Arg Val Glu Asp Pro Arg Val Phe Asp Asp Thr His Arg Glu				
205	210	215		
ATC GGC CGC TGG ATC GCC GAG GGC CTC GTC GAC GGC CTG CGC GTC GAC	1444			20
Ile Gly Arg Trp Ile Ala Glu Gly Leu Val Asp Gly Leu Arg Val Asp				
220	225	230		
CAC CCC GAC GGG CTG CGC GCC CCC GGC GAC TAC CTG CGC CGT CTC GCC	1492			
His Pro Asp Gly Leu Arg Ala Pro Gly Asp Tyr Leu Arg Arg Leu Ala				
235	240	245	250	
GAG CTC GCC CAA GGC AGG CCG ATC TGG GTC GAG AAG ATC ATC GAG GGC	1540			
Glu Leu Ala Gln Gly Arg Pro Ile Trp Val Glu Lys Ile Ile Glu Gly				30
255	260	265		
GAC GAG CGG ATG CCC CCG CAG TGG CCC ATC GCC GGC ACC ACC GGC TAC	1588			
Asp Glu Arg Met Pro Pro Gln Trp Pro Ile Ala Gly Thr Thr Gly Tyr				
270	275	280		
GAC GCG CTG GCC GGG ATC GAC CGG GTG CTC GTC GAC CCC GCG GGC GAG	1636			
Asp Ala Leu Ala Gly Ile Asp Arg Val Leu Val Asp Pro Ala Gly Glu				
285	290	295		40
CAT CCG CTC ACC CAG ATC GTC GAC GAG GCG GCA GGC AGC CCC CGG CGC	1684			

His	Pro	Leu	Thr	Gln	Ile	Val	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Pro	Arg	Arg		
300						305					310						
TGG	GCC	GAG	CTG	GTT	CCC	GAG	CGC	AAG	CGG	GCC	GTC	GCC	CGC	GGC	ATC	1732	
Trp	Ala	Glu	Leu	Val	Pro	Glu	Arg	Lys	Arg	Ala	Val	Ala	Arg	Gly	Ile		
315					320					325					330		
CTG	AAC	TCC	GAG	ATC	CGC	CGC	GTC	GCC	CGC	GAA	CTC	GGA	GAG	GTC	GCC	1780	
Leu	Asn	Ser	Glu	Ile	Arg	Arg	Val	Ala	Arg	Glu	Leu	Gly	Glu	Val	Ala		10
				335					340					345			
GGC	GAC	GTC	GAA	GAC	GCG	CTC	GTC	GAG	ATC	GCC	GCC	GCC	CTG	TCC	GTC	1828	
Gly	Asp	Val	Glu	Asp	Ala	Leu	Val	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Val		
			350					355					360				
TAC	CGC	AGC	TAC	CTG	CCG	TTC	GGG	CGC	GAG	CAC	CTC	GAC	GAA	GCC	GTG	1876	
Tyr	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Phe	Gly	Arg	Glu	His	Leu	Asp	Glu	Ala	Val		
		365				370					375						20
GCC	GCC	GCG	CAG	GCC	GCA	GCC	CCC	CAG	CTC	GAG	GCC	GAC	CTC	GCC	GCC	1924	
Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala		
		380				385					390						
GTC	GGC	GCA	GCG	CTC	GCC	GAC	CCG	GGC	AAC	CCC	GCC	GCG	CTC	CGC	TTC	1972	
Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp	Pro	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Leu	Arg	Phe		
395				400					405					410			
CAG	CAG	ACC	AGC	GGC	ATG	ATC	ATG	GCC	AAG	GGC	GTC	GAG	GAC	AAC	GCG	2020	30
Gln	Gln	Thr	Ser	Gly	Met	Ile	Met	Ala	Lys	Gly	Val	Glu	Asp	Asn	Ala		
				415					420					425			
TTC	TAC	CGC	TAC	CCC	CGG	CTC	ACC	TCG	CTG	ACC	GAG	GTC	GGG	GGA	GAC	2068	
Phe	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Arg	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Glu	Val	Gly	Gly	Asp		
			430					435					440				
CCG	AGC	CTG	TTC	GCG	ATC	GAC	GCG	GCC	GCC	TTC	CAC	GCG	GCG	CAG	CGC	2116	
Pro	Ser	Leu	Phe	Ala	Ile	Asp	Ala	Ala	Ala	Phe	His	Ala	Ala	Gln	Arg		40
		445				450							455				

GAC CGC GCC GCC CGG CTG CCC GAG TCG ATG ACG ACG CTG ACC ACC CAC	2164	
Asp Arg Ala Ala Arg Leu Pro Glu Ser Met Thr Thr Leu Thr Thr His		
460 465 470		
GAC ACC AAG CGC AGC GAA GAC ACC CGG GCG CGG ATC ACC GCG CTC GCC	2212	
Asp Thr Lys Arg Ser Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Thr Ala Leu Ala		
475 480 485 490		
GAG GCC CCC GAA CGC TGG CGG CGC TTC CTG ACC GAG GTC GGC GGG CTC	2260	10
Glu Ala Pro Glu Arg Trp Arg Arg Phe Leu Thr Glu Val Gly Gly Leu		
495 500 505		
ATC GGA ACG GGC GAC CGG GTG CTG GAG AAC CTG ATC TGG CAG GCG ATC	2308	
Ile Gly Thr Gly Asp Arg Val Leu Glu Asn Leu Ile Trp Gln Ala Ile		
510 515 520		
GTC GGC GCG TGG CCG GCG AGC CGG GAG CGG CTC GAG GCC TAC GCG CTG	2356	
Val Gly Ala Trp Pro Ala Ser Arg Glu Arg Leu Glu Ala Tyr Ala Leu		20
525 530 535		
AAG GCC GCG CGC GAA GCC GGC GAG TCG ACC GAC TGG ATC GAC GGC GAC	2404	
Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Glu Ser Thr Asp Trp Ile Asp Gly Asp		
540 545 550		
CCC GCG TTC GAA GAG CGG CTG ACC CGC CTG GTC ACG GTC GCC GTC GAG	2452	
Pro Ala Phe Glu Glu Arg Leu Thr Arg Leu Val Thr Val Ala Val Glu		
555 560 565 570		30
GAG CCG CTC GTG CAC GAG CTG CTC GAG CGG CTC GTC GAC GAG CTG ACG	2500	
Glu Pro Leu Val His Glu Leu Leu Glu Arg Leu Val Asp Glu Leu Thr		
575 580 585		
GCG GCC GGG TAC TCC AAC GGC CTC GCG GCG AAG CTG CTG CAG CTG CTC	2548	
Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly Leu Ala Ala Lys Leu Leu Gln Leu Leu		
590 595 600		
GCC CCC GGA ACC CCC GAC GTG TAC CAG GGC ACG GAA CGC TGG GAC CGG	2596	40
Ala Pro Gly Thr Pro Asp Val Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Trp Asp Arg		

605	610	615	
TCG CTG GTG GAC CCG GAC AAC CGT CGC CCC GTG GAT TTC GCC GCG GCA	2644		
Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Pro Val Asp Phe Ala Ala Ala			
620	625	630	
TCC GAG CTG CTC GAC CGC CTC GAC GGC GGC TGG CGG CCG CCC GTC GAC	2692		
Ser Glu Leu Leu Asp Arg Leu Asp Gly Gly Trp Arg Pro Pro Val Asp			
635	640	645	650
GAG ACC GGC GCG GTC AAG ACG CTC GTC GTC TCC CGC GCG CTG CGG CTG	2740		
Glu Thr Gly Ala Val Lys Thr Leu Val Val Ser Arg Ala Leu Arg Leu			
655	660	665	
CGC CGC GAC CGG CCC GAG CTG TTC ACC GCG TAC CAC CCG GTC ACG GCG	2788		
Arg Arg Asp Arg Pro Glu Leu Phe Thr Ala Tyr His Pro Val Thr Ala			
670	675	680	
CGC GGC GCG CAG GCC GAG CAC CTG ATC GGC TTC GAC CGC GGC GGC GCG	2836		
Arg Gly Ala Gln Ala Glu His Leu Ile Gly Phe Asp Arg Gly Gly Ala			
685	690	695	
ATC GCC CTG GCC ACC CGC CTG CCG CTC GGC CTC GCC GCC GCA GGC GGC	2884		
Ile Ala Leu Ala Thr Arg Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Gly Gly			
700	705	710	
TGG GGC GAC ACG GTC GTC GAC GTC GGC GAG CGG AGC CTG CGC GAC GAG	2932		
Trp Gly Asp Thr Val Val Asp Val Gly Glu Arg Ser Leu Arg Asp Glu			
715	720	725	730
CTG ACC GGC CGC GAG GCC CGC GGA GCG GCG CGC GTG GCC GAG TTG TTC	2980		
Leu Thr Gly Arg Glu Ala Arg Gly Ala Ala Arg Val Ala Glu Leu Phe			
735	740	745	
GCC GAC TAC CCC GTC GCC CTG CTG GTG GAG ACA TGAACCGACG ATTCCTGGTC	3033		
Ala Asp Tyr Pro Val Ala Leu Leu Val Glu Thr			
750	755		
TGGGCGCCCC AGGCCGCGCA GGTGACGCTC GTCGTGGGCC AAGGCCGCGC CGAACTCCCG	3093		
CTGACCCGCG ACGAGAACGG ATGGTGGGCT CTTCAGCAGC CGTGGGACGG CGGCCCCGAC	3153		
CTCGTCGACT ACGGCTACCT CGTCGACGGC AAGGGCCCCCT TCGCCGACCC GCGGTCGCTG	3213		
CGGCAGCCGC GCGGCGTGCA CGAGCTCGGC CGCGAATTC	3252		

10

20

30

40

配列番号：20

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATGCCC GCCA GTACCTACCG CCTTCA

26

10

【 0 1 9 7 】

配列番号：21

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCATGTCTCC ACCAGCAGGG CGACG

25

20

【 0 1 9 8 】

配列番号：22

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AATTC TTTTT TAATAAAATC AGGAGGAATC TAGATGTTA CTAGTCTGCA

50

30

【 0 1 9 9 】

配列番号：23

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GACTAGTAAA CATCTAGATT CCTCCTGATT TTATTAAAAA AG

42

40

【 0 2 0 0 】

配列番号：24

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAATCTAGAT GCCCGCCAGT ACCTACCGCC TTC

33

10

【 0 2 0 1 】

配列番号：25

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAAAC TAGTT TATCATGTCT CCACCAGCAG GGC

33

20

【 0 2 0 2 】

配列番号：26

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATCGGTGATG TCGGCGATAT AG

22

30

【 0 2 0 3 】

配列番号：27

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GTACTGGCGG GCATATTTTT TCCTCCTGA

29

40

【 0 2 0 4 】

配列番号：28

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AATCAGGAGG AAAAAATATG CCCGCCAGTA C

31

10

【 0 2 0 5 】

配列番号：29

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCGACGATCT GGGTGAGCGG AT

22

20

【 0 2 0 6 】

配列番号：30

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCGACGAGCA CCCGGTCGAT CC

22

30

【 0 2 0 7 】

配列番号：31

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CARTGGGAYG AYGAYGTNCA YCAYGC

26

40

【 0 2 0 8 】

配列番号 : 32

配列の長さ : 2218

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

10

生物名 : アルスロバクター・スピーシーズ

株名 : S 3 4 (F E R M B P - 6 4 5 0)

配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 477..2201

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : 3S' UTR

20

存在位置 : 2202..2218

特徴を決定した方法 : E

配列

CTGCAGCTGC TCGCCCCGG AACCCCCGAC GTGTACCAGG GCACGGAACG CTGGGACCGG 60
 TCGCTGGTGG ACCCGGACAA CCGTCGCCCC GTGGATTTCG CCGCGGCATC CGAGCTGCTC 120
 GACCGCCTCG ACGGCGGCTG GCGGCCGCCG GTCGACGAGA CCGGCGCGGT CAAGACGCTC 180
 GTCGTCTCCC GCGCGCTGCG GCTGCGCCGC GACCGGCCCG AGCTGTTTAC CGCGTACCAC 240
 CCGGTCACGG CGCGCGGCGC GCAGGCCGAG CACCTGATCG GCTTCGACCG CGGCGGCGCG 300
 ATCGCCCTGG CCACCCGCTT GCCGCTCGGC CTCGCCGCCG CAGGCGGCTG GGGCGACACG 360
 GTCGTCGACG TCGGCGAGCG GAGCCTGCGC GACGAGCTGA CCGGCCGCGA GGCCCGCGGA 420
 GCGGCGCGCG TGGCCGAGTT GTTCGCCGAC TACCCCGTCG CCCTGCTGGT GGAGAC ATG 479

30

Met

1

AAC CGA CGA TTC CCG GTC TGG GCG CCC CAG GCC GCG CAG GTG ACG CTC 527

40

Asn Arg Arg Phe Pro Val Trp Ala Pro Gln Ala Ala Gln Val Thr Leu

5	10	15		
GTC GTG GGC CAA GGC CGC GCC GAA CTC CCG CTG ACC CGC GAC GAG AAC	575			
Val Val Gly Gln Gly Arg Ala Glu Leu Pro Leu Thr Arg Asp Glu Asn				
20	25	30		
GGA TGG TGG GCT CTT CAG CAG CCG TGG GAC GGC GGC CCC GAC CTC GTC	623			
Gly Trp Trp Ala Leu Gln Gln Pro Trp Asp Gly Gly Pro Asp Leu Val				
35	40	45		10
GAC TAC GGC TAC CTC GTC GAC GGC AAG GGC CCC TTC GCC GAC CCG CGG	671			
Asp Tyr Gly Tyr Leu Val Asp Gly Lys Gly Pro Phe Ala Asp Pro Arg				
50	55	60	65	
TCG CTG CGG CAG CCG CGC GGC GTG CAC GAG CTC GGC CGC GAA TTC GAC	719			
Ser Leu Arg Gln Pro Arg Gly Val His Glu Leu Gly Arg Glu Phe Asp				
70	75	80		20
CCC GCC CGC TAC GCG TGG GGC GAC GAC GGA TGG CGC GGC CGA GAC CTC	767			
Pro Ala Arg Tyr Ala Trp Gly Asp Asp Gly Trp Arg Gly Arg Asp Leu				
85	90	95		
ACC GGA GCC GTG ATC TAC GAA CTG CAC GTC GGC ACC TTC ACC CCT GAG	815			
Thr Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Thr Pro Glu				
100	105	110		
GGA ACG CTG GAC AGC GCC ATC CGT CGC CTC GAC CAC CTG GTG CGC CTC	863			30
Gly Thr Leu Asp Ser Ala Ile Arg Arg Leu Asp His Leu Val Arg Leu				
115	120	125		
GGC GTC GAC GCG GTC GAG CTG CTG CCC GTC AAC GCG TTC AAC GGC ACC	911			
Gly Val Asp Ala Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr				
130	135	140	145	
CAC GGC TGG GGC TAC GAC GGG GTG CTC TGG TAC GCG GTG CAC GAG CCC	959			
His Gly Trp Gly Tyr Asp Gly Val Leu Trp Tyr Ala Val His Glu Pro				
150	155	160		40
TAC GGC GGC CCG GAG GCG TAC CAG CGC TTC GTC GAC GCC TGC CAC GCC	1007			

Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Cys His Ala		
165	170	175
CGC GGC CTC GCC GTC GTG CAG GAC GTC GTC TAC AAC CAC CTG GGC CCG	1055	
Arg Gly Leu Ala Val Val Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro		
180	185	190
AGC GGC AAC CAC CTG CCC GAC TTC GGC CCC TAC CTC GGG TCG GGC GCC	1103	
Ser Gly Asn His Leu Pro Asp Phe Gly Pro Tyr Leu Gly Ser Gly Ala		10
195	200	205
GCC AAC ACC TGG GGC GAC GCG CTG AAC CTC GAC GGG CCG CTC TCC GAC	1151	
Ala Asn Thr Trp Gly Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Pro Leu Ser Asp		
210	215	220
GAG GTG CGG CGG TAC ATC ATC GAC AAC GCG GTG TAC TGG CTG CGC GAC	1199	
Glu Val Arg Arg Tyr Ile Ile Asp Asn Ala Val Tyr Trp Leu Arg Asp		
230	235	240
ATG CAC GCC GAC GGG CTG CGG CTC GAC GCC GTG CAC GCG CTG CGC GAC	1247	
Met His Ala Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Arg Asp		
245	250	255
GCC CGC GCG CTG CAC CTG CTC GAA GAG CTC GCC GCC CGC GTC GAC GAG	1295	
Ala Arg Ala Leu His Leu Leu Glu Glu Leu Ala Ala Arg Val Asp Glu		
260	265	270
CTG GCG GGC GAG CTC GGC CGG CCG CTG ACG CTC ATC GCC GAG AGC GAC	1343	30
Leu Ala Gly Glu Leu Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp		
275	280	285
CTG AAC GAC CCG AAG CTG ATC CGC TCC CGC GCG GCG CAC GGC TAC GGC	1391	
Leu Asn Asp Pro Lys Leu Ile Arg Ser Arg Ala Ala His Gly Tyr Gly		
290	295	300
CTC GAC GCC CAG TGG GAC GAC GAC GTG CAC CAC GCG GTG CAC GCC AAC	1439	
Leu Asp Ala Gln Trp Asp Asp Asp Val His His Ala Val His Ala Asn		40
310	315	320

GTG ACC GGC GAG ACC GTC GGC TAC TAC GCC GAC TTC GGC GGG CTC GGC	1487	
Val Thr Gly Glu Thr Val Gly Tyr Tyr Ala Asp Phe Gly Gly Leu Gly		
325 330 335		
GCC CTC GTC AAG GTG TTC CAG CGC GGC TGG TTC CAC GAC GGC ACC TGG	1535	
Ala Leu Val Lys Val Phe Gln Arg Gly Trp Phe His Asp Gly Thr Trp		
340 345 350		
TCG AGC TTC CGC GAG CGG CAC CAC GGC CGG CCG CTC GAC CCC GAC ATC	1583	10
Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Leu Asp Pro Asp Ile		
355 360 365		
CCG TTC CGC CGG CTC GTC GCC TTC GCG CAG GAT CAC GAC CAG GTC GGC	1631	
Pro Phe Arg Arg Leu Val Ala Phe Ala Gln Asp His Asp Gln Val Gly		
370 375 380 385		
AAC CGA GCG GTC GGC GAC CGC ATG TCG GCG CAG GTC GGC GAG GGT TCG	1679	
Asn Arg Ala Val Gly Asp Arg Met Ser Ala Gln Val Gly Glu Gly Ser		20
390 395 400		
CTC GCC GCC GCG GCG GCG CTC GTG CTG CTC GGC CCG TTC ACC CCG ATG	1727	
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Pro Phe Thr Pro Met		
405 410 415		
CTG TTC ATG GGC GAG GAG TGG GGC GCG CGC ACC CCG TGG CAG TTC TTC	1775	
Leu Phe Met Gly Glu Glu Trp Gly Ala Arg Thr Pro Trp Gln Phe Phe		
420 425 430		30
ACC TCC CAC CCC GAG CCC GAG CTG GGG GAG GCG ACG GCG CGC GGG CGC	1823	
Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Glu Ala Thr Ala Arg Gly Arg		
435 440 445		
ATC GCC GAG TTC GCC CGC ATG GGC TGG GAC CCG GCA GTC GTG CCC GAC	1871	
Ile Ala Glu Phe Ala Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp		
450 455 460 465		
CCG CAG GAC CCG GCC ACC TTC GCC CGC TCG CAC CTG GAC TGG TCC GAG	1919	40
Pro Asp Asp Pro Ala Thr Phe Ala Arg Ser His Leu Asp Trp Ser Glu		

470	475	480		
CCC GAG CGG GAA CCG CAC GCG GGC CTG CTC GCC TTC TAC ACC GAC CTG	1967			
Pro Glu Arg Glu Pro His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Thr Asp Leu				
485	490	495		
ATC GCG CTG CGG CGC GAG CTG CCG GTC GAT GCG CCG GCG CGC GAG GTG	2015			
Ile Ala Leu Arg Arg Glu Leu Pro Val Asp Ala Pro Ala Arg Glu Val				
500	505	510		10
GAT GCC GAC GAG GCG CGC GGC GTC TTC GCG TTC AGC CGC GGC CCG CTG	2063			
Asp Ala Asp Glu Ala Arg Gly Val Phe Ala Phe Ser Arg Gly Pro Leu				
515	520	525		
CGG GTC ACG GTC GCG CTG CGC CCC GGA CCG GTC GGG GTG CCC GAG CAC	2111			
Arg Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Pro Val Gly Val Pro Glu His				
530	535	540	545	
GGG GGC CTC GTG CTC GCC TAC GGC GAG GTG CGC GCC GGC GCC GCC GGA	2159			20
Gly Gly Leu Val Leu Ala Tyr Gly Glu Val Arg Ala Gly Ala Ala Gly				
550	555	560		
CTG CAC CTC GAC GGG CCG GGA GCC GCG ATC GTG CGC CTC GAG	2201			
Leu His Leu Asp Gly Pro Gly Ala Ala Ile Val Arg Leu Glu				
565	570	575		
TGACGCGGCT GGGTACC	2218			
【 0 2 0 9 】				30
配列番号 : 33				
配列の長さ : 25				
配列の型 : 核酸				
鎖の数 : 一本鎖				
トポロジー : 直鎖状				
配列				
ATGAACCGAC GATTCCCGGT CTGGG	25			40
【 0 2 1 0 】				

配列番号：34

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCACTCGAGG CGCACGATCG CGGCT

25

10

【 0 2 1 1 】

配列番号：35

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAATCTAGAT GAACCGACGA TTCCCGGTCT GGGCGC

36

20

【 0 2 1 2 】

配列番号：36

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAAAC TAGTT TATCACTCGA GGCGCACGAT CGCGGC

36

30

【 0 2 1 3 】

配列番号：37

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATCGTCGGTT CATATTTTTT CCTCCTGA

28

40

【 0 2 1 4 】

配列番号：38

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AATCAGGAGG AAAAAATATG AACCGACG

28

10

【 0 2 1 5 】

配列番号：39

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGGTGGTTGT AGACGACGTC CT

22

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来の非還元性糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来の非還元性糖質生成酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来の非還元性糖質生成酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

30

【図4】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来の非還元性糖質生成酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図5】本発明による組換えDNA『pGY1』の制限酵素地図である。図中太線はアルスロバクター・スピーシーズS34由来の塩基配列を示す。太線の領域内の黒色矢印は本発明の非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列を、斜線矢印は本発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列をそれぞれ示す。

【図6】本発明による組換えDNA『pGY2』の制限酵素地図である。図中太線はアルスロバクター・スピーシーズS34由来の塩基配列を示す。太線の領域内の黒色矢印は本発明の非還元性糖質生成酵素をコードする塩基配列を示す。

40

【図7】本発明による組換えDNA『pGY3』の制限酵素地図である。図中黒色矢印は、本発明の非還元性糖質生成酵素をコードするアルスロバクター・スピーシーズS34由来の塩基配列を示す。

【図8】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図9】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来のトレハロース遊離酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図10】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来のトレハロース遊離酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図11】本発明のアルスロバクター・スピーシーズS34由来のトレハロース遊離酵素

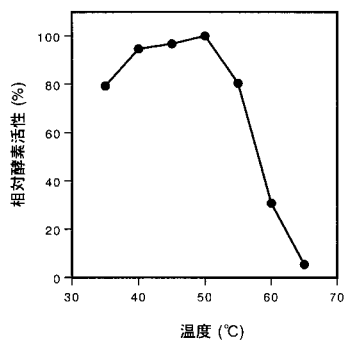
50

の安定性に及ぼす pH の影響を示す図である。

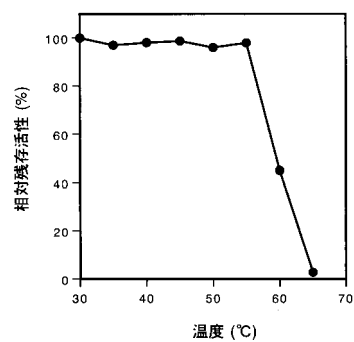
【図 1 2】本発明による組換え DNA 『p G Z 2』の制限酵素地図である。図中太線はアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。太線の領域内の斜線矢印は本発明のトレハロース遊離酵素をコードする塩基配列を示す。

【図 1 3】本発明による組換え DNA 『p G Z 3』の制限酵素地図である。図中斜線矢印は、本発明のトレハロース遊離酵素をコードするアルスロバクター・スピーシーズ S 3 4 由来の塩基配列を示す。

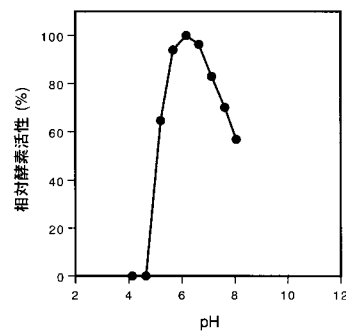
【図 1】



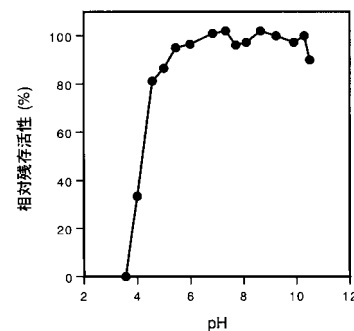
【図 3】



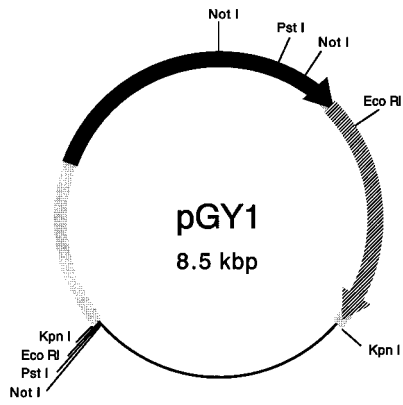
【図 2】



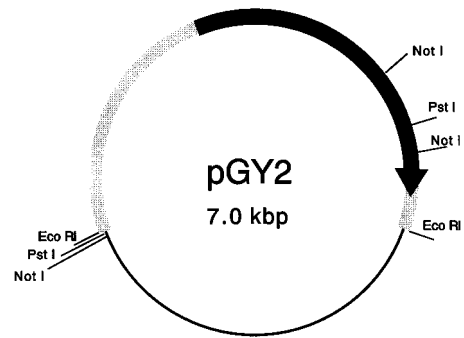
【図 4】



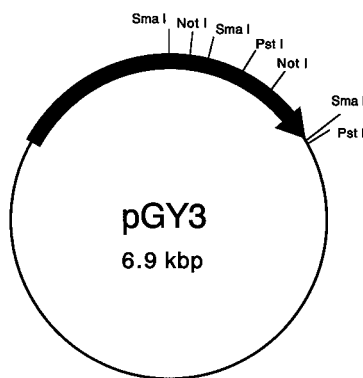
【 図 5 】



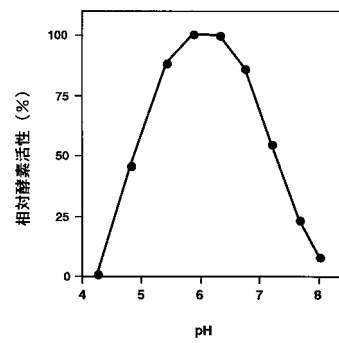
【 図 6 】



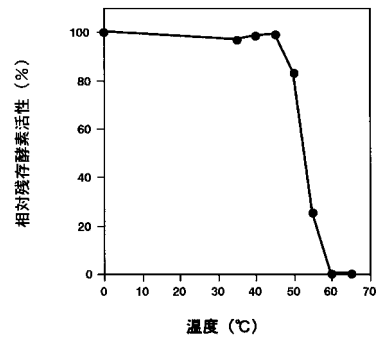
【 図 7 】



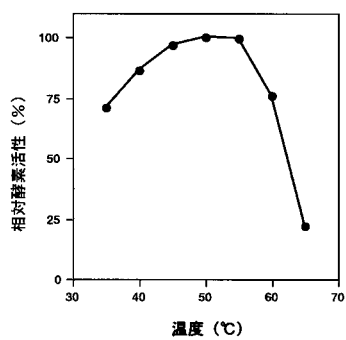
【 図 9 】



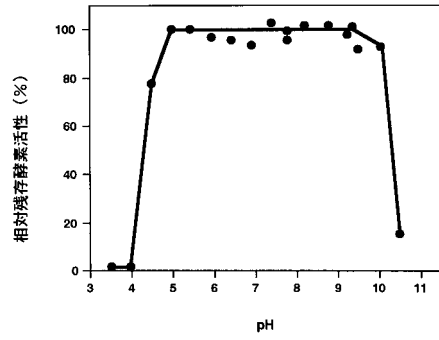
【 図 10 】



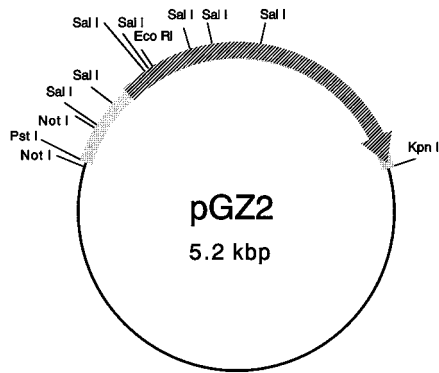
【 図 8 】



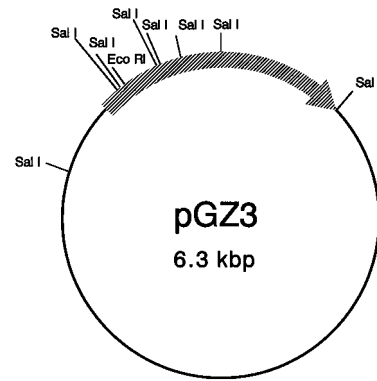
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平07-143876(JP,A)
特開平07-322883(JP,A)
特開平07-322880(JP,A)
特開平08-066188(JP,A)
特開平08-084586(JP,A)
日本農芸化学会誌, 1998 Aug, Vol.72, No.8, p.915-22

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
C12N 9/14-9/46
JSTPlus(JDream2)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq