

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 18 年 5 月 18 日 (2006.5.18)

【公開番号】特開 2001-185 (P2001-185A)

【公開日】平成 13 年 1 月 9 日 (2001.1.9)

【出願番号】特願 平 11-170555

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 N 1/21 (2006.01)**

**C 1 2 N 9/80 (2006.01)**

C 1 2 R 1/05 (2006.01)

C 1 2 R 1/19 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/80 A

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1:05

C 1 2 N 9/80

C 1 2 R 1:19

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 3 月 23 日 (2006.3.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 亜鉛耐性を示す宿主微生物に、亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が強化される D - アミノアシラーゼ産生遺伝子を導入し、亜鉛イオンを含む培地における D - アミノアシラーゼ高生産性形質を獲得させたことを特徴とする形質転換微生物。

【請求項 2】 前記 D - アミノアシラーゼ産生遺伝子が、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有するか、又は配列表の配列番号 1 に示す塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって D - アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものであることを特徴とする請求項 1 に記載の形質転換微生物。

【請求項 3】 前記宿主微生物が大腸菌であることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 のいずれかに記載の形質転換微生物。

【請求項 4】 前記宿主微生物への D - アミノアシラーゼ産生遺伝子の導入に当たり、該遺伝子に対して以下の (1) 及び (2) の改変を行ったことを特徴とする請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれかに記載の形質転換微生物。

(1) リボソーム結合領域に特定塩基配列 (G A A G G A) を設計して、該遺伝子の翻訳開始点上流 9 塩基の位置に導入することにより、翻訳効率の向上を図る改変。

(2) E c o R I 認識部位及び H i n d I I I 認識部位を該遺伝子上流と下流に作成し、該遺伝子を純化して切り出し発現ベクターへ連結することにより遺伝子の発現効率の向上を図る改変。

【請求項 5】 請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれかに記載の形質転換微生物を亜鉛イオンを含む培地で培養し、培養物から D - アミノアシラーゼを取得することを特徴とする D - アミノアシラーゼの製造方法。

【請求項 6】 前記培地に含まれる亜鉛イオン濃度を 0 . 1 ~ 1 0 m M に制御することを特徴とする請求項 5 に記載の D - アミノアシラーゼの製造方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 4】

( 第 4 発明の構成 )

上記課題を解決するための本願第 4 発明 ( 請求項 4 に記載の発明 ) の構成は、前記第 1 発明 ~ 第 3 発明のいずれかにおいて、宿主微生物への D - アミノアシラーゼ産生遺伝子の導入に当たり、該遺伝子に対して以下 ( 1 ) 及び ( 2 ) の改変を行った、形質転換微生物である。

( 1 ) リボソーム結合領域に特定塩基配列 ( G A A G G A ) を設計して、該遺伝子の翻訳開始点上流 9 塩基の位置に導入することにより、翻訳効率の向上を図る改変。

( 2 ) E c o R I 認識部位及び H i n d I I I 認識部位を該遺伝子上流と下流に作成し、該遺伝子を純化して切り出し発現ベクターへ連結することにより遺伝子の発現効率の向上を図る改変。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 8】

( 遺伝子の改変 )

上記の 5 . 8 K b の挿入断片を持つプラスミドから、BamHI-HindIII消化により 4 K b の D N A 断片を切り出し、公知のプラスミド pUC118 と連結することにより連結プラスミド pAND118 を作製し、これを鋳型として、リボソーム結合領域に特定塩基配列 ( G A A G G A ) を設計して該遺伝子の翻訳開始点上流 9 塩基の位置に導入するためのプライマーを用いた部分特異的変異により、リボソームバインディングサイト ( R B S ) を改変したプラスミド pANS D1 を作製した。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 9】

次に、上記プラスミド pANS D1 を鋳型とし、プライマーを用いた部分特異的変異により、上記 R B S の直上流には EcoRI の認識部位を、又、O R F の直下流には HindIII 認識部位を、それぞれ作成してなるプラスミド pANS D1 H E を得た。