

【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 III認識部位を該遺伝子の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 mM 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】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

(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) EcoRI認識部位及びHindIII認識部位を該遺伝子の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】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

(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DNA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(RBS)を改変したプラスミド pANSD1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】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

次に、上記プラスミド pANSD1 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RBSの直上流には EcoRIの認識部位を、又、ORF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 pANSD1HEを得た。