

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-72134

(P2009-72134A)

(43) 公開日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 36 O L (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-244997 (P2007-244997)
 (22) 出願日 平成19年9月21日 (2007.9.21)

(71) 出願人 592029256
 福井県
 福井県福井市大手3丁目17番1号
 (71) 出願人 000002071
 チッソ株式会社
 大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100126354
 弁理士 藤田 尚
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリアミノ酸合成酵素とそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 ポリアミノ酸を効率よく製造する方法を提供すること。

【解決手段】 本発明は、リボソーム非依存的ペプチド合成酵素(NRPS)様式でアミノ酸の重合を触媒する酵素およびそれをコードする遺伝子を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

20

【請求項 3】

前記ポリアミノ酸合成酵素が、ポリリジン合成酵素である、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

DNA または RNA である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

30

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(i v) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

40

(v i) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(i i) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列、のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

50

【請求項 7】

DNA または RNA である、請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含む、ポリアミノ酸合成酵素。

【請求項 9】

ポリリジン合成酵素である、請求項 8 に記載のポリアミノ酸合成酵素。

10

【請求項 10】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含む縮合反応触媒ドメイン。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の縮合反応触媒ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素。

20

【請求項 12】

ポリリジン合成酵素である、請求項 11 に記載のポリアミノ酸合成酵素。

【請求項 13】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(iii) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

30

(iv) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(vi) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、のいずれかを含む、組換えベクター。

【請求項 14】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

40

(ii) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、

のいずれかを含む、組換えベクター。

【請求項 15】

前記ポリアミノ酸合成酵素が、ポリリジン合成酵素である、請求項 13 または 14 に記載の組換えベクター。

【請求項 16】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(ii) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列か

50

らなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(i v) 配列番号 12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号 12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(v i) 配列番号 12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

のいずれかを含有する、組換えベクター。

【請求項17】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(i i) 配列番号 12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列、のいずれかを含有する、組換えベクター。

【請求項18】

請求項13、15、または16に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項19】

請求項14または17に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項20】

請求項13、15、もしくは16のいずれかに記載の組換えベクターまたは請求項18に記載の形質転換体を用いる、ポリアミノ酸合成酵素の製造方法。

【請求項21】

請求項14もしくは17に記載の組換えベクターまたは請求項19に記載の形質転換体を用いる、ポリアミノ酸合成酵素の製造方法。

【請求項22】

(i) 配列番号2のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含有するポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法。

【請求項23】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含有するポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法。

【請求項24】

前記ポリアミノ酸が、ポリリジンである、請求項22または23に記載の方法。

【請求項25】

前記ポリリジンが、 - ポリ - L - リジンである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

10

20

30

40

50

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 65 % 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

【請求項 27】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と 65 % 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

【請求項 28】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

【請求項 29】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

【請求項 30】

(i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

【請求項 31】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含むポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する、抗体。

【請求項 3 3】

(i) 配列番号 1 3、1 5、1 7、もしくは 1 9 のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 1 3、1 5、1 7、もしくは 1 9 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、
10

(i i i) 配列番号 1 3、1 5、1 7、もしくは 1 9 のアミノ酸配列と 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含む縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する、抗体。

【請求項 3 4】

請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれかに記載のプライマーを使用する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするポリヌクレオチドのスクリーニング方法。

【請求項 3 5】

さらに請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれかに記載のプロープを使用する、請求項 3 4 に記載のスクリーニング方法。
20

【請求項 3 6】

請求項 3 2 または 3 3 に記載の抗体を使用する、ポリアミノ酸合成酵素のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規ポリアミノ酸合成酵素とそれをコードする遺伝子に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ポリアミノ酸を合成する方法としては、従来から化学合成によるもの、酵素的に合成するもの等が知られている。
30

【0 0 0 3】

近年、社会的貢献度の高い様々な生理活性ペプチドが見出されている。これらペプチドの合成法として化学合成法と酵素合成法がある。後者では有害な薬品を使用せず製造でき、環境負荷などの問題点も克服可能で、低コスト化も期待できる。

【0 0 0 4】

酵素的にポリアミノ酸を合成する方法の 1 つとして、アスパラギン酸骨格とアルギニン側鎖からなる非タンパク質アミノ酸ポリマーであるシアノフィシン (multi-L-arginyl-poly (L-aspartic acid)) を酵素的に合成する方法が知られている (非特許文献 1、非特許文献 2)。また、ポリ - - グルタミン酸を酵素的に合成する方法も報告されている (非特許文献 3)。
40

【0 0 0 5】

しかし、これらポリアミノ酸の酵素合成は複合酵素系の触媒作用によって達成されるため、制御が難しく、工業生産への応用はなされていない。また、シアノフィシン、ポリ - - グルタミン酸の酵素合成を除くと、ジペプチド以上の鎖長の長いオリゴペプチドまたはアミノ酸ホモポリマーを酵素的に合成できた例は無い。

【0 0 0 6】

さらに、抗菌性ポリアミノ酸 - ポリ - L - リジンの生合成については、微生物発酵法によるものが報告されている (非特許文献 4)。
50

【非特許文献1】Eur. J. Biochem. 267, 5561 - 5570 (2000)

【非特許文献2】APPL. ENVIRON. MICROBIOL. Vol. 67, No. 5, May 2001, p. 2176 - 2182

【非特許文献3】APPL. ENVIRON. MICROBIOL. Vol. 70, No. 7, July 2004, p. 4249 - 4255

【非特許文献4】Agric. Biol. Chem. Vol. 45, 1981, p. 2497 - 2502

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

このような状況下で、より長鎖の任意アミノ酸ペプチドあるいはアミノ酸類縁体ホモポリマーを効率よく製造する方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、このような要求に応えるため鋭意研究を重ねた結果、L-リジンの重合を触媒するリボソーム非依存的ペプチド合成酵素(NRPS)を見出した。

【0009】

したがって、本発明は、以下に示すポリアミノ酸合成酵素、それをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、該ポリアミノ酸合成酵素の製造方法、該ポリアミノ酸合成酵素を使用するポリアミノ酸の製造方法、該ポリヌクレオチドの部分配列を含むプライマー、該ポリヌクレオチドもしくはその相補配列にハイブリダイズし得るプローブ、該酵素に対する抗体、該プライマーもしくはプローブもしくは該抗体を使用するポリアミノ酸合成酵素のスクリーニング方法等を提供する。

20

【0010】

(1)(i)配列番号2のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(ii)配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

30

(iii)配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(iv)配列番号1のヌクレオチド配列、

(v)配列番号1のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(vi)配列番号1のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

(1a)(i)配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

40

(ii)配列番号2のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(iii)配列番号1のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

(2)(i)配列番号2のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

50

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、
のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

(3) 上記ポリアミノ酸合成酵素が、ポリリジン合成酵素である、上記 (1) または (2) に記載のポリヌクレオチド。

(4) DNA または RNA である、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(5) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(i v) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(v i) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

(5 a) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(i i i) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

(6) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(i i) 配列番号 12、14、16、もしくは 18 のヌクレオチド配列、

のいずれかを含む、ポリヌクレオチド。

(7) DNA または RNA である、上記 (5) または (6) に記載のポリヌクレオチド。

(8) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含む、ポリアミノ酸合成酵素。

(8 a) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含む、ポリアミノ酸合成酵素。

(9) ポリリジン合成酵素である、上記 (8) に記載のポリアミノ酸合成酵素。

(10) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列、

10

20

30

40

50

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、
のいずれかを含む縮合反応触媒ドメイン。

(10 a) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、
のいずれかを含む縮合反応触媒ドメイン。

(11) 上記 (10) に記載の縮合反応触媒ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素。

(12) ポリリジン合成酵素である、上記 (11) に記載のポリアミノ酸合成酵素。

(13) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、
のいずれかを含む、組換えベクター。

(13 a) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(i i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、
のいずれかを含む、組換えベクター。

(14) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、
のいずれかを含む、組換えベクター。

(15) 上記ポリアミノ酸合成酵素が、ポリリジン合成酵素である、上記 (13) または (14) に記載の組換えベクター。

(16) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同

10

20

30

40

50

一性を有するアミノ酸配列からなる、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

(iv) 配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列、

(v) 配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(vi) 配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、

のいずれかを含有する、組換えベクター。

(16a) (i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または

(iii) 配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、

のいずれかを含有する、組換えベクター。

(17) (i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または

(ii) 配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列、

のいずれかを含有する、組換えベクター。

(18) 上記(13)、(15)、または(16)に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(19) 上記(14)または(17)に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(20) 上記(13)、(15)、もしくは(16)のいずれかに記載の組換えベクターまたは上記(18)に記載の形質転換体を用いる、ポリアミノ酸合成酵素の製造方法。

(21) 上記(14)もしくは(17)に記載の組換えベクターまたは上記(19)に記載の形質転換体を用いる、ポリアミノ酸合成酵素の製造方法。

(22) (i) 配列番号2のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含有するポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法。

(22a) (i) 配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含有するポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法。

(23) (i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

のいずれかを含有するポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する

10

20

30

40

50

、ポリアミノ酸の製造方法。

(23a)(i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

のいずれかを含むポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法。

(24) 上記ポリアミノ酸が、ポリリジンである、上記(22)または(23)に記載の方法。

(25) 上記ポリリジンが、 α -ポリ-L-リジンである、上記(24)に記載の方法。

(26)(i) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(iii) 配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(iv) 配列番号1のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号1のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(vi) 配列番号1のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

(26a)(i) 配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(iii) 配列番号1のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

(27)(i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(iii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(iv) 配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、

10

20

30

40

50

縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

(27 a) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

10

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(i i i) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

(28) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

20

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマー。

(29) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

30

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

40

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

(29 a) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

50

(i i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列に高ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

(30) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と 65% 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

(30 a) (i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(i i i) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列に高ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 15 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

(31) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(i v) 配列番号 12、14、16、または 18 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハ

10

20

30

40

50

イブリダイズし得る少なくとも15ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブ。

(32)(i)配列番号2のアミノ酸配列、

(ii)配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii)配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含むポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する、抗体。

(33)(i)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、

(ii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

のいずれかを含む縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する、抗体。

(34)上記(26)~(28)のいずれかに記載のプライマーを使用する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするポリヌクレオチドのスクリーニング方法。

(35)さらに上記(29)~(31)のいずれかに記載のプローブを使用する、上記(34)に記載のスクリーニング方法。

(36)上記(32)または(33)に記載の抗体を使用する、ポリアミノ酸合成酵素のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によりポリアミノ酸(例: -ポリ-L-リジン)を酵素的に合成することがきる。酵素的合成法は、微生物発酵法や化学合成法よりも省エネルギーであり、望ましくない副反応も抑えられるため、高純度のポリアミノ酸を製造することが可能であるという利点がある。さらに、シアノフィシン、ポリ- -グルタミン酸を含む微生物により生産されるペプチドやポリアミノ酸の多くは、複合酵素系の触媒作用で生合成されるため、酵素的工業生産は難しいが、本発明のポリアミノ酸合成酵素は、単一のチオテンプレート型リボソーム非依存的ペプチド合成酵素(NRPS)であるため、制御が容易で酵素的工業生産に適している、という利点がある。

【0012】

斯くして、本発明は、従来よりもさらに効率よくポリアミノ酸を製造する方法を提供することができる。さらに、本発明のポリヌクレオチド含有組換えベクターおよび形質転換体を使用することで、様々な有用ポリアミノ酸生合成への応用が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明者らは、 -ポリ-L-リジン生産菌ストレプトミセス・アルブラス(*Streptomyces albulus*)IFO14147株から膜結合型の -ポリ-L-リジン生合成酵素を単離精製し、そのアミノ酸配列(配列番号2)およびそれをコードする遺伝子の塩基配列(配列番号1)を決定した。本発明の -ポリ-L-リジン生合成酵素のアミノ酸配列およびDNA配列を、NCBI配列データベースで同源性検索すると、アミノ酸配列では最も高いもので54.1%同一(77.3%類似)、DNA配列では最も高いもので64.2%同一、局部的(重要ドメイン(470位~795位)の領域)において80%以上同一)のものが存在した。

【0014】

本発明の1つの実施形態では、ポリリジン生合成酵素およびそれをコードする遺伝子が提供される。また、本発明の酵素は、NRPSとしてはこれまでに知られていない唯一の膜酵素である。したがって、本発明のさらなる実施形態では、膜結合型のNRPSが提供される。

10

20

30

40

50

【0015】

これまでに、医薬へも応用可能な生理活性を有する微生物生産ペプチドが多数見出されており、これらペプチドの多くは、非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS, non-ribosomal peptide synthetase）と呼ばれる多モジュール複合酵素の触媒作用により生合成される。

【0016】

NRPSはアミノ酸の活性化を触媒するアデニレーションドメイン（A-Domain）、ペプチジルキャリアドメイン又はチオレーションドメイン（PCP-Domain）と呼ばれるアミノ酸あるいはペプチド中間体分子を結合するドメイン、そして基質の縮合を触媒するコンデンセーションドメイン（C-Domain）、生合成の最終ステップであるペプチドの環状化やNRPSからのペプチドの遊離に關与するチオエステラーゼドメイン（TE-Domain）からなるモジュールを基本単位として構成されている（図1）。チオレーションドメインにはアミノ酸や中間体を結合するための補助因子である4'-ホスホパンテテイン（P-pant）アームが結合している（不図示）。モジュールにはさらにエピメリ化やメチル化などペプチドの修飾に係わるドメインが付加されている場合もある。

【0017】

NRPSの各ドメインにはペプチド合成酵素に共通して保存されている領域が複数あり、例えば、ミクロシスチン生合成遺伝子は、これらの塩基配列情報をもとにPCR増幅により得られた断片をプローブとしてクローニングされている。

【0018】

本発明のポリリジン生合成酵素においても、データベース、例えばCDD（Conserved Domain Database：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml/>）などの類似のドメイン構造をもつタンパク質との構造比較から機能予測する解析ツールを用いて解析すると、多くのNRPS同様にN末端にはA-Domain、ペプチド中間体分子を結合するPCP-Domainの存在が確認された。しかしながら、C末端側約700アミノ酸残基は、従来のいずれのC-DomainやTE-Domainとも全く相同性の無い新規（未知）ドメインであることが明らかとなった。また、従来のNRPSは多モジュール複合酵素であるが、本酵素の構造はドメイン構造解析及び酵素精製の結果から、単一モジュール単一酵素であることが強く示唆された。このように本発明の酵素においては、単一モジュールのみでポリアミノ酸合成が達成されることから、C末端側700アミノ酸残基の新規ドメインは、「繰り返し縮合反応」を触媒すると考えられる。したがって、本発明の1つの実施形態では、上記C末端側の約700アミノ酸残基を含むポリリジン生合成酵素が提供される。

【0019】

さらに、従来のNRPSは何れも細胞質（可溶性画分）に局在するが、本酵素はNRPSとしてはこれまでに知られていない唯一の膜酵素であり、膜結合（膜貫通）領域もC末端新規ドメインに存在すると考えられた。そこで、アミノ酸配列から膜タンパク質などの二次構造の予測を行う解析ツールを用いて、本発明の酵素のC末端新規ドメインを更に詳細に解析した。SOSUI（<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>）によれば、予想されたとおりC末端新規ドメインには6箇所の膜貫通領域と推定される領域が確認され、「繰り返し縮合反応」を触媒すると考えられる新規ドメインは3つのサブドメインIC1、IC2及びIC3-Domainから構成される可能性が示唆された（図1Bおよび図2）。したがって、本発明の別の実施形態では、上記3つのサブドメインのいずれかを含むポリリジン生合成酵素が提供される。

以下、本発明について詳細に説明する。

【0020】

1. 本発明のポリアミノ酸合成酵素およびそれをコードするポリヌクレオチド

本発明は、ポリアミノ酸合成酵素およびそれをコードする遺伝子を提供する。具体的には、本発明は、(i)配列番号2のアミノ酸配列、(ii)配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または(iii)配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有

するアミノ酸配列、のいずれかを含む、ポリアミノ酸合成酵素を提供する。

【0021】

本発明はまた、(i)配列番号2のアミノ酸配列、(ii)配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または(iii)配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかからなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。

【0022】

本発明はまた、(i)配列番号1のヌクレオチド配列、(ii)配列番号1のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または(iii)配列番号1のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、のいずれかを含む、ポリヌクレオチドを提供する。

【0023】

好ましい実施形態において、上記ポリアミノ酸合成酵素は、ポリリジン合成酵素であり、さらに好ましくは、-ポリ-L-リジン合成酵素である。上記ポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであり得、好ましくは、DNAである。

【0024】

また、本明細書中、「本発明のポリアミノ酸合成酵素」という場合、(i)配列番号2のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素のみならず、配列番号2のアミノ酸配列と高い同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素、例えば、(ii)配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素、および(iii)配列番号2のアミノ酸配列と高い(例:約60%以上の)同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素も含むものとする。また、ポリアミノ酸合成酵素の酵素活性は、例えば、川合らの方法(Biochem Biophys Res Commun. 2003 Nov 21;311(3):635-40)などによって測定および/または確認することができる。

【0025】

「配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素」の例としては、配列番号2のアミノ酸配列において、例えば、1~50個、1~40個、1~39個、1~38個、1~37個、1~36個、1~35個、1~34個、1~33個、1~32個、1~31個、1~30個、1~29個、1~28個、1~27個、1~26個、1~25個、1~24個、1~23個、1~22個、1~21個、1~20個、1~19個、1~18個、1~17個、1~16個、1~15個、1~14個、1~13個、1~12個、1~11個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個(1~数個)、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個、1個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加の数は、一般的には小さい程好ましい。

【0026】

「配列番号2のアミノ酸配列と高い同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素」の例としては、配列番号2のアミノ酸配列と約60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素が挙げられる。上

10

20

30

40

50

記同一性の数値は一般的に大きい程好ましい。なお、本明細書中、用語「同一性 (identity)」と「相同性 (homology)」とは区別して用いるものとする。例えば、アミノ酸配列間のホモロジー (相同性) をいう場合、同じ性質を持つアミノ酸 (グルタミン酸とアスパラギン酸など) はひとつのグループとして扱うが、同一性を考える場合は区別される。すなわち、同一性は一致性をさす。

【0027】

本明細書中、ヌクレオチド配列について「ハイブリダイズする」とは、ヌクレオチド配列同士の相補性が高い場合、二本鎖を形成することをいう。通常、二本鎖は、互いの核酸が相補的になるように設計されているが、必要に応じて (例えば、核酸を検出に使用する場合は、その目的上、問題が生じない範囲において)、その核酸中に、1または数個 (例えば、2~3個) のミスマッチを含んでいてもよい。存在してもよいミスマッチの数は、例えば、要求される検出精度、ヌクレオチド配列 (または塩基配列もしくは核酸 (配列) もしくはポリヌクレオチド) の長さに応じて変化し得る。なお、ヌクレオチド配列と、それがハイブリダイズする相手のヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション条件を適宜変更することにより、ミスマッチが存在する場合を排除したり、許容できるミスマッチの数を調整したりすることができることは当業者に周知である。

10

【0028】

ハイブリダイゼーションの方法としては、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法またはサザンハイブリダイゼーション法などを用いることができる (例えば、Molecular Cloning 3rd Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997を参照)。

20

【0029】

本明細書中、「ストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件」とは、低ストリンジेंटな条件、中ストリンジेंटな条件及び高ストリンジेंटな条件のいずれでもよい。「低ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS、50% (w/v) ホルムアミド、32 の条件である。また、「中ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS、50% (w/v) ホルムアミド、42 の条件である。「高ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS、50% (w/v) ホルムアミド、50 の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い同一性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、核酸の濃度、核酸の長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

30

【0030】

なお、ハイブリダイゼーションに市販のキットを用いる場合は、例えば、Alkphos Direct Labelling Reagents (アマシャムファルマシア社製) を用いることができる。この場合は、キットに添付のプロトコルにしたがい、標識したプローブとのインキュベーションを一晩行った後、メンブレンを55 の条件下で0.1% (w/v) SDSを含む1次洗浄バッファーで洗浄後、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドを検出することができる。

40

【0031】

所望のヌクレオチド配列 (例えば、配列番号1のヌクレオチド配列) に「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得るヌクレオチド配列」の例としては、FASTA、BLASTなどの相同性 (または同一性) 検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメーターを用いて計算したときに、該所望のヌクレオチド配列と約60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、9

50

6%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の同一性を有するヌクレオチド配列をあげることができる。

【0032】

なお、アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, 1993)を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いことができる。

10

【0033】

2. 本発明のポリアミノ酸合成酵素のC末端ドメインおよびそれをコードするポリヌクレオチド

従来のNRPSは多モジュール複合酵素の触媒作用でペプチド又はポリアミノ酸を重合するが、本発明のポリアミノ酸合成酵素は、ドメイン構造解析及び酵素精製の結果から、単一モジュール単一酵素であることが強く示唆される (図1AおよびBを参照)。本発明のポリアミノ酸合成酵素においては、単一モジュールのみでポリアミノ酸合成が達成されることから、本発明のC末端側約700アミノ酸残基の新規ドメインは、「繰り返し縮合反応」を触媒すると考えられる。また、CDDなどのタンパク質構造解析ツールを用いて解析した結果、上記C末端ドメインには、3つのサブドメインとそれらの境界に6回の膜貫通領域が存在することが推定された (図1Bを参照)。

20

【0034】

したがって、本発明はまた、別の実施形態において、本発明のポリアミノ酸合成酵素のC末端側約700アミノ酸残基を含有するC末端ドメイン (以下、「縮合反応触媒ドメイン」と呼ぶ。)、および縮合反応触媒ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素、ならびに該ドメインおよび該酵素をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを提供する。なお、本明細書中で単に「縮合反応触媒ドメイン」という場合、ポリアミノ酸合成酵素の縮合反応触媒ドメインを意味するものとする。

30

【0035】

本発明の縮合反応触媒ドメインは、代表的には、図2A-Dおよび図3A-Dに示されるように、配列番号2で表される本発明の -ポリ-L-リジン合成酵素のアミノ酸配列のほぼ611位~1319位に相当するアミノ酸配列 (塩基配列においては1831位~3957位)を含むポリペプチドからなる機能的ドメインであり、そのアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、それぞれ配列番号13および配列番号12で表される。また、このドメインを構成する3つのより小さいドメイン (IC1、IC2及びIC3-Domain)は、代表的には、それぞれ配列番号2で表される本発明の -ポリ-L-リジン合成酵素のアミノ酸配列のほぼ676位~847位、914位~1083位、および1147位~1299位のアミノ酸配列の領域に相当する (塩基配列においては、それぞれ2026位~2541位、2740位~3249位、および3439位~3897位)。これら3つのサブドメインのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号15、17、および19で表され、これらのアミノ酸配列をコードする塩基配列はそれぞれ配列番号14、16、および18で表される。

40

【0036】

本明細書中、「本発明の縮合反応触媒ドメイン」という場合、(i)配列番号13のア

50

ミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインのみならず、配列番号13のアミノ酸配列と高い相同性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメイン、例えば、(ii)配列番号13のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメイン、および(iii)配列番号13のアミノ酸配列と高い(例:約60%以上の)同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインも含むものとする。

【0037】

また、本明細書中、「本発明の(縮合反応触媒ドメインの)サブドメイン」という場合、(i)配列番号15、17、もしくは19のアミノ酸配列からなる(縮合反応触媒ドメインの)サブドメインのみならず、配列番号15、17、もしくは19のアミノ酸配列と高い相同性を有するアミノ酸配列からなる(縮合反応触媒ドメインの)サブドメイン、例えば、(ii)配列番号15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる(縮合反応触媒ドメインの)サブドメイン、および(iii)配列番号15、17、もしくは19のアミノ酸配列と高い(例:約60%以上の)同一性を有するアミノ酸配列からなる(縮合反応触媒ドメインの)サブドメインも含むものとする。

10

【0038】

したがって、本発明はまた、(i)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、(ii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または(iii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含む縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメイン、および該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素を提供する。なお、縮合反応が起きているか否かは、例えば、LC-MS/MSなどで重合物(酵素反応生成物)を検出することによって確認することができる。

20

【0039】

本発明はまた、(i)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、(ii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または(iii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかからなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメイン、または該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

30

【0040】

本発明はまた、(i)配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列、(ii)配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または(iii)配列番号12、14、16、もしくは18のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、のいずれかを含むポリヌクレオチドを提供する。

40

【0041】

「配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素」の例としては、配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において、例えば、1~50個、1~40個、1~39個、1~38個、1~37個、1~36個、1~35個、1~34個、1~33個、1~32個、1~31個、1~30個、1~29個、1~28個、1~27個、1~26個、1~25個、1~24個、1~23個、1~22個、1~21個、1~20個、1~19個、1~18個、1~17個、1~16

50

個、1～15個、1～14個、1～13個、1～12個、1～11個、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個(1～数個)、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、1個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加の数は、一般的には小さい程好ましい。

【0042】

「配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と高い同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素」の例としては、配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と約60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素が挙げられる。上記同一性の数値は一般的に大きい程好ましい。なお、本明細書中、用語「同一性(identity)」と「相同性(homology)」とは区別して用いるものとする。例えば、アミノ酸配列間のホモロジー(相同性)をいう場合、同じ性質を持つアミノ酸(グルタミン酸とアスパラギン酸など)はひとつのグループとして扱うが、同一性を考える場合は区別される。すなわち、同一性は一致性をさす。

10

20

【0043】

「配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得るヌクレオチド配列」の例としては、FASTA、BLASTなどの相同性(または同一性)検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメータを用いて計算したときに、該所望のヌクレオチド配列と約60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の同一性を有するヌクレオチド配列をあげることができる。

30

【0044】

3. 本発明の組換えベクター、形質転換体、およびそれらを用いるポリアミノ酸合成酵素の製造方法

本発明はまた、本発明のポリアミノ酸合成酵素をコードするポリヌクレオチドを挿入物として含有する組換えベクターに関する。具体的には、本発明は、(i)配列番号2のアミノ酸配列、(ii)配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または(iii)配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかからなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列を含有する、組換えベクターを提供する。

40

【0045】

さらに本発明は、(i)配列番号1のヌクレオチド配列、(ii)配列番号1のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、または(iii)配列番号1のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列、のいずれかからなるポリヌクレオチドを含有する、組換えベクターを提供する。

50

【0046】

さらに本発明は、本発明の縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするポリヌクレオチドまたは該縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインを含むポリアミノ酸合成酵素をコードするポリヌクレオチドを挿入物として含有する組換えベクターに関する。具体的には、本発明は、(i)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、(ii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または(iii)配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかからなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするポリヌクレオチドまたは該縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインを含むポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列を含有する、組換えベクターを提供する。

10

【0047】

さらに本発明は、(i)配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列、(ii)配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、または(iii)配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列、のいずれかからなるポリヌクレオチドを含有する、組換えベクターを提供する。

20

【0048】

本発明の好ましい態様において、組換えベクターは、その挿入物を発現させ得る組換え発現ベクターである。そのような組換えベクターは、当該技術分野における公知の任意の方法で作製することができる。

【0049】

本発明において、本発明のポリアミノ酸合成酵素を発現させるために用いるベクターには、無細胞発現系(インビトロ トランスクリプション-トランスレーション)に、および宿主細胞、例えば大腸菌、酵母または動物培養細胞を用いるタンパク質発現系に適するベクターとすることができ、そのようなベクターは市販されているかまたは公知のベクターから容易に作製することができる。例えば、インビトロトランスレーションおよび動物培養細胞における発現に用いるベクターは、ヒトサイトメガロウイルスのimmediate-early エンハンサー/プロモーター領域を組み込み、その下流域にT7のプロモーター配列/マルチクロニング部位を有するpTargetTベクターやSV40エンハンサーとSV40のearlyプロモーターを有するpSIベクター(プロメガ社)、pBK-CMV、CMV-Script、pCMV-TagおよびpBK-RSV(ストラタジーン社)などである。また、大腸菌、酵母などの微生物宿主における発現に適するベクターは、例えば大腸菌系のT7のプロモーターを有するpETシリーズベクター発現システム(例えばpET3a, pET27b(+))やpET28a(+);ノバジェン社)、および酵母系においてはアルコールオキシダーゼのプロモーターを有するピチア発現系ベクターpICシリーズベクター(例えばpPIC9KやPIC3.5K;インビトロゲン社)などである。

30

40

【0050】

また、精製のためのペプチド配列としては、当該技術分野にて用いられているペプチド配列とすることができ、例えば、ヒスチジン残基が4個以上、好ましくは6個以上連続したヒスチジntag配列、モノクローナル抗体への結合能を持つエピトプタグ配列、グルタチオンS-トランスフェラーゼのグルタチオンへの結合ドメインまたはプロテインAをコードする配列などが包含される。これらペプチド配列をコードするDNAを挿入物として含有するベクターは市販されている。例えば、大腸菌、酵母などの微生物宿主に用いるベクターは、大腸菌系のT7のプロモーターを有し、ヒスチジン残基を10個をアミノ末端に融合発現ベクター(例えばpET16b;ノバジェン社)、ヒスチジン残基を6個をアミノ末端に有する発現ベクター(例えばpHB6;ロッシュダイアグノスチ

50

イック社、pTrc-Hisシリーズベクター；インビトロゲン社、pHATベクターシリーズ；クローンテック社）などである。動物培養細胞における発現に用いるベクターは、ヒスチジン残基6個をアミノ末端に融合発現するベクター（例えば、pHM6やpVM6；ロッシュダイアグノスティック社）の使用が可能である。昆虫培養細胞系ではバキュロウイルス系のヒスチジン残基6個をアミノ末端に融合発現するベクター（例えば、pBacPAK-Hisベクター；クローンテック社）。また、グルタチオンS-トランスフェラーゼと融合発現するpGEXシリーズベクター（ファルマシア）、プロテインAを発現するpRIT2またはpEZZ18ベクター（ファルマシア）が使用可能である。

【0051】

本発明のポリアミノ酸合成酵素を製造するためのインビトロトランスレーションは、公知の方法、例えばSpirin, A.S., et.al., Science 242: 1162-1164(1988年)および Patnaik, R. & Swartz, J.M. Biotechniques 24: 862-868(1998年)に記載の方法で実施することができ、市販のインビトロトランスレーションキット（例えば、TNT-インビトロトランスクリプション-トランスレーションキット、プロメガ社製）を用いてもよい。

10

【0052】

本発明または、上述の組換えベクターで形質転換した形質転換体（例えば、宿主細胞（例：微生物（大腸菌、酵母など））および動物培養細胞（昆虫培養細胞、哺乳類培養細胞（例：CHO細胞、COS7細胞）））に関する。

【0053】

本発明はまた、上記本発明の組換えベクターまたは上記本発明の形質転換体を用いるポリアミノ酸合成酵素の製造方法に関する。本発明のポリアミノ酸合成酵素の製造方法は、例えば、本発明の組換え発現ベクターを用いてインビトロトランスクリプション-トランスレーションを実施することからなる。あるいは、上記組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養し、所望のタンパク質を単離することからなる。

20

【0054】

本発明のポリアミノ酸合成酵素の製造方法において、発現させたタンパク質は、宿主細胞の培養後、その培地からまたは菌体の可溶性または不溶性画分から単離することができる。

【0055】

本発明のポリアミノ酸合成酵素の製造方法において、発現させたタンパク質は公知の方法により単離・精製されるが、その精製法としては公知の任意の方法から適宜選択することができる。例えば、本発明のポリアミノ酸合成酵素が上述した精製のためのペプチド配列を包含する場合、これを用いて精製するのが好ましい。具体的には、ヒスチジntag配列にはニッケルキレートアフィニティークロマト法、S-トランストランスフェラーゼのグルタチオンへの結合ドメインにはグルタチオン結合ゲルによるアフィニティークロマト法、プロテインAまたは他のタンパク質の配列の場合には抗体アフィニティークロマト法を用いることができる。

30

【0056】

4. 本発明のポリアミノ酸製造方法

本発明はまた、本発明のポリアミノ酸の製造方法に関する。具体的には、本発明は、

40

(i) 配列番号2のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含むポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法を提供する。

【0057】

本発明はまた、

(i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくと

50

も 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 13、15、17、もしくは 19 のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、
のいずれかを含むポリアミノ酸合成酵素を用いてポリアミノ酸を合成する工程を包含する、ポリアミノ酸の製造方法を提供する。

【0058】

好ましくは、上記ポリアミノ酸は、ポリリジンであり、より好ましくは、 α -ポリ-L-リジンである。

【0059】

本発明のポリアミノ酸の製造方法は、上記ポリアミノ酸合成酵素を利用して、その存在下に、アミノ酸を反応させることにより実施される。ここで、反応させるアミノ酸としては、代表的には、L-リジンを例示できるが、これのみに限定されず、例えば、L-リジンエチルエステル、L-リジンメチルエステル（生成物は共に α -ポリ-L-リジン）等も本発明のアミノ酸合成酵素によるポリアミノ酸合成に使用し得る。また、D-リジン、DL-5-ヒドロキシ-リジン、N-メチル-L-リジン、L-リジン-ヒドロキサム酸、S-(2-アミノエチル)-L-システイン、O-(2-アミノエチル)-L-セリン、DL-トランス-2,6-ジアミノ-4-ヘキサン酸等も本発明のポリアミノ酸の製造方法において使用できる可能性がある。

【0060】

本発明のポリアミノ酸合成方法における上記酵素によるアミノ酸の重合反応は、反応の至適 pH、7~9 付近であるのが好ましい。

【0061】

本発明のポリアミノ酸合成酵素の添加配合量は、特に限定はない。一般に本発明のポリアミノ酸合成酵素の添加配合量は、原料アミノ酸 1 g から数時間（例：2~5 時間）の反応で重合物を得るためには、通常約 1 万単位以上、好ましくは約 2 万~4 万単位の範囲、より好ましくは、約 3 万単位から選択されるのが望ましい。また上記反応の温度は、酵素が作用できる限り特に限定はされず、例えば 15 程度の低温でも反応は進行するが、酵素が効率よく、かつ安定に作用することを前提として、通常約 20~40 程度の温度で行われるのが望ましい。反応時間は用いるアミノ酸の濃度、酵素添加量等に応じて適宜決定できるが、通常 0.5~5 時間程度、長くとも 24 時間以内とするのが適当である。

【0062】

このようにして得られたポリアミノ酸は、典型的には、重合度 3~100 mer、平均分子量 403~21835 である。好ましくは、重合度は 4~50 mer、より好ましくは、4~20 mer であり、平均分子量は、好ましくは、531~6427、より好ましくは、531~2581 である。

【0063】

本発明によって得られるポリアミノ酸は、抗菌剤等として使用することができ、トイレタリー用品、化粧品、飼料添加物、医薬、農薬、食品添加物、電子材料等の様々な用途に使用することができる。

【0064】

5. 本発明のプライマーおよびプローブならびにこれらを用いたスクリーニング方法

本発明のポリヌクレオチド(DNA)の部分断片は、例えば、これをプローブ、または PCR プライマーとして用いることにより、本発明のポリアミノ酸合成酵素またはそれをコードするポリヌクレオチドの相同体をスクリーニングするために使用することができる。

【0065】

したがって、本発明は、

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

10

20

30

40

50

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 6 5 % 以上の同一性を有する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、
のいずれかにおける少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマーも提供する。

10

【 0 0 6 6 】

また、本発明は、

(i) 配列番号 1 3、1 5、1 7、もしくは 1 9 のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i) 配列番号 1 3、1 5、1 7、もしくは 1 9 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

20

(i i i) 配列番号 1 3、1 5、1 7、もしくは 1 9 のアミノ酸配列と 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i v) 配列番号 1 2、1 4、1 6、または 1 8 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 1 2、1 4、1 6、または 1 8 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

30

(v i) 配列番号 1 2、1 4、1 6、または 1 8 のヌクレオチド配列と 6 5 % 以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかにおける少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドからなるプライマーも提供する。

【 0 0 6 7 】

本発明はまた、

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

40

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列と 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

(i v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、ポリアミノ酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(v i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列と 6 5 % 以上の同一性を有する、ポリアミノ

50

酸合成酵素をコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、
 のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも15ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブを提供する。

【0068】

本発明はまた、

(i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(iii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列

(iv) 配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

(v) 配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、または

(vi) 配列番号12、14、16、または18のヌクレオチド配列と65%以上の同一性を有する、縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインをコードするヌクレオチド配列もしくはその相補配列、

のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも15ヌクレオチド長のヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチドプローブを提供する。

【0069】

本発明はまた、上記のプライマーを使用する、ポリアミノ酸合成酵素をコードするポリヌクレオチドのスクリーニング方法を提供する。好ましくは、該スクリーニング方法は、さらに上記のプローブを使用する。

【0070】

本発明のプライマーまたはプローブは、具体的には、例えば検体中の本発明のポリアミノ酸合成酵素の相同体の存在を、上記プライマーおよび/またはプローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションや半定量的なリバーサPCR (Sourvinos, G. et al., *Oncogene*, 18, 4968, (1999)) により解析したり、あるいは検体中の本発明のポリアミノ酸合成酵素をコードする遺伝子の変異の有無や、変異の位置をPCR-SSCP法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 2766, (1989)) 等で検知することに用いることができる。

【0071】

プライマーまたはプローブの大きさは、上記解析または検知が可能な長さであれば特に制限されないが、通常、プライマーとしては約10~100、より好ましくは、約15~80、より好ましくは、約20~60、最も好ましくは、約20~40ヌクレオチド長の長さのものが用いられ、プローブとしては、例えば、約10~1000、約15~1500、好ましくは、約20~1000、より好ましくは、約30~800、より好ましくは、約50~700、さらに好ましくは約100~500、最も好ましくは、約200~500ヌクレオチド長のものが用いられ得る。

【0072】

本発明のプライマーが用いられる増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Saiki et

10

20

30

40

50

al., 1988)、リガーゼ連鎖反応(LCR; Landgren et al., 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991)、核酸配列をベースとする増幅(NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991)、転写をベースとする増幅システム(TAS; Kwok et al., 1989)、鎖置換増幅(SDA; Duck, 1990; Walker et al., 1992)またはQレプリカーゼによる増幅(Lizardi et al., 1988; Lomeli et al., 1989)、プライマー伸長を用いて核酸分子を増幅させるための他の適切な方法等であり得る。増幅の間、増幅産物は、好都合には、標識プライマーを用いるかまたは標識ヌクレオチドを取り込むことによって標識することができる。標識は、同位体(^{32}P 、 ^{35}S など)であってもまたは非同位体(ビオチン、ジゴキシゲニンなど)であってもよい。増幅反応は、20~70回、好都合には、25~45回繰り返す。

10

【0073】

6. 本発明の抗体

本発明はまた、抗原として本発明のポリアミノ酸合成酵素またはその断片を抗原として作製され、かつ該抗原と特異的に結合する抗体、例えばポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体に関する。具体的には、本発明は、

【0074】

(i) 配列番号2のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号2のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかを含むポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する、抗体を提供する。

20

【0075】

本発明はまた、

(i) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列、

(ii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、および/もしくは付加を有するアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号13、15、17、もしくは19のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

のいずれかを含む縮合反応触媒ドメインもしくはそのサブドメインまたは該ドメインを含むポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する、抗体を提供する。

30

【0076】

本発明のポリアミノ酸合成酵素に特異的に結合する抗体は、本発明のポリアミノ酸合成酵素を抗原として用い、当業者に公知の抗体(または抗血清)製造法に従って製造することができる。抗原として、抽出した天然のタンパク質、組換えタンパク質、これらのタンパク質の部分的分解物、または本発明のポリアミノ酸合成酵素のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドを用いることができる。そのような抗原は、例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列の少なくとも5個の連続したアミノ酸配列、好ましくは10~15アミノ酸残基からなるポリペプチドである。本発明の抗体は、常法(例えば、Harlow, E. & Lane, D., in *Antibodies-Laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press., pp53-138 (1988年))に従って作製することができる。

40

【0077】

本発明の抗体は、本発明のポリアミノ酸合成酵素、ならびに該タンパク質と配列同一性のある他のポリアミノ酸合成酵素の検出および検索に使用することができる。本発明のスクリーニング方法によれば、分類上に近種ポリアミノ酸合成酵素を容易に取得することが可能である。

【0078】

上述のスクリーニング方法は、例えば他のポリアミノ酸合成酵素を包含している他の生物もしくはその組織の粗抽出物を試料として、本発明の抗体が結合するタンパク質を検出・検索することからなる。そのような検出手段としては、例えばイムノプロット、イムノ

50

アフィニティークロマトグラフィーを挙げることができる。また、他のポリアミノ酸合成酵素を包含している他の生物もしくはその組織のDNAライブラリーについて、本発明の抗体を用いてエクスペクション クローニング (Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T., Molecular Cloning - a Laboratory Manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp12.3-12.44 (1989年)) を実施して、新規なポリアミノ酸合成酵素をコードするDNAを直接得ることができる。

【0079】

以下では、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例】

【0080】

実施例1 -ポリ-L-リジン生産菌ストレプトミセス・アルブラス (Streptomyces albulus) IF014147株からの -ポリ-L-リジン生合成酵素の精製及び酵素科学的性質検討

【0081】

(1) -ポリ-L-リジン生産株ストレプトミセス・アルブラスIF014147株の培養

本菌の培養はM3G培地 (グルコース5%、酵母エキス0.5%、硫酸アンモニウム1%、K₂HPO₄ 0.08%、KH₂PO₄ 0.136%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、ZnSO₄・7H₂O 0.004%、FeSO₄・7H₂O 0.003% (pH 6.8)) で行なった。30℃で20時間好氣的に培養して得た100mlの前培養液を2Lの培地に加え、3L容ジャーファーマンター (丸菱バイオエンジニアリング社製) を使用して30、500rpm、通気量2.5L/minで好氣的に培養した。菌体の増殖に伴って培養液のpHは徐々に低下したため、-ポリ-L-リジン生産に適したpH4.2に達した時点から10%アンモニア水を添加して培養液pHを4.2に維持した。32時間培養後、培養液から遠心分離により菌体を回収した。収量は湿重量で約240gであった。

【0082】

(2) -ポリ-L-リジン生産株ストレプトミセス・アルブラスIF014147株からの -ポリ-L-リジン生合成酵素の精製

全ての精製工程は4℃、又は氷上で行なった。湿重量75gの菌体を150mlの100mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、20% (w/v) グリセロール、0.2M NaCl、2mM EDTA、5mM DTTからなる緩衝液A (pH8.0) に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。処理液を10,000g、20分間遠心分離して残渣を除き、粗酵素液を調製した。これを160,000gで1h超遠心分離 (ベックマンコルター社製) し、沈殿を細胞膜画分として回収した。得られた細胞膜画分は30mlの100mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、20% (w/v) グリセロール、1.0M NaCl、5mM DTTからなる緩衝液B (pH8.0) に懸濁、超音波処理した後、同様に超遠心分離により回収し、塩洗浄細胞膜画分とした。塩洗浄細胞膜画分を30mlの100mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、30% (w/v) グリセロール、1% (w/v) NP-40 (IGEPAL CA-630、MP-Biomedicals社製)、5mM DTTからなる緩衝液C (pH8.6) に懸濁、同様に超音波処理、超遠心分離し、得られた上清を -ポリ-L-リジン生合成酵素を含むNP-40可溶化細胞膜画分とした。

【0083】

NP-40可溶化細胞膜画分を50mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、30% (w/v) グリセロール、0.4% (w/v) NP-40、2mM DTTからなる緩衝液D (pH8.6) で平衡化したDEAE TOYOPEARL 650Mカラム (2.5x10cm、東ソー社製) に吸着させた。カラムを同緩衝液で洗浄後、NaCl濃度勾配法 (0~0.3M) により酵素を溶出した。活性画分を回収し、0.1M酢酸溶液によりpH8.2に調整後、緩衝液D (pH8.2) で平衡化したAF-Blue TOYOPEARL 650Mカラム (1.5x6.5cm、東ソー社製) に吸着させた。カラムを同緩衝液で洗浄後、NaCl濃度勾配法 (0~2M) により酵素を溶出した。活性画分を集め、限外ろ過 (YM-50、アミコン社製) により濃縮した後、0.2M NaClを含む緩衝液D (pH8.2) で平衡化したSephacryl S-300 HRカラム (1.5x45cm、アマシャムバイオサイエンス社製) に添加し、同緩衝液により流速0.15ml/minで溶出した。以上の操作によって精製 -ポリ-L-リジン生合成酵素2.9mgを調製できた。この精製酵素標品はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動におい

10

20

30

40

50

て均一であった。 - ポリ - L - リジン生合成酵素の精製収率を下記の表 1 に示す。

【表 1】

ステップ	全量 (ml)	全活性 (U)	全蛋白量 (mg)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
粗酵素液	180	105000	2580	40.8	100	1.0
細胞膜画分	36	74700	349	214	71	5.2
塩洗浄膜画分	34	73200	212	345	70	8.4
NP-40 可溶化画分	31	67300	104	647	64	16
DEAE-TOYOPEARL	30	64000	25.2	2540	61	62
Blue-TOYOPEARL	28	27200	4.3	6400	26	156
Sephacryl S-300	12	19600	2.9	6880	19	168

10

【 0 0 8 4 】

また、 - ポリ - L - リジン生合成酵素の精製過程における各画分の SDS - PAGE 分析の結果を図 4 に示す。

【 0 0 8 5 】

(3) - ポリ-L-リジン生合成酵素の酵素科学的性質検討

精製酵素標品を用いて酵素科学的性質検討を行なった。

20

【 0 0 8 6 】

- ポリ-L-リジン生合成活性の測定は、川合らの方法 (Biochem Biophys Res Commun. 2003 Nov 21;311(3):635-40) を改良した方法で行なった。92.5 kBq/ml L-[U-14C] リジン (アマシャムバイオサイエンス社製) を含む 1 mM L-リジン、5mM MgCl₂、5mM ATP、1 mM DTT、20%(w/v) グリセロール、0.2% (w/v) NP-40、100 mM TAPS-NaOH 緩衝液 (pH8.5) 及び酵素を含む反応液 (40 μ l) を 30 °C でインキュベートした。反応液の 10 μ l を直径 2.1 cm のガラス繊維ろ紙 (ワットマン社製) にスポットし、直ちに氷冷した 5% (w/v) トリクロロ酢酸 - 0.25% (w/v) タングステン酸ナトリウム溶液に浸した。20 分間静置した後、5 分間穏やかに振とうした。フィルターを再度同溶液中で 5 分間振とう後、エタノールでリンスし、乾燥させた。フィルターに結合した放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター (アロカ社製) で測定した。この反応条件で 1 秒間に 1 pmol の L-リジンを - ポリ-L-リジンに取り込む酵素量を 1 ユニットと定めた。比活性はタンパク質 1 mg あたりのユニットとした。なお、タンパク質の定量は、ブラッドフォード法により行なった。検量線は、牛血清アルブミン (和光純薬社製) を用いて作成した。

30

【 0 0 8 7 】

L-リジン及びその他のアミノ酸のアデニル化活性は、ATP-PPi 交換反応により測定した。1 mM L-リジン又はその他のアミノ酸、5mM MgCl₂、5mM ATP、1 mM DTT、20%(w/v) グリセロール、0.2% (w/v) NP-40、0.2 mM 2リン酸ナトリウム、51.8 kBq/ml [32P]2リン酸ナトリウム、100 mM TAPS-NaOH 緩衝液 (pH8.5) 及び酵素を含む反応液 (40 μ l) を 30 °C でインキュベートした。1.2% (w/v) 活性炭、0.1 M 2リン酸ナトリウム及び 0.35 M 過塩素酸を含む溶液 1.0 ml を加えて反応を停止した。活性炭を純水で洗浄した後、活性炭に結合した放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター (アロカ社製) で測定した。

40

【 0 0 8 8 】

酵素合成された - ポリ-L-リジンの重合度分析及び定量は、次の条件で HPLC により行なった。検量線はチソ製 - ポリ-L-リジンを用いて作成した。

カラム: ODS-80Ts (4.6 x 250 mm、東ソー社製)

溶媒 A: 10 mM リン酸二水素ナトリウム、10 mM オクタンスルホン酸ナトリウム、100 mM 過塩素酸ナトリウム

溶媒 B: 溶媒 A + 60% アセトニトリル

グラジエント: 42% 溶媒 B (0min) 65% 溶媒 B (45min)

50

流速： 0.8m l /min

検出： 210nm

【 0 0 8 9 】

-ポリ-L-リジン生合成反応において生成するATP分解物の分析は、次の条件でHPLCにより行なった。

カラム： ODS-80Ts (4.6 x 250 mm、東ソー社製)

溶媒A： 20mM リン酸二水素ナトリウム、5mM テトラブチルアンモニウムブロミド

溶媒B： 溶媒A + 60%メタノール

グラジエント： 35%溶媒B(0min) 100%溶媒B(30min)

流速： 0.7m l /min

検出： 260nm

【 0 0 9 0 】

酵素合成された -ポリ-L-リジンのLC-ESI-MS/MS分析は、次の条件で行なった。

HPLC装置： Agilent 1200 (Agilent社製)

カラム：Develosil Praqueous-AR-5 (2.0 x 150 mm、野村化学社製)

溶媒A： 0.1% ヘプタフルオロ酪酸

溶媒B： 0.1% ヘプタフルオロ酪酸 +アセトニトリル

グラジエント： 10%溶媒B(0~5min) 45%溶媒B(45min)

流速： 0.4m l /min

検出： 210nm

質量分析装置： esquire 4000 (Bruker社製)

イオン化モード：ポジティブモード

【 0 0 9 1 】

酵素合成 -ポリ-L-リジンの結合様式の確認は、次の方法で行なった。15m lの酵素反応液(25、16h)から次の条件でHPLCにより -ポリ-L-リジンを精製し(約0.8mg)、凍結乾燥した。

カラム： ODS-80Ts (4.6 x 250 mm、東ソー社製)

溶媒A： 0.1% トリフルオロ酢酸

溶媒B： 0.1% トリフルオロ酢酸 + アセトニトリル

グラジエント： 0%溶媒B(0-10min) 30%溶媒B(30min)

流速： 0.7m l /min

検出： 210nm

これを島ら(Agric. Biol. Chem. 1981 45:2503-2508)の方法に従い、ジニトロフェニル化(DNP化)した。DNP化 -ポリ-L-リジンは6N HCl中で100、20h加水分解し、次の条件の薄層クロマトグラフィーにより分析した。

薄層板：シリカゲル60TLCプレート(メルク社製)

展開溶媒：ブタノール、酢酸、ピリジン、水(4:1:1:2)

発色：ニンヒドリン

【 0 0 9 2 】

まず、精製酵素標品22μgを用いて酵素反応(0.5m l)を行い、生成物をESI-LC-MS/MSにて解析した。発酵で得られる -ポリ-L-リジンは30mer中心の重合度分布であるのに対し、酵素合成された -ポリ-L-リジンは14又は15mer中心の重合度分布を示したが、LCにおける保持時間、MSスペクトル、MS/MSフラグメンテーションパターンの何れも -ポリ-L-リジン標準品の部分加水分解物と一致した(図5および図6)。また、薄層クロマトグラフィーによる分析において、DNP化した酵素合成 -ポリ-L-リジンを塩酸加水分解することにより、 -ポリ-L-リジン標準品と同じくN⁻2,4-DNP-L-リジンが生じたことから、酵素反応産物がL-リジンの -アミノ基と -カルボキシル基が結合したイソペプチド、すなわち -ポリ-L-リジンであることが示され(図7)、本酵素が -ポリ-L-リジン生合成酵素であることが確認された。なお、 -ポリ-L-リジンは、下記の構造を有する。

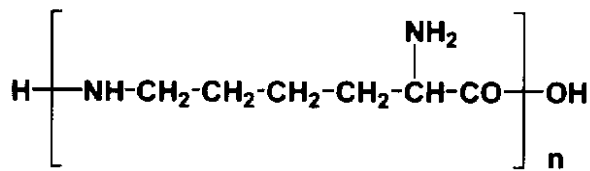
10

20

30

40

【化 1】



【 0 0 9 3 】

次に、HPLCにて酵素反応生成物を解析したところ、反応時間依存的な γ -ポリ-L-リジンの増加が確認されが、生成する γ -ポリ-L-リジンの重合度は反応時間に依存せず、常に一定の分布を示した。また、ATPは反応に伴ってAMPへ変換され、L-リジンのアデニル化活性も認められた。これらのことから、 γ -ポリグルタミン酸 (Appl Environ Microbiol. 2004 Jul;70(7):4249-55) やシアノフィシンの生合成酵素 (Appl Environ Microbiol. 2001 May;67(5):2176-82) がリガーゼ様式で基質アミノ酸を重合するのに対して、本酵素がチオプレート型リボソーム非依存的ペプチド合成酵素 (NRPS) 様式でL-リジンを重合することが強く示唆された。

【 0 0 9 4 】

更に本酵素の酵素科学的性質を詳細に検討したところ、本酵素は次の性質を有していることが明らかとなった。

1) 合成反応の至適 pH: pH8.5

2) 合成反応至適温度: 25~30

3) 温度安定性: 30 における活性半減期は180分、35 では80分、40 では19分であった。(0.2M NaClを含む緩衝液D (pH8.2))

4) 金属イオン要求性: 活性発現には2価カチオンの添加が必須である。5mM Mg^{2+} および5mM Mn^{2+} の添加で最大活性を示す。 Ca^{2+} の添加でもわずかに活性化。

5) 基質特異性: L-リジン以外に、D-リジン、DL-5-ヒドロキシリジンなど図8に示すL-リジンのアナログ体をアデニル化。

6) ヌクレオチド特異性: ATP特異的。GTP、UTP、CTPでは基質アミノ酸は活性化されない。

7) サブユニット分子量: 還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動により、約130kDaと算出される(図4)。

8) 分子量: ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephacryl S-300 HR、アマシャム-バイオサイエンス社製) により約270kDaと算出される。

【 0 0 9 5 】

上記7)、8)の結果から本酵素はホモダイマーであると推定された。

【 0 0 9 6 】

実施例 2 γ -ポリ-L-リジン生合成酵素遺伝子のクローニング

(1) γ -ポリ-L-リジン生合成酵素のアミノ酸配列解析

アミノ酸配列はLC-MS/MSにより解析した。 γ -ポリ-L-リジン生合成酵素をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分画し、CBB-R250で染色後、 γ -ポリ-L-リジン生合成酵素のバンドを切り出した。試料ゲル片にトリプシンを含むトリス緩衝液 (pH8.0) を加え、35、20時間ゲル内消化した。ゲル片から抽出したトリプシン消化ペプチド溶液をLC-MS/MS分析に供した。LC-MS/MS分析は次の条件で行なった。

【 0 0 9 7 】

HPLC装置: MAGIC 2002 nano LC system (Michrom Bioresources社製)

カラム: Magic C18 column (0.1×50mm, Michrom Bioresources社製)

溶媒A: 0.1%ギ酸 + 2%アセトニトリル

溶媒B: 0.1%ギ酸 + 90%アセトニトリル

グラジエント: 10%溶媒B (0~1min) 50%溶媒B (21min)

流速：250～300nl/min

質量分析装置：Q-ToF 2 (Waters Micromass社製)

イオン化モード：ポジティブモード

【0098】

得られたMS/MSデータをMassLynxソフトウェア (Waters Micromass社製) でデノボシーケンス解析した結果、3ペプチドのアミノ酸配列MAGAAWPAPAWQRSR (配列番号3)、(I/L)E(I/L)GE(I/L)DAA(I/L)AA(I/L)PGVR (配列番号4) およびA(I/L)AGT(I/L)KPGAYPR (配列番号5) を得た。

【0099】

(2) ϵ -ポリ-L-リジン生合成酵素遺伝子の取得

ストレプトミセス・アルプラスIFO14147株をスクロース103g/L、トリプトン10g/L、イーストエキス5g/L、NaCl 5g/Lからなる培地100mlに植菌し、30℃で24時間振盪培養した。この培養液から遠心分離により菌体を回収し、常法に従い染色体DNAを調製した。また、決定した ϵ -ポリ-L-リジン生合成酵素の内部アミノ酸配列 (peptide 1;N-A(I/L)AGT(I/L)KPGAYPR-C (配列番号6), peptide 2;N-MAGAAWPAPAWQRSR-C (配列番号7)) を基に次の4種類のプライマーを設計した。

【0100】

pr-pp1F; 5'-AC(C/G)(A/C)T(C/G)AAGCC(C/G)GG(C/G)GC(C/G)TACCC-3' (配列番号8)

pr-pp2R; 5'-CTGCCA(G/C)GC(G/C)GG(G/C)GC(G/C)GGCCA(G/C)GC-3' (配列番号9)

pr-pp2F; 5'-GC(C/G)TGGCC(C/G)GC(C/G)CC(C/G)GC(C/G)TGGCA-3' (配列番号10)

pr-pp1R; 5'-GGGTA(G/C)GC(G/C)CC(G/C)GGCTT(G/C)A(T/G)(G/C)GT-3' (配列番号11)

【0101】

これらプライマーと染色体DNAを鋳型としたPCRを行ったところ、pr-pp1F/pr-pp2Rの組み合わせで約500bpの特異的な増幅断片を得た。この増幅断片をプラスミドpGEMT-easyにクローニングし、このクローニングした断片をECL標識キット (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて標識した。標識した遺伝子断片をプローブとして用い、本菌株の染色体DNAから作製したコスミドライブラリー (Supercos 1, STRATAGENE社) に対してスクリーニングを行い、さらに、本プローブがハイブリダイズするKpnI 6.0kb断片を得た。この断片をプラスミドpTSR193 (参考文献、Actinomycetologica (2006)Vol.20, p.35-41) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。

【0102】

実施例3 ϵ -ポリ-L-リジンの酵素的生産

2mM L-リジン、5mM MgCl₂、5mM ATP、1mM DTT、20% グリセロール、0.2% (w/v) NP-40、100 mM TAPS-NaOH 緩衝液 (pH8.5) 及び約10 μ g の精製酵素標品を含む反応液 (200 μ l) を1.5ml 容マイクロチューブに入れ、25℃で120分間インキュベートした。反応開始20,40,80,120分後、実施例1に記載の方法で生成した ϵ -ポリ-L-リジンを定量した結果を表2に示した。

【表2】

酵素反応による ϵ -ポリ-L-リジンの生産

反応時間 (min)	ϵ -ポリ-L-リジン濃度 (μ g/ml)
20	33.1
40	59.7
80	90.8
120	102.1

【0103】

実施例4 リジンアナログ体とL-リジンから構成されるヘテロポリアミノ酸の酵素的生産

10

20

30

40

50

2mM 基質アミノ酸 (L-リジンとアナログ体を任意比で混合)、5mM MgCl₂、5mM ATP、1mM DTT、20% グリセロール、0.2% (w/v) NP-40、100 mM TAPS-NaOH 緩衝液 (pH8.5) 及び約10 µg の精製酵素標品を含む反応液 (200 µl) を1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、25 °C でインキュベートした。4 時間後、実施例 1 に記載の方法で生成したポリアミノ酸を ESI-LC-MS 分析した。

図 9 はその結果を示す。DL-5-ヒドロキシリジン (図 9D)、S-(2-アミノエチル)-L-システイン (図 9C)、O-(2-アミノエチル)-L-セリン (図 9B) 等、本酵素によりアデニル化されるアナログ体を基質として添加した場合に、一定頻度でポリリジン分子中にアナログ体を取り込まれたヘテロポリアミノ酸が得られた。

【0104】

実施例 5 リジンアナログ体と L-リジンから構成されるヘテロポリアミノ酸の微生物生産

実施例 4 に記載の要領で、 γ -ポリ-L-リジン分子中にアナログ体を取り込まれたヘテロポリアミノ酸を酵素的に合成可能であるが、S-(2-アミノエチル)-L-システインを含むヘテロポリアミノ酸においては、 γ -ポリ-L-リジン生産菌であるストレプトマイセス・アルブラス (*Streptomyces albulus*) 菌体そのものを用いても、より簡便に生産することができる。

【0105】

M3G 培地 (実施例 1) で 30 °C / 36 時間培養して得たストレプトマイセス・アルブラス (*Streptomyces albulus*) 菌体を 100mM クエン酸緩衝液 (pH4.2) で 2 回洗菌した。100ml の培養液から得た洗浄菌体を 50ml の 5% グルコース、1% 硫酸アンモニウム、8mM S-(2-アミノエチル)-L-システイン、16mM L-スレオニン (これら両アミノ酸の濃度は、M9 最少培地における本菌に対する最少生育阻止濃度、すなわち L-リジン生合成の鍵酵素であるアスパルトキナーゼ阻害最少濃度に相当) 及び任意量の L-リジンを含む 100mM クエン酸緩衝液 (pH4.2) から成る菌体反応液に懸濁し、30 °C / 48 時間振とう培養した。培養終了後、遠心分離により回収した培養上清中に含まれるポリアミノ酸を実施例 1 (段落 [0090]) に記載の方法で LC-MS 分析した。図 10 に示すように、酵素反応のみならず、生菌を用いた場合にも、一定頻度でポリリジン分子中に S-(2-アミノエチル)-L-システインが取り込まれたヘテロポリアミノ酸が得られた。

【0106】

S-(2-アミノエチル)-L-システイン以外のアナログ体においても、 γ -ポリ-L-リジン生合成酵素によりアデニル化されるものに関しては、本菌に対する最少生育阻止濃度相当量を含む菌体反応液を用いることでヘテロポリアミノ酸を微生物生産できる可能性が高い。

【0107】

実施例 6 γ -ポリ-L-リジン生合成酵素遺伝子の破壊

γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子の破壊用プラスミドを構築するために、次の 2 種類のプライマーを設計し、生産菌であるストレプトマイセス・アルブラス (*Streptomyces albulus*) IF014147 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。

e-PL_NRPS_F; 5'-GGGGATCCTCGTCGCCCTTCTCGAATCG-3' (配列番号 20)

e-PL_NRPS_R; 5'-ACCAAGCTTTCACGCGGCCGCACCTCCCTC-3' (配列番号 21)

【0108】

増幅した PCR 産物 (約 4kbp) を制限酵素 BamHI および HindIII で消化し、ネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド pLAE003 にクローニングした。構築したプラスミドの γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子内に、アブラマイシン耐性遺伝子 [aac(3)IV] を含むトランスポゾン (参考文献、*Actinomycetologica*, 20, 35-41, 2006) を挿入し (参考文献、*Actinomycetologica*, 20, 35-41, 2006)、破壊用のプラスミド (pLAE_{nrps}-apr) を構築した。pLAE_{nrps}-apr を大腸菌 *E. coli* S17-1 に導入し、さらにストレプトマイセス・アルブラスとの接合によって、pLAE_{nrps}-apr をストレプトマイセス・アルブラスに導入した (参考文献、*Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 636-641, 2005)。得られた導入株のプロトプラストを調製し (参考文献、*Journal of Biosciences*

10

20

30

40

50

ce and Bioengineering, 99, 636-641, 2005)、プロトプラスト再生培地(参考文献、Journal of Bioscience and Bioengineering, 99, 636-641, 2005)に塗布した。再生してきた菌株から、ネオマイシン感受性を示し、かつ、アブラマイシン耐性を示す遺伝子破壊候補株を取得した(図11A)。得られた候補株から染色体DNAを調製し、制限酵素KpnIで消化後、アガロース電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルをナイロンメンブレンに転写し、 γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子をプローブとして用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーション(CDP-star, GE Healthcare)にて γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子が破壊されている株を選抜した。その結果、一株(PL-nrps::aac(3)IV)を得た(図11B)。得られた破壊株を生産培地にて培養し、 γ -ポリ-L-リジンの生産性をHPLC(実施例1)にて確認したところ、 γ -ポリ-L-リジン生産性が欠失しており(図11C)、取得した遺伝子が γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子であることを確認した。

10

【0109】

実施例7 ストレプトミセス・ノルセイ(*Streptomyces noursei*) NBRC15452株由来 γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子の取得

γ -ポリ-L-リジン生産菌であるストレプトマイセス・アルブラス(*Streptomyces albulus*)のみならず、近縁のストレプトミセス・ノルセイ(*Streptomyces noursei*)においても γ -ポリ-L-リジンを生産することが既に知られている(特開平1-187090参照)。そこでストレプトミセス・ノルセイ(*Streptomyces noursei*)からも γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子の取得を試みた。

【0110】

PCRにより増幅したストレプトマイセス・アルブラス(*Streptomyces albulus*)の γ -ポリ-L-リジン生合成遺伝子ORF断片(実施例6参照)をGEヘルスケアバイオサイエンス社製のECL標識キットを用いて標識した。標識した遺伝子断片をプローブとして用い、実施例1(段落[0099]-[0101])に従い構築したストレプトミセス・ノルセイ(*Streptomyces noursei*) NBRC15452株の染色体DNAコスミドライブラリー(Supercos I, STRATAGENE社)に対してスクリーニングを行い、本プローブがハイブリダイズするKpnI 6.5kb断片を得た。この断片をプラスミドpGEM7Z(promega)にサブクローニングし、塩基配列(配列番号22)を決定した。さらにそれに対応するアミノ酸配列(配列番号23)を決定した。

20

【0111】

本遺伝子に関しては、既に取得済みのストレプトマイセス・アルブラス(*Streptomyces albulus*)由来の γ -ポリ-L-リジン生合成酵素との相同性は、塩基配列レベルで92.7%、アミノ酸配列レベルで93.0%と非常に高く、またドメイン構成など構造上の特徴も極めて良く一致することから、本遺伝子についても γ -ポリ-L-リジン生合成酵素をコードしている可能性が高い。

30

【産業上の利用可能性】

【0112】

ポリアミノ酸の酵素的合成法は、微生物発酵法や化学合成法よりも省エネルギーであり、望ましくない副反応も抑えられるため高純度のポリアミノ酸を製造することができる。本発明によって製造される各種アミノ酸のポリマーは、抗菌剤等として使用することができ、トイレットリー用品、化粧品、飼料添加物、医薬、農薬、食品添加物、電子材料等の様々な用途に使用することができる。さらに、本発明のポリヌクレオチド含有組換えベクターおよび形質転換体を使用することで、様々な有用ポリアミノ酸生合成への応用が期待できる。

40

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図1A-B】(A)従来のNRPSの多モジュール構造；(B)本発明の一実施形態におけるポリアミノ酸合成酵素の単一モジュール構造をそれぞれ模式的に表した図である。

【図2A-D】本発明のポリアミノ酸合成酵素のC末端側に位置する縮合反応触媒ドメインおよびそのサブドメインのアミノ酸配列を示す。図中「tmr」は膜貫通領域を意味する。

50

【図3A-C】本発明のポリアミノ酸合成酵素のC末端側に位置する縮合反応触媒ドメインのサブドメインのDNA配列を示す。

【図3D】本発明のポリアミノ酸合成酵素のC末端側に位置する縮合反応触媒ドメインのDNA配列を示す。図中「tmr」は膜貫通領域を意味する。

【図4】本発明の -ポリ-L-リジン生合成酵素の精製過程における各画分のSDS-PAGE分析の結果を示す写真である。レーン1および11：分子量マーカー（リコンビナントタンパク質、バイオラッド社）、レーン2：粗酵素液、レーン3：可溶性画分、レーン4：細胞膜画分、レーン5：塩可溶化画分、レーン6：塩洗浄細胞膜画分、レーン7：NP-40可溶化画分、レーン8：DEAE TOYOPEARLカラムからの溶出画分、レーン9：AF-Blue TOYOPEARLカラムからの溶出画分、レーン10：Sephacryl S-300カラムからの溶出画分。

【図5】(A)酵素反応液中の -ポリ-L-リジンをHPLCで分析した結果を示すグラフである。(B) -ポリ-L-リジン標準品を用いて検量線を作成し、図5(A)の結果から算出した反応液中の -ポリ-L-リジン濃度を示すグラフである。

【図6】(A)液体クロマトグラフィー(LC)による分離パターンを示すグラフである。(B) -ポリ-L-リジン標準品塩酸加水分解物14merの質量分析結果を示すグラフである。(C)酵素合成 -ポリ-L-リジン14merの質量分析結果を示すグラフである。

【図7】DNP化 -ポリ-L-リジン塩酸加水分解物の薄層クロマトグラフィー分析の結果を示すグラフである。レーン1：L-リジン、レーン2： -ポリ-L-リジン（和光純薬製）のDNP化物を塩酸加水分解して生じたもの、レーン3： -ポリ-L-リジン標準品（チッソ製）のDNP化物を塩酸加水分解して生じたもの、レーン4：酵素合成 -ポリ-L-リジンのDNP化物を塩酸加水分解して生じたもの、レーン5：N⁻-2,4-DNP-L-リジン、レーン6：N⁻-2,4-DNP-L-リジン。

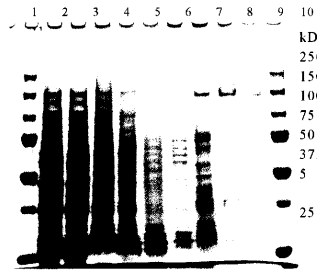
【図8】本発明のアミノ酸合成酵素のアミノ酸活性化（アデニル化）反応における基質特異性を示すグラフである。L-リジンに対する活性を100%として相対活性で示した。なお、L-Ala、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Phe、L-Pro、L-Trp、L-Met、Gly、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Gln、L-Asn、L-Tyr、L-Arg、L-His、L-Asp、L-Gluは何れもアデニル化されなかった。

【図9】L-リジンとアナログ体の混合物を基質とした酵素反応により生成したポリアミノ酸をESI-LC-MS分析した結果を示す。(A)はL-リジンのみを基質とした反応により得られたポリアミノ酸（ -ポリ-L-リジン）、(B)は1.8mM O-（2-アミノエチル）-L-セリンと0.2mM L-リジンの混合物を基質とした反応により得られたポリアミノ酸、(C)は1.8mM S-（2-アミノエチル）-L-システインと0.2mM L-リジンの混合物を基質とした反応により得られたポリアミノ酸、(D)は1.6mM DL-5-ヒドロキシリジンと0.4mM L-リジンの混合物を基質とした反応により得られたポリアミノ酸のLCにおける分画パターン及び質量分析結果を示すグラフである。

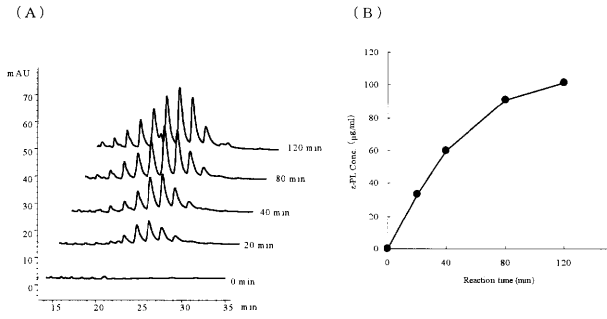
【図10】菌体反応により生成したポリアミノ酸をESI-LC-MS分析した結果を示す。(A)は1.6mM L-リジンを含む菌体反応液から得られたポリアミノ酸のLCにおける分画パターン及び質量分析結果を、(B)は0.4mM L-リジンを含む菌体反応液から得られたポリアミノ酸のLCにおける分画パターン及び質量分析結果を示すグラフである。

【図11】 -ポリ-L-リジン生合成酵素遺伝子の破壊方法及びその影響を示す図である。(A)は、破壊用プラスミドpLAEnrps-aprを用いた遺伝子破壊株の作製手順を模式的に示す。(B)ゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより、 -ポリ-L-リジン生合成遺伝子の破壊を確認した図である。(C)は、得られた破壊株を生産培地にて培養し、 -ポリ-L-リジンの生産性をHPLCを用いて確認した結果を示す。

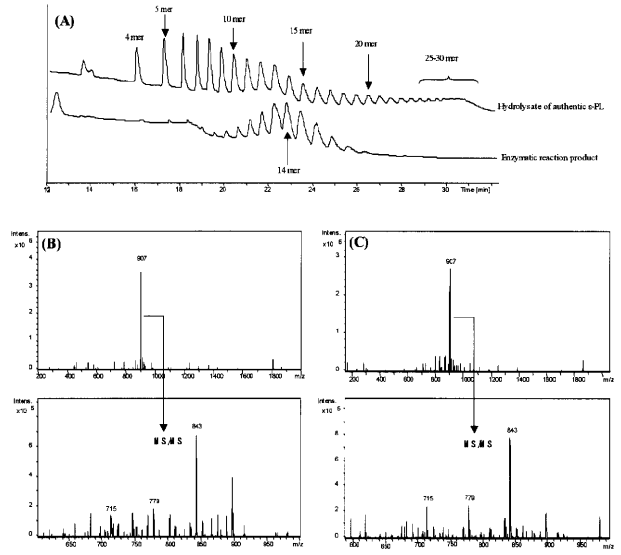
【 図 4 】



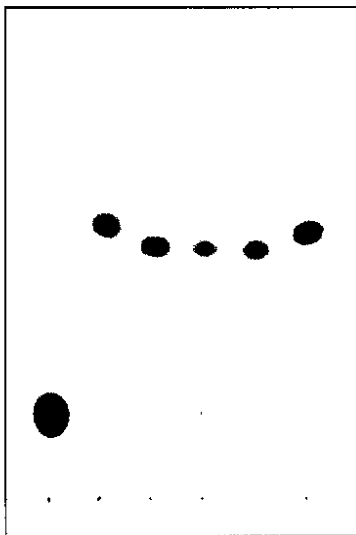
【 図 5 】



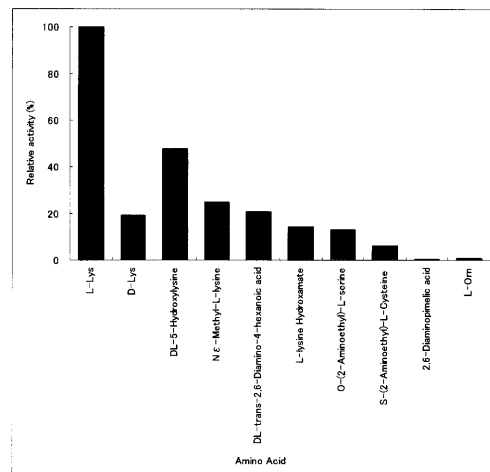
【 図 6 】



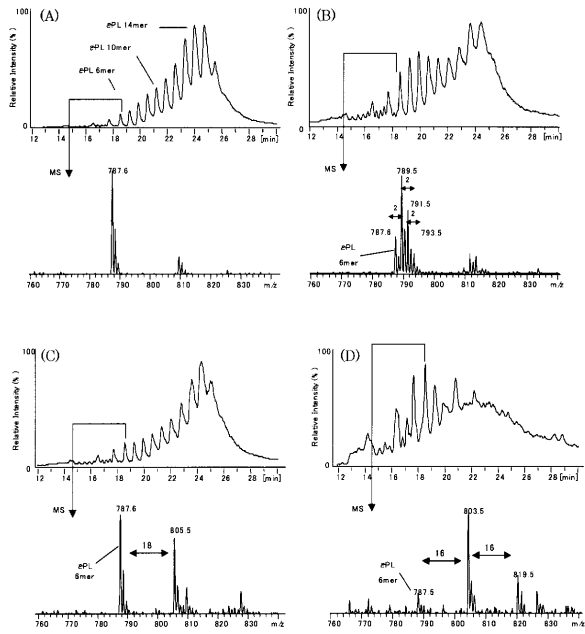
【 図 7 】



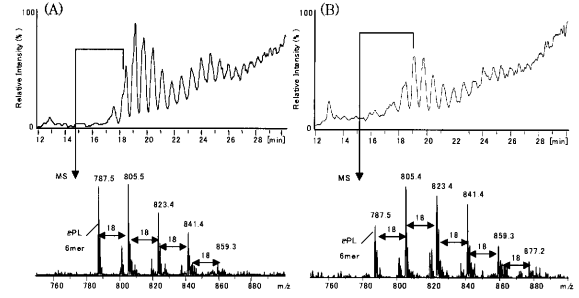
【 図 8 】



【 図 9 】

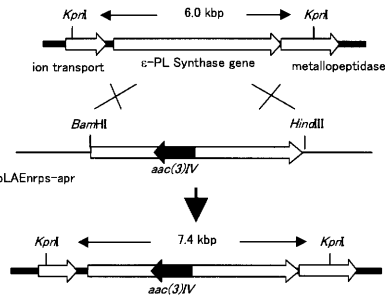


【 図 10 】

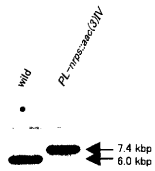


【 図 11 】

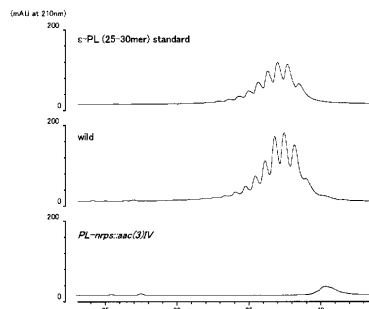
A



B



C



【配列表】

2009072134000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	4 H 0 4 5
C 1 2 P 13/02 (2006.01)	C 1 2 P	13/02		
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	

(72)発明者 山中 一也

神奈川県横浜市金沢区大川5 - 1 チッソ株式会社横浜研究所内

(72)発明者 濱野 吉十

福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島4 - 1 - 1 福井県立大学生物資源学部内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA07 AA11 AA19 AA20 BA07 CA04 CA05 CA06
 CA09 CA10 CA11 DA06 DA08 EA04 FA02 FA10 GA11 GA19
 HA03 HA08 HA09 HA12 HA14
 4B050 CC03 CC04 DD02 FF11E FF14E LL05
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR42 QR56 QR62
 QR82 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02
 4B064 AE02 CA19 CA21 CB30 CC24 CE10 DA01 DA10 DA11 DA20
 4B065 AA26X AA50X AA50Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA27
 4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 CA11 DA75 EA50 FA71