

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7581355号
(P7581355)

(45)発行日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(24)登録日 令和6年11月1日(2024.11.1)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 15 (全52頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-540978(P2022-540978)	(73)特許権者	524244340
(86)(22)出願日	令和2年12月2日(2020.12.2)		ナショナル センター オブ テクノロジー
(65)公表番号	特表2023-509176(P2023-509176		イノベーション フォー シンセティック
	A)		バイオロジー カンパニー リミティド
(43)公表日	令和5年3月7日(2023.3.7)		中華人民共和国, ティエンチン 3 0 0
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/133395		3 0 8 , ティエンチン パイロット フリ
(87)国際公開番号	WO2021/135796		ー トレード ゾーン (エアポート エコ
(87)国際公開日	令和3年7月8日(2021.7.8)		ノミック エリア), ウェスト エイス
審査請求日	令和4年8月22日(2022.8.22)		アベニュー 1 5
(31)優先権主張番号	201911404948.2	(74)代理人	100099759
(32)優先日	令和1年12月31日(2019.12.31)		弁理士 青木 篤
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
		(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 D - キシルロース 4 - エピメラーゼ、その変異体及びそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D - キシルロース 4 - エピメラーゼ活性を有するポリペプチドであって、
前記ポリペプチドは、配列番号 3 3 ~ 1 2 2 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を
含むか、又はそれからなる、
ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドは、テルモトガ・マリティマ (T h e r m o t o g a m a r i t i m a) に由来する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

単離されたポリヌクレオチド、核酸コンストラクト、組み換え発現ベクター、又は組み
換え宿主細胞であって、前記ポリヌクレオチド又は前記核酸コンストラクトは、請求項 1
~ 2 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、
前記組み換え発現ベクター又は組み換え宿主細胞は、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載
のポリペプチドを発現する、単離されたポリヌクレオチド、核酸コンストラクト、組み換
え発現ベクター、又は組み換え宿主細胞。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載のポリペプチドを産生する方法であって、
前記方法は以下の工程 (a) を含む：

(a) ポリペプチドの産生に資する条件下で細胞又は菌株を培養する工程；

そのうち、前記細胞又は菌株は、前記ポリペプチドを産生し、前記細胞又は菌株は、請求項 3 に記載の核酸コンストラクト又は組み換え発現ベクターを含み、前記核酸コンストラクト又は前記組み換え発現ベクターは、前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む；

方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載のポリペプチドを用いて触媒反応を行うことを含む、D - キシルロースを L - リブロースに変換する方法。

【請求項 6】

L - ペントースを調製する方法であって、前記方法は、以下の工程：

(a) D - キシルロース 4 - エピメラーゼを用いて、D - キシルロースを L - リブロースに変換すること、

を含む；

ここで、前記 D - キシルロース 4 - エピメラーゼは、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の D - キシルロース 4 - エピメラーゼ活性を有するポリペプチドである、方法。

【請求項 7】

前記方法は、さらに以下の工程：

(b) D - キシロースイソメラーゼを用いて、D - キシロースを D - キシルロースに変換すること、

を含む；

請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法は、さらに、

(i) L - アラビノースイソメラーゼを用いて、L - リブロースを L - アラビノースに変換することを含み、前記 L - ペントースは L - アラビノースである；

(i i) L - リボースイソメラーゼ又はホスホマンノースイソメラーゼ又はそれらの組み合わせを用いて、L - リブロースを L - リボースに変換することを含み、前記 L - ペントースは L - リボースである；

(i i i) L - リブロース 3 - エピメラーゼを用いて、L - リブロースを L - キシルロースに変換することを含み、前記 L - ペントースは L - キシルロースである；

(i v) L - リブロース 3 - エピメラーゼを用いて、L - リブロースを L - キシルロースに変換し、L - フコースイソメラーゼ又は D - アラビノースイソメラーゼ又は L - ラムノースイソメラーゼを用いて、L - キシルロースを L - キシロースに変換することを含み、前記 L - ペントースは L - キシロースである；及び/又は

(v) L - リブロース 3 - エピメラーゼを用いて、L - リブロースを L - キシルロースに変換し、L - ラムノースイソメラーゼを用いて L - キシルロースを L - リキソースに変換することを含み、前記 L - ペントースは L - リキソースである、

請求項 6 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法の反応系には、さらに酵素反応液を含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記酵素反応液が金属イオンを含み、前記金属イオンは、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Bi^{3+} 、 Ag^{+} 、 Li^{+} から選択される 1 つ以上であってもよい、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記反応は、好気性、微好気性又は嫌気性条件下で行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記反応は、嫌気性、温度が 45 ~ 55 、pH が 8 . 0、金属イオンが Co^{2+} 又は M

10

20

30

40

50

g^{2+} 又は Mn^{2+} 又はそれらの組み合わせの条件下で行う、請求項10～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記反応は、インビトロ触媒反応又は全細胞生体触媒反応を含み；
前記反応は、インビトロ触媒反応であり、前記インビトロ触媒反応は、段階的又は同時に行うことができ；
前記インビトロ触媒反応は、段階的に行う場合、1つの反応容器又は直列の複数の反応容器において実施され；
前記反応容器は、バッチ供給バイオリアクター、固定化酵素を含む充填床バイオリアクター、酵素又は細胞リサイクルバイオリアクター、膜分離を含むバイオリアクター、及び連続供給バイオリアクターのうちの1つ又は複数から選択されるものであり；
前記インビトロ触媒反応における酵素は、遊離酵素、前記酵素を含む細胞溶解物、前記酵素を含む全細胞、固定化酵素の1つ又は複数の形態で存在する、
請求項6～12のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項14】

L-ペントースの調製におけるポリペプチドの使用であって、前記ポリペプチドは、請求項1～2のいずれか一項に記載のポリペプチドから選択され；
前記L-ペントースは、L-アラビノース、L-リボース、L-リブロース、L-キシロース、L-キシロース及びL-リキソースのうちの1つ又は複数から選択される、使用。

20

【請求項15】

D-キシロース4-エピメラーゼ活性を有する酵素としてのポリペプチドの使用であって、前記ポリペプチドは、請求項1～2のいずれか一項に記載のポリペプチドから選択される、前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本開示は、生物触媒および合成生物学の分野に関する。本開示は、D-キシロースとL-リブロースとの間の相互変換を可逆的に触媒することができる、D-キシロース4-エピメラーゼ(Xu4E)と名付けられた新規ポリペプチド(酵素)及びそれらの変異体に関する。さらに、複数の人工酵素経路を構築することにより、自然界で最も豊富なペントースであるD-キシロースからL-ペントース(即ち、L-アラビノース、L-リボース、L-リブロース、L-キシロース、L-キシロース及びL-リキソース)を生成するための新規な方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

背景技術

ペントース(又は五炭単糖)は、化学式が $C_5H_{10}O_5$ で、5個の炭素原子を持つ単糖である。それらは、アルドペントースとケトペントースの2種類に分けられる。8種類のアルドペントースと4種類のケトペントースがあり、それぞれのケトペントースは2種類のアルドペントースに対応している。12種類のペントースもL型糖とD型糖に分けられ、それぞれでは4種類のアルドペントースと2種類のケトペントースがある。D-キシロース、D-リボース、L-アラビノースは天然糖であるが、他のペントースは、自然界にごく少量しか存在しない希少糖である。D-キシロースは、自然界で最も豊富なペントースである。L-ペントースは、特に多くの重要な医薬品前駆体として、医療及び健康用途に大きな可能性があるため、多くの注目を集めている。

40

【0003】

自然界で最も豊富なペントースであるD-キシロースは、リグノセルロースから分離することができ、キシロース(wood sugar)と呼ばれている。D-キシロースはヘミセルロースキシランの主成分です。現在、D-キシロースは主にトウモロコシ穂軸とビ

50

ートパルプの酸性又はアルカリ性加水分解物から分離されており、ほとんどのキシロースはゼロカロリーの甘味料であるキシリトールの変換に使用されている。

【0004】

L - アラビノースは、米国食品医薬品局 (FDA) が承認した、ショ糖の50%の甘味を持つゼロカロリーの天然甘味料である (Antilla et al. 1997, Bokuet al. 2001)。さらに重要なのは、スクロースに3~4%のL - アラビノースを加えると、スクラーゼの活性を阻害し、スクロースの加水分解を防ぎ、スクロースの吸収を防ぐことができるため、カロリー摂取量によると、L - アラビノースはスクロース中和剤と見なされる (Morimoto et al. 2001)。同時に、腸内の未利用の糖は、有益なバクテリアの成長を促進し、それによって大腸での有害な微生物の成長を阻害するプロバイオティクスである。L - アラビノースは、出発物質として合成薬の製造に使用され、また分子生物学実験や工業発酵で広く使用されている生化学製品でもある。

10

【0005】

L - アラビノースは、高等植物のヘミセルロースにアラビナン、アラビノキシラン、アラビノガラクトランの形で存在している。日本では、L - アラビノースは、トウモロコシ繊維 (Bokuet al. 2001)、アラビアガム、サトウダイコンパルプ (Antilla et al. 1997) などのヘミセルロースをアルカリ抽出した後、酸加水分解することによって得られた。中国では、L - アラビノースはトウモロコシの穂軸の酸加水分解によるD - キシロースの生成の副産物である。L - アラビノースの高価格と限られた供給は、その幅広い用途を大きく制限する。

20

【0006】

L - リボースは自然界では広く見られていない。これは、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、及びサイトメガロウイルスに対する抗ウイルス薬などの製造に使用される多くの新規ヌクレオチド類似体の前駆体です (Kim et al. 2014)。L - リボースは、グルコースデヒドロゲナーゼの競合的阻害剤としても機能する (Beerens et al. 2012)。以前は、L - リボースは、中間体としてリビトールを使用した2段階の微生物変換によって生成されていた。現在では、L - リボースの生合成は、L - アラビノースイソメラーゼ (L - AI)、及びL - リボースイソメラーゼ (L - RI、EC 5.3.1. B3) 又はマンノース6 - ホスホイソメラーゼ (MPI、EC 5.3.1.8) によって、L - リブロースをL - リボースに変換するという2段階の酵素触媒反応ことで実施している (Kim et al. 2014)。

30

【0007】

L - リブロースは、L - リボースとL - アラビノースを合成するための出発物質である。その5' - リン酸生成物であるL - リブロース5 - リン酸は、ペントースリン酸経路の重要な代謝物である。

【0008】

L - キシロースは - グルコシダーゼの阻害剤として作用し、血糖値を下げるために使用できる。L - キシロースは、抗ウイルス薬の製造用のL - リボース、及び肝炎又は肝硬変の指標としてのL - キシロースなど、他の重要な希少糖の製造にも使用できる。

【0009】

動物用抗生物質アピラマイシンAの成分であるL - リキトースは、潜在的なL - フコシダーゼ阻害剤である。

40

【0010】

L - キシロースは、抗B型肝炎ウイルス (HBV) 用ヌクレオシドの合成、及びL - リボフラノースとその誘導体の合成の出発物質である。

【0011】

【表 1】

表 1 様々な種類の L-ペントースの用途

名称	用途
L-アラビノース	FDA承認のゼロカロリーの天然甘味料で、単独で、またはショ糖や他の甘味料と組み合わせて使用できる
	ショ糖中和剤、スクラーゼ阻害剤
	有益な腸内微生物の成長をサポートするプレバイオティクス
	分子生物学実験や工業発酵で広く使用されている生化学製品
L-リボース	抗ウイルス用及び抗癌用の L-ヌクレオシド薬の成分
	糖複合体、オリゴヌクレオチド及び L-オリゴヌクレオチドアプタマーの成分
	L-アロース及び L-アルトロース製造の出発原料
	B型肝炎ウイルス及び EBウイルスに対する潜在的な能力
L-リブロース	健康と飲食のための栄養補助食品
	L-リボース生産の出発原料
L-リキソース	抗生物質 アビラマイシン A の組成
	L-フコシダーゼに対する阻害剤
L-キシロース	抗 HBV 用ヌクレオシド合成の出発物質
	L-リボフラノース及び誘導体の合成のための出発物質
L-キシルロース	さまざまなグルコシダーゼの潜在的な阻害剤
	L-キシロース及び L-リキソースの合成
	肝炎又は肝硬変の指標

【0012】

エピメラーゼは、複数の不斉中心を含む基質の不斉炭素原子のコンフォメーション変化を触媒するイソメラーゼの一種である。五炭単糖 4 - エピメラーゼは長い間検索されていたが、報告されたことはなかった (Beerens et al., 2017)。L - リブロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ (EC 5.1.3.4) や UDP - D - キシロース 4 - エピメラーゼ (EC 5.1.3.5) などの自然界の 4 - エピメラーゼは、そのペントース基質がリン酸又はウリジン二リン酸 (UDP) 基を持っていることを必要とする。

【0013】

Ken Izumori 教授は、希少糖生合成の完全な戦略を提案した (本開示の図 1 で示される)。D - キシロースから出発し、L - リブロース 3 - エピメラーゼ (又はペントース 3 - エピメラーゼ)、アルドースイソメラーゼ、アルドースレダクターゼ及びポリオールデヒドロゲナーゼを使用することにより、他の 11 種類のペントースを生成することができる。従来の技術では、D - キシロースを原料とし、6 種類の L - ペントースを製造する場合、キシリトール又はリビトールの製造工程を経る必要があるため、補酵素 NAD (P) の必要な 2 種類のオキシドレダクターゼ、即ちアルドースレダクターゼ及びポリオールデヒドロゲナーゼを使用しなければならない。高価で不安定な補酵素 (NAD (P)) の使用や、可逆平衡反応及び関連中間体の生成物の複雑な分離が必要があるため、L - ペントースの高い製造コストをもたらす。

【発明の概要】

【0014】

発明の概要

発明が解決しようとする課題

既存の L - ペントース製造技術には高コストで複雑な製造工程の欠陥があるため、L -

ペントースの新しい製造方法を提供する必要がある。

【0015】

一実施形態において、本開示は、D - キシルロース及びL - リブロースの相互変換を触媒する化学反応能力を有する野生型ポリペプチド（酵素）及びその変異体を提供する（図2）。本公開における野生型D - キシルロース4 - エピメラーゼ（D - xylulose₄ - epimerase、Xu4E）及びその変異体は、天然で最も豊富なペントース、即ちD - キシロースを原料として利用してL - ペントースを製造することができる。一実施形態において、例示的なL - ペントースは、6種類のL体五炭単糖、即ち、L - アラビノース、L - リボース、L - リブロース、L - キシルロース、L - キシロース及びL - リキソースから選択される。

10

【0016】

別の実施形態において、本開示は、前述のXu4E変異体を調製するための方法を提供し、これは、分子生物学及び遺伝子工学的方法を介してXu4E変異体を調製する。

【0017】

別の実施形態において、本開示は、前述の野生型Xu4E及びその変異体の使用を提供し、それがL - ペントースを生成するために使用することができる。

【0018】

別の実施形態において、本開示は、L - ペントースを製造するための新しい方法を提供し、この方法は、原料としてD - キシロース又はD - キシルロースを使用してL - ペントースを製造する方法を含む。

20

【0019】

別の実施形態において、本開示は、L - ペントースを生成するための新規な方法を提供し、この方法は、Xu4E又はその変異体を使用してD - キシルロースをL - リブロースに変換するステップを含む。

【0020】

特定の実施形態において、本開示は、L - ペントースを製造するための前述の方法をさらに最適化するための方法を提供する。

【0021】

課題を解決するための手段

前述の課題を解決するための本開示の技術的な構成は以下の通りである。

30

【0022】

(1) D - キシルロース4 - エピメラーゼ活性を有し、(a) ~ (d) からなる群のいずれか1つから選択されるポリペプチドであって：

【0023】

(a) 配列番号2 - 32のいずれか1つで示される配列に対して少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%又は少なくとも90%の配列同一性を有する配列によってコードされるポリペプチド；

【0024】

(b) 非常に高いストリンジェンシー条件下で(i)又は(ii)で示されるポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

40

【0025】

(i) 配列番号2 - 32のいずれか1つで示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

【0026】

(ii) (i) の相補的ポリヌクレオチド全体；

【0027】

(c) 配列番号2 - 32のいずれか一つで示されるポリペプチドの変異体であって、前記変異体は、1つ又は複数の位置での1つ又は複数のアミノ酸の置換、複製、欠失、又は付加を含み、前記ポリペプチドは依然としてD - キシルロース4 - エピメラーゼ活性を有する、ポリペプチド；及び

50

【 0 0 2 8 】

(d) (a)、(b)、(c)で示されるポリペプチドのフラグメントであり、そのフラグメントはD - キシルロース 4 - エピメラーゼ活性を持っている、前記ポリペプチド。

【 0 0 2 9 】

(2) ポリペプチドは、変異体であり、前記ポリペプチドと配列番号 2 - 3 2 のいずれか 1 つで示されるポリペプチドと比較して、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する、(1) に記載のポリペプチド。

【 0 0 3 0 】

(3) ポリペプチドは、配列番号 2 - 3 2 のいずれか 1 つで示されるポリペプチドの変異体であり、前記変異体は、少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個の部位にアミノ酸の変異を含み、前記ポリペプチドは依然としてD - キシルロース 4 - エピメラーゼ活性を持っている、(1) ~ (2) のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【 0 0 3 1 】

(4) 前記ポリペプチドは、以下で示されるポリペプチドである、(1) ~ (3) のいずれか一項に記載のポリペプチドであって：

【 0 0 3 2 】

(a) 配列番号 2 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における 1 つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、1 0 2、1 2 5、1 3 1、1 6 1、1 6 3、2 6 6、2 6 7、2 9 7、3 0 6、3 1 8、3 3 7、3 9 4、4 0 2 及び 4 0 3 からなる群より選択される 1 つ以上である；

20

【 0 0 3 3 】

(b) 配列番号 3 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における 1 つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、1 0 2、1 2 5、1 3 1、1 6 1、1 6 3、2 6 6、2 6 7、2 9 7、3 0 6、3 1 8、3 3 7、3 9 4、4 0 2 及び 4 0 3 からなる群より選択される 1 つ以上である；

【 0 0 3 4 】

(c) 配列番号 4 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における 1 つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、1 0 2、1 2 5、1 3 1、1 6 1、1 6 3、2 6 6、2 6 7、2 9 7、3 0 6、3 1 8、3 3 7、3 9 4、4 0 2 及び 4 0 3 からなる群より選択される 1 つ以上である；

30

【 0 0 3 5 】

(d) 配列番号 5 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における 1 つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、1 0 5、1 2 8、1 3 4、1 6 4、1 6 6、2 7 0、2 7 1、3 0 1、3 1 0、3 2 2、3 4 1、3 9 8、4 0 6、4 0 7 からなる群より選択される 1 つ以上である；

【 0 0 3 6 】

(e) 配列番号 6 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における 1 つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、1 0 5、1 2 8、1 3 4、1 6 4、1 6 6、2 6 9、2 7 0、3 0 0、3 0 9、3 2 1、3 4 0、3 9 7、4 0 5、4 0 6 からなる群より選択される 1 つ以上である；

40

【 0 0 3 7 】

(f) 配列番号 7 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における 1 つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、1 1 7、1 4 0、1 4 6、1 7 6、1 7 8、2 8 5、2 8 6、3 1 6、3 2 5、3 3 7、3 5 5、4 1 2、4 2 0、4 2 1 からなる群より選択される 1 つ以上である；

【 0 0 3 8 】

(g) 配列番号 8 で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列におけ

50

る1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、125、148、154、184、186、293、294、324、333、345、363、420、428、429からなる群より選択される1つ以上である；

【0039】

(h) 配列番号9で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、124、147、153、183、185、297、298、328、337、349、368、425、433、434からなる群より選択される1つ以上である；

【0040】

(i) 配列番号10で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、108、131、137、167、169、276、277、307、316、328、346、403、411、412からなる群より選択される1つ以上である；

【0041】

(j) 配列番号11で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、115、138、144、174、176、280、281、311、320、332、351、408、416、417からなる群より選択される1つ以上である；

【0042】

(k) 配列番号12で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、107、130、136、166、168、272、273、303、312、324、343、400、408、409からなる群より選択される1つ以上である；

【0043】

(l) 配列番号13で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、109、132、138、168、170、275、276、306、315、327、346、403、411、412からなる群より選択される1つ以上である；

【0044】

(m) 配列番号14で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、103、126、132、162、164、267、268、298、307、319、338、395、403、404からなる群より選択される1つ以上である；

【0045】

(n) 配列番号15で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、105、128、134、164、166、271、272、302、311、323、342、399、407、408からなる群より選択される1つ以上である；

【0046】

(o) 配列番号16で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、64、88、94、123、125、236、237、267、274、286、373、381、382からなる群より選択される1つ以上である；

【0047】

(p) 配列番号17で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、110、133、139、169、171、271、272、302、311、323、342、399、407、408からなる群より選択される1つ以上である；

【0048】

(q) 配列番号18で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列にお

10

20

30

40

50

ける1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、102、125、131、161、163、266、267、297、306、318、337、394、402、403からなる群より選択される1つ以上である；

【0049】

(r) 配列番号19で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、121、144、150、180、182、289、290、320、329、341、359、416、424、425からなる群より選択される1つ以上である；

【0050】

(s) 配列番号20で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、107、130、136、166、168、273、274、304、313、325、344、401、409、410からなる群より選択される1つ以上である；

【0051】

(t) 配列番号21で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、21、48、54、84、86、182、183、213、222、234、260、324、332、333からなる群より選択される1つ以上である；

【0052】

(u) 配列番号22で示される配列と比較して、前記ポリペプチドのアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸は、以下の部位に対応する位置に変異を含み、ここで、前記部位は、30、55、61、91、93、202、203、233、242、254、273、330、338、339からなる群より選択される1つ以上である、前記ポリペプチド。

【0053】

(5) 前記ポリペプチドは、配列番号2に対応して以下の変異を有するポリペプチドである、(1)～(4)のいずれか一項に記載のポリペプチドであって：

(a) 102番目での変異、

(b) 125番目での変異、

(c) 131番目での変異、

(d) 161番目での変異、

(e) 163番目での変異、

(f) 266番目での変異、

(g) 267番目での変異、

(h) 297番目での変異、

(i) 306番目での変異、

(j) 318番目での変異、

(k) 337番目での変異、

(l) 394番目での変異、

(m) 402番目での変異、

(n) 403番目での変異

(o) 267及び297番目での組み合わせ変異、

(p) 306及び403番目での組み合わせ変異、

(q) 125及び297番目での組み合わせ変異、

(r) 163、267、403番目での組み合わせ変異、

(s) 125、267及び297番目での組み合わせ変異、

(t) 163、267、297及び403番目での組み合わせ変異、

(u) 125、163、267及び297番目での組み合わせ変異、

(v) 125、163、267、297及び403番目での組み合わせ変異、

(w) 125、163、267、297、402及び403番目での組み合わせ変異、

10

20

30

40

50

(x) 1 6 3、2 6 7、2 9 7、3 0 6、4 0 2 及び 4 0 3 番目での組み合わせ変異、
(y) 1 2 5、1 6 3、2 6 7、2 9 7、3 0 6、4 0 2 及び 4 0 3 番目での組み合わせ変異、

(z) 1 2 5、1 3 1、1 6 3、2 6 7、2 9 7、3 0 6、4 0 2 及び 4 0 3 番目での組み合わせ変異、

(a a)

(b b) 1 2 5、1 6 3、2 6 7、2 9 7、3 0 6、3 1 8、4 0 2 及び 4 0 3 番目での組み合わせ変異、

(c c) 1 2 5、1 3 1、1 6 3、2 6 7、2 9 7、3 0 6、3 1 8、4 0 2 及び 4 0 3 番目での組み合わせ変異、前記ポリペプチド。

【 0 0 5 4 】

(6) 前記ポリペプチドは、配列番号 2 に対応して以下の部位のいずれか 1 つで変異したポリペプチドである、(5) に記載のポリペプチドであって：

(a) 配列番号 2 の 1 0 2 番目に対応するアミノ酸がグリシン (G) からロイシン (L) に変異する、

(b) 配列番号 2 の 1 2 5 番目に対応するアミノ酸がセリン (S) からアスパラギン酸 (D)、システイン (C)、チロシン (Y)、グルタミン (Q)、グルタミン酸 (E)、スレオニン (T) 又はアスパラギン (N) に変異する、

(c) 配列番号 2 の 1 3 1 番目に対応するアミノ酸がアルギニン (R) からアスパラギン酸 (D)、スレオニン (T)、グルタミン酸 (E) 又はセリン (S) に変異する、

(d) 配列番号 2 の 1 6 1 番目に対応するアミノ酸がアスパラギン酸 (D) からアラニン (A) に変異する、

(e) 配列番号 2 の 1 6 3 番目に対応するアミノ酸がバリン (V) からリジン (K)、アルギニン (R)、セリン (S)、イソロイシン (I) 又はメチオニン (M) に変異する、

(f) 配列番号 2 の 2 6 6 番目に対応するアミノ酸がグルタミン酸 (E) からアラニン (A) に変異する、

(g) 配列番号 2 の 2 6 7 番目に対応するアミノ酸がバリン (V) からロイシン (L)、メチオニン (M) 又はイソロイシン (I) に変異する、

(h) 配列番号 2 の 2 9 7 番目に対応するアミノ酸がアスパラギン (N) からフェニルアラニン (F)、チロシン (Y) 又はリジン (K) に変異する、

(i) 配列番号 2 の 3 0 6 番目に対応するアミノ酸がトリプトファン (W) からメチオニン (M)、セリン (S) 又はスレオニン (T) に変異する、

(j) 配列番号 2 の 3 1 8 番目に対応するアミノ酸がグルタミン (Q) からリジン (K) に変異する、

(k) 配列番号 2 の 3 3 7 番目に対応するアミノ酸がリジン (K) からアスパラギン酸 (D) に変異する、

(l) 配列番号 2 の 3 9 4 番目に対応するアミノ酸がアスパラギン酸 (D) からメチオニン (M) に変異する、

(m) 配列番号 2 の 4 0 2 番目に対応するアミノ酸がセリン (S) からバリン (V)、ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、システイン (C) 又はチロシン (Y) に変異する、

(n) 配列番号 2 の 4 0 3 番目に対応するアミノ酸がチロシン (Y) からトリプトファン (W)、スレオニン (T)、イソロイシン (I) 又はフェニルアラニン (F) に変異する。

【 0 0 5 5 】

(7) 前記ポリペプチドは、テルモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*)、サーモトガ・ネアポリタナ (*Thermotoga neapolitana*)、*Thermotoga* sp、サーモトガカルディフォンティス (*Thermotoga caldifontis*)、シュードサーモトガ・レティンガエ (*Pseudothermotoga lettingae*)、ハラナエロビウムコンゴレンス (*Halanae*

10

20

30

40

50

robium congolense）、サーモセディミバクターリトリペルエンシス (*Thermosediminibacter litoriperuensis*)、*Rhodothermus marinus*、*Gracilibacillus timonensis*、*Thermotoga bacterium*、*Thermotoga bacterium*、*Candidatus Acetothermia bacterium*、*Pseudothermotoga thermarum*、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*、*Thermophilum adornatus*、*Thermoanaerobacter italicus*、*Thermotoga naphthophila*、*Thermoclostridium stercorarium*、*Dictyoglomus thermophilum*、*Spirochaeta thermophila*、*Singulisphaera acidiphila*、*Thermotoga caldifontis*、*Pseudothermotoga lettingae*、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、*Geobacillus zalihae*、*Geobacillus stearothermophilus*、*Parageobacillus thermoglucosidasius*、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 又は大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来する、(1)～(6)のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0056】

(8) 前記ポリペプチドは、配列番号 2 - 32 で示されるポリペプチドの N 末端又は中部又は C 末端に 1 個又は 1 個以上のアミノ酸残基が欠失したものを含む、(1) に記載のポリペプチド。

【0057】

(9) 前記ポリペプチドは、以下からなる群から選択される：

(i) 配列番号 2 で示されるポリペプチドの N 末端に対応する位置から、1～100 個のアミノ酸、好ましくは 1～90 個のアミノ酸、より好ましくは 1～86 個、より好ましくは 1～50 個、より好ましくは 1～30 個、最も好ましくは 1～10 個のアミノ酸の欠失によって形成され、且つ D - キシルロースの L - リブロースへの変換を触媒する活性を有する、又は

(ii) 配列番号 2 で示されるポリペプチドの 196 - 236 番目に対応するアミノ酸において、1～41 個のアミノ酸、好ましくは 1～30 個、より好ましくは 1～20 個、最も好ましくは 1～10 個のアミノ酸の欠失によって形成され、且つ D - キシルロースの L - リブロースへの変換を触媒する活性を有する、(8) に記載のポリペプチド。

【0058】

(10) 前記ポリペプチドは、以下からなる群から選択される：

(i) 配列番号 2 で示されるポリペプチドの 1～86 番目に対応するアミノ酸が欠失しており、且つ D - キシルロースの L - リブロースへの変換を触媒する活性を有する、

(ii) 配列番号 2 で示されるポリペプチドの 196 - 236 番目に対応するアミノ酸が欠失しており、且つ D - キシルロースの L - リブロースへの変換を触媒する活性を有する、又は

(iii) 配列番号 2 で示されるポリペプチドの 1～86 番目のアミノ酸及び 196 - 236 番目に対応するアミノ酸が欠失しており、且つ D - キシルロースの L - リブロースへの変換を触媒する活性を有する、(8)～(9)のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0059】

(11) 前記ポリペプチドは、配列番号 33～122 で示される配列に対して少なくとも 96% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる；任意に、前記ポリペプチドは、配列番号 33 - 122 によってコードされるポリペプチドのいずれかに対して少なくとも 98.3%、少なくとも 98.5%、少なくとも 98.7%、少なくとも 98.9%、少なくとも 99.1%、少なくとも 99.3%、少なくとも 99.5%、少なくとも 99.7% 又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又はそ

10

20

30

40

50

れからなる、(1)～(10)のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0060】

(12) 前記ポリペプチドと配列番号2で示されるポリペプチドと比較して、D - キシルロース4 - エピメラーゼ活性が向上している、(1)～(11)のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0061】

(13) 前記ポリペプチドは、配列番号33 - 122で示される配列を含む配列によってコードされる、或いは、前記ポリペプチドは、配列番号33 - 122で示される配列によってコードされるポリペプチドである、(1)～(12)のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

【0062】

(14) ポリヌクレオチドは、(1)～(13)のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【0063】

(15) 配列番号2 - 32のいずれかで示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列には、少なくとも1個の変異を含む；好ましく、前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号33 - 122のいずれかで示されるアミノ酸配列をコードする、(14)に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【0064】

(16) 発現宿主におけるポリペプチドの産生を制御する制御配列の1個又は複数個に作動可能に連結される、(14)又は(15)に記載のポリヌクレオチドを含む、核酸コンストラクト。

20

【0065】

(17) (16)に記載の核酸コンストラクトを含む組み換え発現ベクター。

【0066】

(18) (16)に記載の核酸コンストラクト又は(17)に記載の組み換え発現ベクターを含む組み換え宿主細胞。

【0067】

(19) (1)～(13)のいずれか一項に記載のポリペプチドを産生する方法であって、

30

前記方法は以下の工程(a)を含む；

(a) ポリペプチドの産生に資する条件下で細胞又は菌株を培養する工程；

そのうち、前記細胞又は菌株は、前記ポリペプチドを産生し、前記細胞又は菌株は、(16)に記載の核酸コンストラクト又は(17)に記載の組み換え発現ベクターを含み、前記核酸コンストラクト又は前記組み換え発現ベクターは前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む；

任意に、さらに以下の工程(b)を含む；

(b) 前記ポリペプチドを精製又は回収する、

前記方法。

【0068】

40

(20) (1)～(13)のいずれか一項に記載のポリペプチドを用いて触媒反応を行うことを含む、D - キシルロースをL - リブロースに変換する方法。

【0069】

(21) 前記ポリペプチドは配列番号2 - 122のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む配列によってコードされる、或いは、前記ポリペプチドは配列番号2 - 122のいずれか一つで示される配列によってコードされるポリペプチドである、(20)に記載の方法。

【0070】

(22) 以下の工程を含む、L - ペントースを調製する方法であって、

(a) D - キシルロース4 - エピメラーゼを用いて、D - キシルロースをL - リブロー

50

スに変換する、

任意に、さらに以下の工程を含む：

(b) D - キシロースイソメラーゼを用いて、D - キシロースをD - キシルロースに変換する、前記方法。

【0071】

(23) 前記方法は、さらにL - アラビノースイソメラーゼを用いて、L - リブロースをL - アラビノースに変換することを含み、前記L - ペントースはL - アラビノースである、(22)に記載の方法。

【0072】

(24) 前記方法は、さらにL - リボースイソメラーゼ又はマンノース6 - ホスホイソメラーゼ又はそれらの組み合わせを用いて、L - リブロースをL - リボースに変換することを含み、前記L - ペントースはL - リボースである、(22)に記載の方法。

10

【0073】

(25) 前記方法は、さらにL - リブロース3 - エピメラーゼを用いて、L - リブロースをL - キシルロースに変換することを含み、前記L - ペントースはL - キシルロースである、(22)に記載の方法。

【0074】

(26) 前記方法は、さらにL - リブロース3 - エピメラーゼを用いて、L - リブロースをL - キシルロースに変換し、L - フコースイソメラーゼ又はD - アラビノースイソメラーゼ又はL - ラムノースイソメラーゼを用いて、L - キシルロース又はL - キシルロースとL - リブロースとの組合せをL - キシロースに変換することを含み、前記L - ペントースはL - キシロースである、(22)に記載の方法。

20

【0075】

(27) 前記方法は、さらにL - リブロース3 - エピメラーゼを用いて、L - リブロースをL - キシルロースに変換し、L - ラムノースイソメラーゼを用いてL - キシルロースをL - キシロースに変換することを含み、前記L - ペントースはL - リキソースである、(22)に記載の方法。

【0076】

(28) 前記D - キシルロース4 - エピメラーゼは(1) ~ (13)のいずれか一項に記載のポリペプチドから選択される；好ましくは、前記D - キシルロース4 - エピメラーゼは配列番号2 - 122のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む配列によってコードされる、或いは、前記酵素は、配列番号2 - 122のいずれか一つで示される配列によってコードされる酵素である、(22) ~ (27)のいずれか一項に記載の方法。

30

【0077】

(29) 前記方法は、さらに前記L - ペントースを精製及び/又は分離する工程を含む、(22) ~ (28)のいずれか一項に記載の方法。

【0078】

(30) 前記分離工程は、擬似移動床(SMB)を使用して単離する工程を含む、(29)に記載の方法。

【0079】

(31) 前記方法の反応系には、さらに酵素反応液を含み、好ましくは、前記酵素反応液に金属イオンを含み、より好ましくは、前記金属イオンは、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Bi^{3+} 、 Ag^{+} 、 Li^{+} から選択される1つ以上であってもよい、(22) ~ (30)のいずれか一項に記載の方法。

40

【0080】

(32) 前記反応は、好気性、微好気性又は嫌気性条件下で行う、(22) ~ (31)のいずれか一項に記載の方法。

【0081】

(33) 前記反応は、30 ~ 90 温度下で行い、好ましくは、前記反応は、40

50

～ 80 温度下で行う、(22)～(32)のいずれか一項に記載の方法。

【0082】

(34) 前記反応は、pHが3.0から11.0の範囲で行い、好ましくは、前記反応は、pHが4.0から10.0の範囲で行う、(22)～(33)のいずれか一項に記載の方法。

【0083】

(35) 前記反応は、嫌気性、温度が45～55、pHが8.0、金属イオンが Co^{2+} 又は Mg^{2+} 又は Mn^{2+} 又はそれらの組み合わせの条件下で行う、(22)～(34)のいずれか一項に記載の方法。

【0084】

(36) 前記反応は、インビトロ触媒反応又は全細胞生体触媒反応を含む、(22)～(35)のいずれか一項に記載の方法。

【0085】

(37) 前記反応は、インビトロ触媒反応であり、前記インビトロ触媒反応は、段階的又は同時に行うことができる、(36)に記載の方法。

【0086】

(38) 前記インビトロ触媒反応は、段階的に行う場合、1つの反応容器又は直列の複数の反応容器において実施される、(37)に記載の方法。

【0087】

(39) 前記反応容器は、バッチ供給バイオリアクター、固定化酵素を含む充填床バイオリアクター、酵素又は細胞リサイクルバイオリアクター、膜分離を含むバイオリアクター、及び連続供給バイオリアクターのうちの1つ又は複数から選択されるものである、(38)に記載の方法。

【0088】

(40) 前記インビトロ触媒反応における酵素は、遊離酵素、前記酵素を含む細胞溶解物、前記酵素を含む全細胞、固定化酵素の1つ又は複数の形態で存在する、(22)～(39)のいずれか一項に記載の方法。

【0089】

(41) 前記全細胞生体触媒反応の反応様式は、細胞工場を使用して反応を行うことであり、前記細胞は(16)記載の核酸コンストラクト又は(17)に記載の組み換え発現ベクターを含む、(36)に記載の方法。

【0090】

(42) L-ペントースの調製におけるポリペプチドの使用において、前記ポリペプチドは、(1)～(13)のいずれか一項に記載のポリペプチドから選択される、前記使用。

【0091】

(43) 前記L-ペントースはL-アラビノース、L-リボース、L-リブロース、L-キシロース、L-キシロース及びL-リキソースのうちの1つ又は複数から選択される、(42)に記載の使用。

【0092】

(44) D-キシロース4-エピメラーゼ活性を有する酵素としてのポリペプチドの使用において、前記ポリペプチドは、(1)～(13)のいずれか一項に記載のポリペプチドから選択される、前記使用。

【0093】

発明の効果

一実施形態において、本公開は、D-キシロースとL-リブロースとの相互変換の化学反応を触媒する能力を有する野生型D-キシロース4-エピメラーゼ(Xu4E)及びその変異体を発見した。

【0094】

特定の実施形態において、本公開によって提供されるXu4E変異体は、野生型Xu4Eと比較して、改善された特性、例えば、改善された物理的及び/又は化学的特性を有す

10

20

30

40

50

る。例示的に、特定の実施形態において、X u 4 E 変異体は、野生型 X u 4 E と比較して、酵素活性が増加した。別の特定の実施形態において、X u 4 E 変異体は、野生型 X u 4 E と比較して、反応速率が増加した。別の特定の実施形態において、X u 4 E 変異体は、野生型 X u 4 E と比較して、K_mが減少した。

【0095】

別の実施形態において、本公開は、従来技術の従来の製造方法と比較して、より単純な製造プロセスを有し、L - ペントースの製造コストを低減する、L - ペントースを調製するための新しい方法を発見した。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】図1は、従来技術であるすべてのペントース同士の相互変換に関する I z u m o r i n g 図を示している。

【図2】図2は、D - キシルロース 4 - エピメラーゼ (X u 4 E) によって触媒される D - キシルロース及び L - リブロースの相互変換に関する図を示している。

【図3】図3は、X u 4 E による D - キシルロースを6種類の L - ペントースに変換するための人工多酵素経路を示している。ここで、D - X I : D - キシルロースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 5) 、 L - A I : L - アラビノースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 4) 、 L - R I : L - リボースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . B 3) 、 M P I : ホスホマンノースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 8) 、 D - L I : D - リボースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 1 5) 、 R u 3 E : L - リブロース 3 - エピメラーゼ (E C 5 . 1 . 3 . 3 1) 、 L - F u l : L - フコースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 2 5) 、 D - A I : D - アラビノースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 3) 、 及び L - R a I : L - ラムノースイソメラーゼ (E C 5 . 3 . 1 . 1 4) 。

【図4】図4は、4種類の希少糖の H P L C クロマトグラフィーによる単離結果を示している。ここで、(a) は、B i o - R a d A m i n e x H P X - 8 7 H 水素イオン交換カラムが使用された場合を示す。その分離条件は：カラム温度 6 0 、流動相が 5 m M 硫酸、流量が 0 . 6 m L / m i n である。(b) は、B i o - R a d A m i n e x H P X - 8 7 P 鉛イオン交換カラムが使用された場合を示す。その分離条件は：カラム温度 6 0 、流動相が脱イオン水、流量が 0 . 6 m L / m i n である。(c) は、W a t e r s S u g a r P a k I カルシウムイオン交換カラムが使用された場合を示す。その分離条件は：カラム温度 8 0 、流動相が脱イオン水、流量が 0 . 5 m L / m i n である。(d) は、S h o d e x S u g a r K S - 8 0 1 ナトリウムイオン交換カラムが使用された場合を示す。その分離条件は：カラム温度 7 0 、流動相が脱イオン水、流量が 0 . 5 m L / m i n である。

【図5】図5は、野生型 X u 4 E と、様々な反応条件下での指向性進化によって得られた8つの代表的な X u 4 E 変異体の比活性の比較を示している。

【図6】図6は、野生型 T m X u 4 E に基づく単一アミノ酸残基の変化がその比活性に及ぼす影響を示している。

【図7】図7は、熱処理によって精製された E . c o l i B L 2 1 (D E 3) で発現した3種類の耐熱性酵素 (即ち、D - X I 、 X u 4 E 、 及び L - A I) の S D S - P A G E 分析を示している。T : 全細胞溶解物、S : 上清、H : 熱処理された細胞溶解物。

【図8】図8は、5 0 m M D - キシルロースから L - アラビノースへのワンポットプロセスを示している。L - アラビノースは、1 U / m L X I 及び 1 U / m L A I 、 0 . 2 m M C o ²⁺、1 m M M n ²⁺、1 m g / m L X u 4 E (野生型又は変異体) を含む 1 0 0 m M H E P E S バッファー (p H 8 . 0) で生成された。反応は、5 0 、嫌気性条件下で行う。

【図9】図9は、5 0 0 m M D - キシルロースから L - アラビノースへのワンポットプロセスを示している。反応は、1 0 U / m L X I 及び 1 0 U / m L A I 、 0 . 2 m M C o ²⁺、1 m M M n ²⁺、1 0 m g / m L X u 4 E M 8 7 を含む 1 0 0 m M H E P E S バッファー (p H 8 . 0) で行った。反応は、5 0 、嫌気性条件下で行う。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、L-アラビノースに関する、生物変換及び擬似移動床（SMB）による製造・分離（a）と、高フルクトースコーンシロップ（HFCS）による工業化製造・分離（b）と、の比較を示している。

【図11】図11は、Xu4E触媒による基質（D-キシロース）からの生成物（L-リブロース）のHPLC分離図を示している。ここで、HPLC単離されたピークは、一次質量分析（図12）、及び二次質量分析（図13）で確認された。

【図12】図12は、HPLC単離された基質（D-キシロース）、及び生成物（L-リブロース）ピークの一次質量分析図を示している。

【図13】図13は、HPLC単離された基質（D-キシロース）、及び生成物（L-リブロース）ピークの二次質量分析図を示している。

【図14A】図14A及び図14Bは、異なる物種からのXu4E活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列分析比較の結果を示している。

【図14B】図14A及び図14Bは、異なる物種からのXu4E活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列分析比較の結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【0097】

発明を実施するための形態

定義

本開示の特許請求の範囲及び／又は明細書において、特に断りがない限り、例えば、「1個の／1種類（a, an）」、「前記（said）」又は「前記（the）」などは、対象が単数形及び／又は複数形の両方を含むことが意図される。

【0098】

特許請求の範囲及び明細書で使用される場合、「含む」、「有する」、「包括する」、「所有する」、又は「含有する」という用語は、包括的又は自由形式を意味し、追加の引用されていない参照要素又は方法工程は除外されないことである。

【0099】

本開示で使用される場合、「約」という用語は、数値が、数値を決定するために使用されるデバイス又は方法の誤差の標準偏差を含むことを意味する。実例として、前述の標準偏差は、通常、元の値の20 - 30%の範囲内にある。

【0100】

本開示は、「又は」という用語の定義を代替物及び「及び／又は」としてのみ支持するが、特許請求の範囲における「又は」という用語は、明示的に代替物としてのみ又は代替物間で相互に排他的であると述べられていない限り、「及び／又は」を意味する。

【0101】

本開示で使用される場合、「変換（converting）」という用語は、他の有機又は無機触媒を使用することができるが、主に1つ又は複数のポリペプチド（酵素）によって触媒される1つの分子から別の分子への化学的変換を指す。その収率は、生成物のモル量と基質のモル量との間の比率（単位は%で）を指す。

【0102】

本開示で使用される場合、「単糖」は、加水分解されてより単純な糖を与えることができず、リン酸基又はUDP基などの化学基によって修飾されない任意の糖（例えば、D-グルコース、五炭単糖、D-キシロース、L-アラビノース）を指す。

【0103】

本開示で使用される場合、「ペントース」又は「五炭単糖」という用語は、D-キシロース及びL-アラビノースなど、分子に5つの炭素原子を含む任意の単糖を指す。

【0104】

本開示で使用される場合、「単糖」は、「D-」又は「L-」として標識され得る。前述の2つのシリーズの分割は、比較標準としてのグリセルアルデヒドの構造に基づいており、フィッシャー投影式の最も低い不斉炭素原子の構成に従って決定される。右旋性のグリセルアルデヒドは、フィッシャー投影式の右側にヒドロキシル基を持つ異性体として定

10

20

30

40

50

義され、D - 異性体と呼ばれる。左旋性のグリセルアルデヒドは、左側にヒドロキシル基を持つグリセルアルデヒドとして定義され、L - 異性体と呼ばれる。つまり、単糖のキラル炭素原子がD - グリセルアルデヒドと同じであり、ヒドロキシル基が右端にあり、D - 単糖としてラベル付けされている。単糖のキラル炭素原子がL - グリセルアルデヒドと同じである場合、ヒドロキシル基は左端にあり、L - 単糖としてラベル付けされている。

【0105】

本開示で使用される場合、「4 - エピメラーゼ」という用語は、糖の4番目の炭素でのヒドロキシル基を交換することができる酵素を指す。例示的に、「4 - エピメラーゼ」は、D - タガトース及びD - フルクトースの4番目の炭素でのヒドロキシル基を交換できる酵素、D - キシルロース及びL - リブロースの4番目の炭素でのヒドロキシル基を交換できる酵素、D - グルコース及びD - ガラクトースの4番目の炭素でのヒドロキシル基を交換できる酵素、D - キシロース及びL - アラビノースの4番目の炭素のヒドロキシル基を交換できる酵素である。

10

【0106】

本開示で使用される場合、「ポリペプチド」、「酵素」、「ポリペプチド又は酵素」、「ポリペプチド/酵素」という用語は同じ意味を有し、本開示を通して交換可能である。前記用語は、ペプチド結合を介して多くのアミノ酸で構成されるポリマーを指し、リン酸基やホルミル基などの修飾を含む場合と含まない場合がある。

【0107】

本開示で使用される場合、「D - キシルロース4 - エピメラーゼ」(D - x y l u l o s e 4 - e p i m e r a s e) 及びその略称「X u 4 E」という用語は、D - キシルロースとL - リブロースの相互変換を触媒できるポリペプチド(酵素)を指す。

20

【0108】

本開示で使用される場合の、1つの「酵素活性の単位(U)」は、1分間あたり、酵素反応によって基質から1 μmol の生成物を生成するのに必要な酵素の量として定義される。

【0109】

本開示で使用される場合、「比活性」という用語は、「相対活量」又は「Relative activity」としても表現され、これらは、本開示において同じ意味を有し、交換可能に使用することができる。これは、ポリペプチド(酵素)のミリグラムあたりの酵素活性(U/mg)を指す。

30

【0110】

本開示で使用される場合、2つの核酸又はポリペプチドの比較における「配列同一性」又は「同一性パーセント」という用語は、ヌクレオチド又はアミノ酸残基配列アライメントアルゴリズムを使用して測定される場合、又は目視検査によって測定される場合、最大の対応、それらは同一であるか、同一の配列の特定のパーセンテージを持っている。つまり、ヌクレオチド又はアミノ酸配列の同一性は、以下の比率を使用して定義することができる。この比率は、同一のヌクレオチド又はアミノ酸の数に応じて2つ以上のヌクレオチド又はアミノ酸配列を最大に比較し、必要に応じてギャップを追加して、整列時に同じ数のヌクレオチド又はアミノ酸を達成する方法であり、整列部分のヌクレオチド又はアミノ酸の総数の比率である。

40

【0111】

本開示で使用されるように、2つ以上のポリヌクレオチド又はポリペプチド間の配列同一性は、以下の方法によって測定され得る：ポリヌクレオチド又はポリペプチドのヌクレオチド又はアミノ酸配列を整列させ、同じヌクレオチド又はアミノ酸残基を含む整列したポリヌクレオチド又はポリペプチドの位置の数をスコアリングし、整列したポリヌクレオチド又はポリペプチドの位置の数と比較する異なるヌクレオチド又はアミノ酸残基が比較される。ポリヌクレオチドは、例えば、異なるヌクレオチドを含むか、又は欠落したヌクレオチドによって、ある位置で異なる可能性がある。ポリペプチドは、例えば、異なるアミノ酸を含むか、又は欠落しているアミノ酸によって、1つの位置で異なる可能性がある

50

。配列同一性は、同じヌクレオチド又はアミノ酸残基を含む位置の数を、ポリヌクレオチド又はポリペプチド中のアミノ酸残基の総数で割ることによって計算することができる。例えば、同一性パーセントは、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基を含む位置の数を、ポリヌクレオチド又はポリペプチド中のヌクレオチド又はアミノ酸残基の総数で割って、100を掛けることによって計算することができる。

【0112】

例示的に、本開示において、2つ以上の配列又は部分配列は、配列アライメントアルゴリズムを使用して最大の対応のために比較及び整列された場合、又は目視検査「配列同一性」又は「同一性パーセント」によって測定された場合、少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%のヌクレオチド又はアミノ酸残基が「配列同一性」又は「同一性パーセント」を有する。「配列同一性」又は「同一性パーセント」の決定/計算は、配列の任意の適切な領域に基づくことができる。例えば、長さに関して、少なくとも約50残基の長さの領域、少なくとも約100残基の領域、少なくとも約200残基の領域、少なくとも約400残基の領域、又は少なくとも約500残基の領域である。ある特定の実施形態において、配列は、比較される生体高分子（即ち、核酸又はポリペプチド）のいずれか又は両方の全長にわたって実質的に同一である。

【0113】

本開示で使用されるように、異なる配列のヌクレオチド又はアミノ酸の番号付けは、ヌクレオチド又はアミノ酸残基配列比較アルゴリズムを使用して、又は目視検査によって測定されたときの最大の対応に基づいて比較される。それは、「配列同一性」又は「パーセント同一性」をさらに判断する場合、基準ヌクレオチド又は基準アミノ酸と比較した標的ヌクレオチド又は標的アミノ酸の番号付けである。例示的に、本開示において、「配列番号5で示される配列は、配列番号2で示される配列に従って番号が付けられる」とは、配列番号5（標的アミノ酸に相当）で示される配列及び配列番号2（参照アミノ酸に相当）で示される配列が「配列同一性」又は「パーセント同一性」について判断される場合や、配列番号5で示される配列が、最大の対応を有する配列番号2で示される配列と比較又は整列される場合、配列番号2で示される配列に対応する番号、即ち、配列番号5に示されている配列の番号を意味する。

【0114】

本開示で使用される場合、「アミノ酸変異」又は「ヌクレオチド変異」という用語は、「1つ又は複数のアミノ酸又はヌクレオチドの置換、複製、欠失又は付加」を含む。本開示において、「変異」という用語は、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の変化を指す。特定の実施形態において、「変異」という用語は「置換」を指す。

【0115】

一実施形態において、本開示の「変異」は、「保存的変異」から選択され得る。本開示において、「保存的変異」という用語は、通常、タンパク質の機能を維持する変異を指す。保存的変異の代表的な例は、保存的置換である。

【0116】

本開示で使用される場合、「保存的置換」という用語は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換に関する。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されており、且つアルカリ性側鎖（例えば、リジン、アルギニン及びヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、及びシステイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン及びトリプトファン）、 γ -分岐鎖（例えば、スレオニン、バリン及びイソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン及びヒスチジン）が含まれる。

【0117】

本開示で使用される場合、「保存的置換」は、通常、タンパク質の1つ又は複数の部位

10

20

30

40

50

で1つのアミノ酸を交換している。そのような置換は保守的である可能性がある。具体的には、保存的置換と見なされる置換には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及びValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、保存的変異には、遺伝子が由来する個体差、株、及び種の違いに起因する自然発生の変異も含まれる。

10

【0118】

本開示で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドから構成されるポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、個々のフラグメントの形態であり得るか、又は数又は濃度において少なくとも1回単離されたヌクレオチド配列に由来するより大きなヌクレオチド配列構造の一部であり得る。配列及びそれらの構成要素であるヌクレオチド配列は、標準的な分子生物学的方法（例えば、クローニングベクターを使用する）によって同定、操作、及び回収することができる。ヌクレオチド配列がDNA配列（即ち、A、T、G、C）で表される場合、これには、「U」が「T」に置き換わるRNA配列（即ち、A、U、G、C）も含まれる。言い換えれば、「ポリヌクレオチド」は、他のヌクレオチド（個々のフラグメント又はフラグメント全体）から除去されたヌクレオチドのポリマーを指し、又は発現ベクター又はポリシストロン配列などのより大きなヌクレオチド構造の構成成分又は成分であり得る。ポリヌクレオチドには、DNA、RNA、cDNA配列が含まれる。「組換えポリヌクレオチド」は「ポリヌクレオチド」の一種である。

20

【0119】

本開示で使用される場合、「組換えポリヌクレオチド」という用語は、自然界と一緒に連結されていない配列を持つポリヌクレオチドを指す。組換えポリヌクレオチドは適切なベクターに含まれ得、そしてベクターは適切な宿主細胞への形質転換に使用され得る。組換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」と呼ばれる。次に、ポリヌクレオチドは、組換え宿主細胞で発現されて、例えば、「組換えポリペプチド」を産生する。

30

【0120】

本開示で使用される場合、「発現」という用語は、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含むが、これらに限定されない；ポリペプチドの産生に関する任意のステップを含む。

【0121】

本開示で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ポリペプチドをコードし、その発現のために制御配列に作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む線状又は環状DNA分子を指す。

40

【0122】

本開示で使用される場合、「組み換え発現ベクター」という用語は、例えば、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現するために使用されるDNAコンストラクトを指す。組換え発現ベクターは、例えば、i) プロモーター及びエンハンサーなどの、遺伝子発現に対して調節効果を有する遺伝子要素のコレクション；ii) mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される構造又はコード配列；及びiii) 適切な転写及び翻訳の開始及び終結配列を有する転写サブユニット；を含むことができる。組換え発現ベクタ

50

ーは、任意の適切な方法で構築される。ベクターの性質は重要ではなく、プラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾンなど、あらゆるベクターを使用できる。本開示で使用するベクターには、細菌プラスミド、ファージDNA、酵母プラスミドなどの染色体、非染色体、及び合成DNA配列が含まれるが、これらに限定されない。例としては、細菌プラスミド、ファージDNA、酵母プラスミド、及びプラスミドとファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ワクチン、アデノウイルス、鶏痘、バキュロウイルス、SV40、及び偽狂犬病などのウイルスに由来するDNAがある。

【0123】

本開示で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、コード配列の発現を指示するように、調節配列がポリヌクレオチドのコード配列に対して所定の位置に配置される構成を指す。例示的に、調節配列は、プロモーター及び/又はエンハンサーによってコードされる配列から選択され得る。

10

【0124】

本開示で使用される場合、「核酸コンストラクト」という用語は、適切な調節配列に作動可能に連結されたポリペプチド又はドメイン又はモジュールをコードするポリヌクレオチドを含む。調節配列は、選択した細胞又は株でのポリヌクレオチドの発現に必要である。

【0125】

本開示で使用される場合、「内因性」という用語は、生物又は細胞内で自然に発現又は産生されるポリヌクレオチド、ポリペプチド、又は他の化合物を指す。つまり、内因性ポリヌクレオチド、ポリペプチド又は他の化合物は外因性ではない。例えば、「内因性」ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、それが最初に自然から単離されたときに細胞内に存在する。

20

【0126】

本開示で使用される場合、「外因性」という用語は、発現が望まれる特定の細胞又は生物において自然に見出されるか又は発現される任意のポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。外因性ポリヌクレオチド、ポリペプチド又は他の化合物は内因性ではない。

【0127】

本開示で使用される場合、「野生型」という用語は、自然界に見出される可能性のある物体を指す。例えば、生物に存在し、自然界の供給源から単離することができ、実験室で人間によって意図的に改変されていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、自然に発生している。本開示で使用されるように、「天然に存在する」及び「野生型」は同義語である。

30

【0128】

本開示で使用される場合、「変異体」という用語は、「野生型」又は「比較基準」ポリヌクレオチド又はポリペプチドヌクレオチド又はポリペプチドに対して1つ又は複数(例えば、いくつか)の位置に変化(即ち、置換、挿入及び/又は欠失)を含むポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。ここで、置換とは、ある位置を占めるヌクレオチド又はアミノ酸を別のヌクレオチド又はアミノ酸で置き換えることを指す。欠失とは、位置を占めるヌクレオチド又はアミノ酸の除去を指す。挿入とは、その位置を占めるヌクレオチド又はアミノ酸に隣接し、その直後にヌクレオチド又はアミノ酸を付加することを指す。例示的に、本開示における「変異体」は、D-キシルロース4-エピメラーゼ(Xu4E)活性を依然として有するポリペプチドである。

40

【0129】

本開示で使用されるように、「過剰発現された」組換え遺伝子は、微生物において対応する天然に存在する遺伝子よりも多くのRNA及び/又はタンパク質を産生する。RNA及びタンパク質の量を測定するための方法は、当技術分野で知られている。過剰発現は、酵素活性などのタンパク質活性を測定することによっても決定できる。本開示の実施形態によれば、「過剰発現」は、少なくとも3%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、又は少なくとも50%以上の量である。過剰発現されたポリヌクレオチドは通常、宿主細胞に固有のポリヌクレオチドであり、その生成物は、

50

宿主細胞で通常生成される量よりも多い量で生成される。例えば、限定されないが、過剰発現は、ポリヌクレオチドをポリヌクレオチドの天然プロモーター以外のプロモーターに作動可能に連結することによって、又はポリヌクレオチドの追加のコピーを宿主細胞に導入することによって達成される。

【0130】

本開示で使用される場合、「フラグメント」という用語は、成熟ポリペプチド又はドメインのアミノ末端及び/又はカルボキシ末端から1つ又は複数(例えば、いくつか)のアミノ酸が欠失しているポリペプチド又は触媒又は炭水化物結合部分を意味する。本開示の技術的な構成において、前記フラグメントは、D-キシロース4-エピメラーゼ(Xu4E)活性を有する。

10

【0131】

本開示で使用される場合、「単離された」という用語は、自然界には見られない形態又は環境の物質を意味する。単離された物質の非限定的な例には、(1)天然に存在しないあらゆる物質；(2)酵素、変異体、核酸、タンパク質、ペプチド、又は補因子を含むがこれらに限定されない物質、この物質は、本質的に関連している1つ又は複数又はすべての天然成分から少なくとも部分的に除去される；(3)自然界に存在する物質と比較して人工的に改変された物質；或いは、(4)自然に関連する他の成分と比較して物質の量を増やすことによって変更された物質(例えば、宿主細胞での組換えプロセス、物質をコードする遺伝子の複数のコピー、及び物質をコードする遺伝子に自然に関連するプロモーターよりも強力なプロモーターの使用)が含まれる。分離された物質は、発酵プロセスサンプルに存在する可能性がある。例えば、宿主細胞は、本開示のポリペプチドを発現するように遺伝子改変することができる。宿主細胞からの発酵プロセスは、単離されたポリペプチドを含む。分離された物質は、生体内変化液のサンプルに存在する可能性がある。例えば、標的生成物であるL-アラビノースは、酵素的に触媒された多糖類混合液体から分離することができる。

20

【0132】

本開示で使用される場合、「高ストリンジェンシー条件」という用語は、少なくとも100ヌクレオチドの長さのプロープについては、標準的なサザンブロッティング手順に従い、42で5X SSPE(生理食塩水リン酸ナトリウムEDTA)、0.3% SDS、200マイクログラム/mlの剪断及び変性サーモン精子DNA及び50%ホルムアミド中で12~24時間プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションを行ったということを指す。最後に、担体材料を、2X SSC、0.2% SDSを使用して65で15分間3回洗浄した。

30

【0133】

本開示で使用される場合、「非常に高ストリンジェンシー条件」という用語は、少なくとも100ヌクレオチドの長さのプロープについては、標準的なサザンブロッティング手順に従い、42で5X SSPE(生理食塩水リン酸ナトリウムEDTA)、0.3% SDS、200マイクログラム/mlの剪断及び変性サーモン精子DNA及び50%ホルムアミド中で12~24時間プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションを行ったということを指す。最後に、担体材料を、2X SSC、0.2% SDSを使用して70で15分間3回洗浄した。

40

【0134】

本開示で使用される場合、「遊離酵素」という用語は、生物を含まない酵素を指す。本開示の遊離酵素は、それらが発現される細胞の溶解後、部分的又は高度に精製された後、溶液中に懸濁され得る。それは、可溶性であるか、又は不溶性マトリックスに結合され得る。

【0135】

本開示で使用される場合、「固定化酵素」という用語は、特定の空間範囲内で触媒的に作用し、繰り返しかつ連続的に使用することができる酵素を指す。酵素触媒反応は通常水溶液中で行われ、固定化酵素は水溶性酵素を物理的又は化学的方法で処理して水に不溶性

50

になるが、それでも酵素活性を有するものである。

【0136】

本開示で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本開示のポリヌクレオチドを含む核酸構築物又は発現ベクターによる形質転換、トランスフェクション、形質導入などに適した任意の細胞型を意味する。「宿主細胞」という用語は、複製中に起こる変異のために親細胞とは異なる親細胞の任意の子孫を包含する。

【0137】

本開示で使用される場合、「全細胞微生物」という用語は、それらの細胞膜を完全に溶解していない全細胞を指す。前記酵素を含む全細胞微生物を直接使用するか、安定性とリサイクル性のために固定化するか、又は全細胞を透過処理して反応速度を速くすることができる。

10

【0138】

本開示で使用される場合、「触媒反応」という用語は、触媒の作用下で起こる化学反応を指す。触媒は特定の反応を選択的に加速することしかできず、化学反応を熱力学的に可能ないくつかの方向の1つに進行させる可能性がある。触媒と反応物が同じ相にある場合、均一系触媒反応 (Homogeneous Catalytic Reaction) と呼ばれ、異なる相にある場合、不均一系触媒反応 (Heterogeneous Catalytic Reaction) と呼ばれる。生物学的触媒 - 酵素が関与する反応は、酵素触媒反応 (Enzymic Catalytic Reaction) と呼ばれる。

【0139】

20

特定の実施形態において、前記触媒反応は、インビトロで酵素又は複数の酵素によって触媒され得、前述の触媒反応は、「酵素触媒反応」とも呼ばれ得、これは、酵素を使用する化学変換のプロセスを指す。触媒として、この反応プロセスは生物変換 (biotransformation) 又は生物触媒 (biocatalysis) と呼ばれる。

【0140】

別の特定の実施形態において、前記触媒反応は、インビボ/細胞内で実施することができ、前述の触媒反応は、「細胞内触媒反応」と呼ばれることもある。

【0141】

本開示で使用される場合、「細胞内触媒反応」という用語は、「全細胞生体触媒反応」と呼ばれることもあり、無傷の生物 (即ち、細胞全体、組織、さらには個体) を触媒として利用する化学変換のプロセスを指す。全細胞生体触媒反応で一般的に使用される有機触媒は主に微生物であり、これは本質的に、1つ又は複数の微生物細胞内の1つ又は複数の酵素によって触媒される。動物細胞、植物細胞、さらには生物学的個体を使用する生体内変化法も開発されている。全細胞生体内変化の一般的に使用される方法には、反応面への細胞の固定化、ミクロスフェアの懸濁、及び多孔性固相担体が含まれる。

30

【0142】

本開示で使用される場合、「発酵生成物」という用語は、細胞発酵によって生成され、回収及び/又は精製が全く又は最小限に抑えられる調製物を指す。発酵生成物は、発酵の終わりに得られる発酵材料の未分画又は分画された内容物を含み得る。典型的には、発酵生成物は分画されておらず、例えば、遠心分離による微生物細胞 (例えば、糸状菌細胞) の除去後に存在する使用済み培地及び細胞破片を含む。いくつかの実施形態において、発酵生成物は、使用済み細胞培養培地、細胞外酵素、及び生存可能及び/又は生存不能な微生物細胞を含む。

40

【0143】

本開示で使用される場合、「生体触媒生成物」という用語は、回収及び/又は精製が全く又は最小限に抑えられる生体触媒 (ポリペプチド又は酵素又は全細胞) によって生体触媒される調製物を指す。生体触媒作用は、金属イオンを含む生体触媒による水性緩衝液中で実施される。いくつかの実施形態において、生体触媒には、反応のための遊離酵素、前記酵素を含む細胞溶解物、前記酵素を含む全細胞生物、前記酵素を固定化及び架橋する凝集体を含む。

50

【 0 1 4 4 】

本開示で使用される場合、「バイオリアクター」という用語は、生物（例えば、微生物）が保有する酵素又は生物学的機能を利用して生体内変化反応を実行する装置システムである。それは、発酵槽、固定化酵素、固定化細胞リアクターなどの生体機能シミュレーターである。

【 0 1 4 5 】

特に定義されていない限り、又は文脈によって明確に示されていない限り、本開示で用いられるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【 0 1 4 6 】

D - キシルロース 4 - エピメラーゼ及び変異体

一実施形態において、D - キシルロースとL - リブロースの相互変換を可能にする、これまでに報告されたことのないペントース 4 - エピメラーゼを発見した。D - キシルロース 4 - エピメラーゼ（X u 4 E）と名付けた（図 2）。

【 0 1 4 7 】

特定の実施形態において、本発明者らは、2つの酵素ファミリーからのいくつかの酵素においてX u 4 E様酵素活性：タガチュロネート（tagaturonate）3 - エピメラーゼ（E C 5 . 1 . 2 . 7）及びL - リブロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ（E C 5 . 1 . 3 . 4）を初めて発見した。

【 0 1 4 8 】

別の実施形態において、野生型X u 4 Eを使用してx u 4 eのDNA変異体のライブラリーを作成し、それから物理化学的特性が変化したX u 4 E変異体を同定した。

【 0 1 4 9 】

例示的に、特定の実施形態において、X u 4 E変異体は、野生型X u 4 Eと比較して、比活性が増加した。別の特定の実施形態において、X u 4 E変異体は、野生型X u 4 Eと比較して、反応速率が増加した。別の特定の実施形態において、X u 4 E変異体は、野生型X u 4 Eと比較して、K_mが減少した。

【 0 1 5 0 】

L - ペントース生産のための人工酵素経路

補酵素NAD（P）が必要ではない、X u 4 EによりD - キシロースを6つのL - ペントースに変換するための人工多酵素触媒経路を設計した（表 2）。X u 4 Eとその変異体に用いて、人工的な多酵素触媒経路を設計し、4 - エピメラーゼ、3 - エピメラーゼ及びアルドースイソメラーゼによって（図 3 及び表 2）、D - キシロースから6つのL - ペントース（即ち、L - アラビノース、L - リボース、L - リブロース、L - キシロース、L - リキソース及びL - キシルロース）が調製された。これらの人工多酵素経路は、高価な2つのNAD（P）依存性オキシドレダクターゼ（即ち、アルドースレダクターゼとポリオールデヒドロゲナーゼ）を必要としない。

【 0 1 5 1 】

例示的に、本開示で示されるL - ペントースの製造において、図 1 で示されるキシリトール又はリビトールを通る経路は必要とされない。

【 0 1 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. Xu4EによるD-キシロースからL-ペントースを生成するための人工多酵素触媒経路

産物	経路番号	使用される酵素、ここで、D-キシロース 4-エピメラーゼ (Xu4E) またはその異性体は、常に含まれているため省略されている
L-アラビノース	1	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) (Bhosale, Rao et al. 1996), L-アラビノース イソメラーゼ (EC 5.3.1.4) (Izumori, Ueda et al. 1978)
L-リボース	2	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) (Bhosale, Rao et al. 1996), L-リボースイソメラーゼ (EC 5.3.1. B3) (Izumori, Sugimoto et al. 1980)
	3	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5), ホスホマンノースイソメラーゼ (EC 5.3.1.8) (Kim, Seo et al. 2014)
L-リブロー	4	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) (Bhosale, Rao et al. 1996)
L-キシロ	5	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5), L-リブロー 3-エピメラーゼ (EC 5.1.3.31) (Uechi, Takata et al. 2013)
L-キシロ	6	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5), L-リブロー 3-エピメラーゼ (EC 5.1.3.31), L-フコースイソメラーゼ (EC 5.3.1.25) (Mortlock 1966)
	7	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5), L-リブロー 3-エピメラーゼ (EC 5.1.3.31), D-アラビノースイソメラーゼ (EC 5.3.1.3) (Mortlock 1966)
	8	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5), L-リブロー 3-エピメラーゼ (EC 5.1.3.31), L-ラムノースイソメラーゼ (EC 5.3.1.14) (Park, Yeom et al. 2010, Kim, Shin et al. 2013)
L-リキソ	9	D-キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5), L-リブロー 3-エピメラーゼ (EC 5.1.3.31), L-ラムノースイソメラーゼ (EC 5.3.1.14) (Park, Yeom et al. 2010, Kim, Shin et al. 2013)

【0153】

酵素及び/又はそれらの変異体

本開示で開示される新規酵素は、様々な生物において自然に存在する。所望の活性を有する特定の酵素が実施例で使用されているが、他の酵素が同様の活性を有し、使用することができるので、本開示はこれらの酵素に限定されない。例えば、D-キシロースとL-リブローの相互変換を触媒することもできるいくつかの新しいペプチドが発見される可能性がある。本開示に記載されている他の反応は、この実施形態に記載されていない酵素によって触媒することができ、この実施形態にも含まれる。

【0154】

いくつかの特定の実施形態において、例えば、酸性又は塩基性条件下でより活性で安定であるこれらの酵素の変異体を、本開示で使用するすることができる。ポリペプチドのアミノ酸配列変異体には、置換、挿入、又は欠失変異体が含まれ、変異体は、未修飾酵素と実質

的に相同又は実質的に同一であり得る。いくつかの特定の実施形態において、変異体は、酵素の少なくともいくつかの生物学的活性、例えば、触媒活性を保持する。他の変異体には、少なくとも約 10 %、好ましくは少なくとも約 50 %、より好ましくは少なくとも約 75 %、そして最も好ましくは少なくとも約 90 % の生物学的活性を保持する酵素変異体が含まれる。

【0155】

生物に由来するポリペプチド又はポリヌクレオチドは、天然のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列に対する 1 つ又は複数の修飾を含み、天然酵素よりも優れていないとしても同様の活性（例えば、少なくとも 10 %、少なくとも 30 %、少なくとも 50 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 100 %、又は少なくとも 110 %、又はさらに高い酵素活性）を示している。例えば、場合によっては、酵素活性は、親ノ天然に存在する配列の指向性進化によって改善される。あるいは、任意に、コード配列を変異させて、所望の特性を得る。例示的に、「所望の特性」は、より良い熱安定性、増加した反応速度、最適な pH、又は金属補因子の好みなどから選択される。

【0156】

酵素の形

本開示で使用される遊離酵素又は酵素を含む細胞溶解物は水溶性である。通常、固定化酵素を使用するのが最適である。固定化酵素は一般的に、より安定していて耐久性がある。固定化酵素はまた、回収及び複数の触媒サイクルでの使用が容易であり、製造プロセスのコストを削減する。酵素固定化の多くの方法が当技術分野で知られている。酵素はまた、架橋されて架橋酵素凝集体（Cross-linked enzyme aggregate, CLEA）を形成することができ、これは一般により安定であり、回収及び再利用がより容易である。多くの酵素が生物に存在し、希少糖を製造するための生体触媒として機能することができるが、人工微生物で異種発現することもでき、生体触媒として使用することができる。

【0157】

本開示で使用されるリコンビナーゼは、完全な細胞溶解なしに細胞全体に留まることができる。細胞全体には 1 つ又は複数の酵素が含まれている。通常、固定化された全細胞を使用するのが最適です。細胞全体は、有機溶媒処理、化学試薬処理、又は熱処理などの多くの技術によって透過処理することができる。固定化された細胞はまた、複数の触媒サイクルにわたってリサイクル及び再利用が容易であり、これにより製造プロセスのコストを削減する。全細胞透過性及び全細胞固定化の多くの方法が当技術分野で知られている。本開示は、本開示に記載される反応を触媒する全細胞の固定化及び架橋の方法に関する。

【0158】

エラープローンPCR

エラープローンPCRは、DNAポリメラーゼを使用してプロモーター配列を増幅する場合、マグネシウムイオンの濃度向上、マンガンイオンの追加、体系内の 4 つの dNTP の濃度の変更、忠実度の低い DNA ポリメラーゼの使用等反応条件を調整することによって、ターゲット DNA 配列にランダムに変異を導入して、ターゲット配列に対してランダムな変異体を取得する方法である。

【0159】

L-ペントースの製造方法

(1) 製造・分離・精製過程

本開示の方法及び組成物は、様々な従来の発酵又は酵素バイオリアクター（例えば、バッチ、流加、細胞又は酵素のリサイクル及び連続発酵又は連続酵素触媒作用）に適合させることができる。

【0160】

本開示の実施例において、単位時間あたりに形成される生体触媒生成物の量は、一般に、酵素の触媒活性条件（例えば、pH、温度、金属イオン）及び触媒プロセスに存在する酵素の量の関数である。

【0161】

本開示の実施形態において、金属イオンを含む溶液は、1つ又は複数の金属イオンを含み得る。例示的に、前記金属イオンを含む溶液は、 CuCl_2 、 FeCl_3 、 ZnCl_2 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 CoCl_2 、 NiCl_2 又は MnCl_2 を含む溶液から選択され得る。

【0162】

効率的な微生物触媒発酵プロセスの重要なパラメーターのいくつかには、微生物をより大きな細胞密度への成長、所望の生成物の収量の増加、体積生産性の量の増加、望ましくない共代謝物の除去、安価な炭素及び窒素源の利用の改善、発酵槽条件の変化への適応、細菌増殖産生の増加、組換え酵素の合成の増加、酸性条件に対する耐性の増加、アルカリ性条件に対する耐性の増加、有機溶媒に対する耐性の増加、高塩分条件に対する耐性の増加、及び高温又は低温耐性に対する耐性の増加などが含まれる。

10

【0163】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される複数の酵素は、1つ以上の遊離酵素、酵素を含む細胞溶解物、酵素を含む全細胞、固定化酵素として存在し得、生体触媒作用は、ペントース基質を含む反応溶液中で行われ、変換された生成物が反応溶液に形成される。一実施形態において、酵素的に触媒された最終生成物は、当技術分野で知られている任意の適切な方法を使用して、反応溶液から単離することができる。

【0164】

L-ペントースは、多酵素、反応物、反応中間体、及び生体触媒生成物から単離することができ、生体触媒生成物は、当技術分野で知られている様々な方法を使用して、反応物及び反応中間体から回収及び/又は精製することができる。いくつかの実施形態において、生体触媒生成物は、バイオリアクターから回収される。一実施形態では、微生物を破壊し、培養培地又は溶解物を遠心分離して、粒子状の細胞破片を除去し、細胞膜を分離して、L-ペントースの生成を触媒することができる酵素を含む可溶性タンパク質画分をもたらす。L-ペントースの分離及び精製方法には、クロマトグラフィー、擬似移動床クロマトグラフィー、結晶化、イオン性、疎水性及びサイズ排除樹脂に基づく吸着及び放出、濾過、精密濾過、限外濾過、ナノ濾過、遠心分離、抽出、塩又は溶媒による沈殿、乾燥、又はそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。所望の分離は、酵素の除去/回収に限定されず、残りの生成物及び反応物(D-キシロース、D-キシルロース、L-ペントース及び金属イオンを含む)の混合物の一部又はすべての回収も含み、所望の分離は、さらなる精製を必要としない場合がある。D-キシロース、D-キシルロース及びL-リブロースの回収の有無、ならびに酵素の精製、固定化及び回収は、本開示に含まれるさらなる実施形態である。

20

30

【0165】

(2) 改変微生物細胞におけるポリペプチド(酵素)の産生

反応の一部又はすべてを触媒する本開示に記載の酵素は、非天然の、操作された異種生物で発現させることができる。具体的には、経路の酵素をコードする遺伝子を単離し、生産生物を形質転換するために使用される発現ベクターに挿入し、ゲノムに組み込み、酵素を直接発現させることができる。微生物を操作するための方法は、「分子生物学における現代の方法」(Online ISBN: 9780471142720, John Wiley and Sons, Inc.)、「微生物代謝工学：方法及びプロトコル」(Qiong Cheng Ed., Springer)、及び「システム代謝工学：方法及びプロトコル」(Hal S. Alper Ed., Springer)などの出版物で説明されているように、当技術分野で知られている。

40

【0166】

変異体は、挿入、破壊、置換、又は欠失などの当技術分野で周知の方法を使用して、ポリヌクレオチドの発現をアップレギュレート又はダウンレギュレートすることによって構築することができる。例えば、修飾又は不活化されるポリヌクレオチドは、活性に必要なコード領域又はその一部、あるいはコード領域の発現に必要な調節エレメントであり得る

50

。そのような調節又は制御配列の例は、プロモーター配列又はその機能的部分、即ち、ポリヌクレオチドの発現に影響を与えるのに十分な部分であり得る。改変することができる他の制御配列には、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、シグナルペプチド配列、転写ターミネーター、及び転写活性化因子が含まれるが、これらに限定されない。
【0167】

当業者は、操作された微生物細胞を増殖させて酵素を産生することができる。微生物細胞による組換え酵素の生産に関するガイドラインとプロトコルは、「発酵及び生物化学工学ハンドブック：原理、プロセス設計、及び機器」(2nd Edition, Henry C. Vogel and Celeste L. Todaro, Noyes Publications 1997)、「発酵技術の原則」(2nd Edition, P. F. Stanbury et al., Butterworth Heineman, 2003)などの出版物に記載されている。

10

【0168】

(3) 生物学的反応条件

本開示のいくつかの実施形態において、複数の酵素を混合して、D-キシロースなどの原材料又は他の中間体(D-キシロース)をL-ペントースに変換し、L-ペントースを回収することができる人工多酵素経路を形成する。生物学的反応プロセスは、好気性、微小好気性又は嫌気性条件下で実施することができる。本開示の別のいくつかの実施形態において、生体触媒反応は、嫌気性条件下(即ち、検出可能な酸素なしで)で実行される。

【0169】

20

本開示のいくつかの実施形態において、生物学的反応プロセスは、30 ~ 90 の条件下で実施される。本開示のいくつかの実施形態において、生物学的反応プロセスは、40 ~ 80 の条件下で実施される。本開示のいくつかの実施形態において、生物学的反応プロセスは、50 ~ 70 の条件下で実施される。本開示のいくつかの実施形態において、生物学的反応プロセスは、60 ~ 70 の条件下で実施される。

【0170】

プラスミド及び組み換えタンパク質調製

すべての組換えタンパク質の過剰発現は、E. coli BL21(DE3)を使用して実行された。本開示に含まれるすべての組換えタンパク質発現/過剰発現方法は、「分子生物学実験ガイド」に記載されている技術的な構成に従って実施することができる。

30

【0171】

例示的に、対応するタンパク質のコード遺伝子を保有するpETプラスミドは、以下のように調製される。

【0172】

Xu4E酵素活性を有する可能性のあるL-リブロース5-リン酸-4-エピメラーゼ(RP4E)を調製するために、サーマスマリヌス(T. maritima)、大腸菌(E. coli)、バチルス(Bacillus subtilis 168)及びゲオバチルスステアロサーモフィルス(Geobacillus stearothermophilus)のrp4e遺伝子は、対応するゲノムから増幅された。拡張オーバーラップエクステンションPCR(POE-PCR)に基づく単純なクローニング技術(You, C., X. - Z. Zhang and Y. - H. P. Zhang (2012). "Simple Cloning: direct transformation of PCR product (DNA multimer) to Escherichia coli and Bacillus subtilis." Appl. Environ. Microbiol. 78:1593 - 1595.)により、それらをpET20bプラスミドに挿入し、対応するプラスミドpET20b-TmRP4E、pET20b-EcRP4E、pET20b-BsRP4E、及びpET20b-GsRP4Eを構築した。POE-PCRの反応条件は次の通りである。250 ngのpET20bプラスミドバックボーンと等モルの標的遺伝子フラグメント、0.2 mM の様々なdNTP、及び0.02 U/μlのQ5 DNAポリメラーゼ; PCR増幅条件: 98 で1分間、98 で20秒間、60 で20秒間、72

40

50

で72秒間、30サイクル、72 で5分間。

【0173】

Xu4E酵素活性を有する可能性のある野生型D-キシロース4-エピメラーゼ(Xu4E)を調製するために、一对のプライマーF_UxaE(F)とR_UxaE(R)を使用した:

【0174】

F(配列番号123): 5'-GAGATATACCCATATGGTCTTGAAAGTGTTCAAAGACC-3'、

【0175】

R(配列番号124): GGTGGTGGTGGCTCGAGCCCCCTCCAGCAGATCCACGTGCC-3'。

10

【0176】

PCR法により、サーモスポラマリナ(Thermusmarinus)のゲノムからuxaE遺伝子を増幅した。

【0177】

pET28aに基づいて、1対のプライマーF_pET28a(F)とR_pET28a(R)を使用して増幅した:

【0178】

F(配列番号125): 5'-GCTGGAGGGGCTCGAGCACCCACCAACCACCACCACTG-3'、

20

【0179】

R(配列番号126): 5'-CTTTCAAGACCATATGGGTATATCTCCTTCTTAAAG-3'。

【0180】

POE-PCR法により、マルチマープラスミドを増幅して大腸菌TOP10に形質転換し、プラスミドpET28a-tm_UxaEを得た。

【0181】

L-アラビノースイソメラーゼ(L-AI)を調製するために、バチルス・ステアロサーモフィラス(Geobacillusstearothermophilus)に由来するAIのDNA配列をコドン最適化し、Universal Bio(Anhui, China)によって合成して、プラスミドpET20b-BsAIを得た。

30

【0182】

Thermusthermophiles由来の耐熱性キシロースイソメラーゼ(D-XI)をコードするプラスミドpET20b-TtcXIは、参考文献(Wuet al. 2018)から入手した。

【0183】

特に断りのない限り、すべての組換え酵素にはヒスチジン融合タグがあり、ニッケルイオン樹脂を使用したアフィニティー吸着によって精製される。標的タンパク質をコードする遺伝子を保有するpETプラスミドを、大腸菌E.coli BL21細胞を使用して250mlのLB培地で37 の温度で培養した。細胞の吸光度A₆₀₀が約0.6-0.8に達した時、0.1mM IPTGを添加してタンパク質の発現を誘導した。タンパク質の発現は、37 で6時間、又は18 で16時間行った。遠心分離により細胞を回収した後、ペレットを0.1M 塩化ナトリウムと10mM イミダゾールを含む50mM HEPESバッファー(pH7.5)に再懸濁した。超音波処理により細胞膜を破壊し、遠心分離後、酵素を含む上清のサンプルをニッケルイオン樹脂精製カラムにロードした。目的の酵素は、0.1M 塩化ナトリウムと150-500mM イミダゾールを含む50mM HEPESバッファー(pH7.5)を使用して溶出することにより精製した。酵素濃度は、標準品としてウシ血清アルブミンを使用して、Bradford測定法によって決定することができる。組換えタンパク質の発現レベルとタンパク質の純度は、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(SDS-PAGE)を使用して検出さ

40

50

れ、Image Labソフトウェア (Bole、Hercules、CA、USA) のアバンドス分析機能を使用して定量化した。

【0184】

L - アラビノース合成に使用される熱安定性酵素は、*Thermus thermophilus* 由来の D - キシロースイソメラーゼ、*T. maritima* に由来する野生型 Xu4E 及び Xu4E 変異体 M8、及び (*Geobacillus stearothermophilus*) に由来する L - アラビノースイソメラーゼであり、それらは熱処理 (50 ~ 80、10 ~ 60 分) によって精製することができる。細胞溶解物を熱処理して遠心分離し、上記の 3 つの酵素を含む上清を混合する。これは D - キシロースから L - アラビノースへの変換に使用できる。

10

【0185】

スクリーニング用プラスミド pGS - Xu4E 及びスクリーニング用宿主大腸菌 JZ919 の構築

スクリーニング用プラスミド pGS - Xu4E には、P_{BAD} プロモータープロモーターの制御下にある mCherry 遺伝子、在 P_{AraC} プロモーターの制御下にある野生型 araC 遺伝子、及び P_{tac} プロモーターの制御下にある xu4e 遺伝子が含まれる。大腸菌細胞では、Xu4E 陽性変異体が多く L - アラビノースを産生し、これにより大腸菌細胞がより高レベルの mCherry 蛍光タンパク質を発現し、より強い蛍光シグナルが得られた。スクリーニングプラスミドは、標準的な DNA アセンブリ技術を使用して構築された。

20

【0186】

大腸菌 JZ919 (TOP10 xy1B:: araA) をスクリーニング用宿主として構築し、スクリーニング用プラスミド pGS - Xu4E とともに使用した。スクリーニング用プラスミド pGS - Xu4E は、細胞内 L - アラビノース濃度を検出し、mCherry 蛍光シグナルを表示できる遺伝子センサーを搭載している。L - アラビノースを蓄積するために、D - キシロースと L - リブロースの利用に関連する 2 つの遺伝子は大腸菌宿主細胞でノックアウトし、araA 遺伝子は大腸菌ゲノムに挿入した。大腸菌 E. coli Top10 (araABCD) から、ゲノム内の xy1B 遺伝子を araA 遺伝子に置き換え、ノックアウトと挿入を同時に行った。

【0187】

Xu4E 変異体ライブラリーの構築

xu4e 遺伝子の変異ライブラリーは、変異率の低いエラープロード PCR (ep - PCR) を使用して確立された。

30

【0188】

プラスミド pET28a - UxaE を DNA テンプレートとして使用し、プライマーは：MUxaE - IF (配列番号 127) : 5' - CCATATGGTCTTGA - 3'、MUxaE - IR (配列番号 128) : 5' - GGTGGTGCTCGAGCCCC TCCAGCAGATCCACG TGCC - 3' であった。

【0189】

変異体ライブラリーは、PCR 増幅によって得られた。MUxaE - IF は 5' 末端リン酸化プライマーである。MUxaE - IR の 5' 末端の最後の 28 bp 配列は、プラスミドバックボーンの配列と相補的な相補配列である。50 µl の ep - PCR 反応系には、1 ng / µl プラスミド pGS - Xu4E、0.2 mM dATP、0.2 mM dGTP、1 mM dCTP、1 mM dTTP、5 mM MgCl₂、0.05 mM MnCl₂、0.4 µM プライマー (MUxaE - IF 及び MUxaE - IR)、及び 0.05 U / µl NEB Taq ポリメラーゼが含まれる。

40

【0190】

Xu4E 変異体ライブラリーのハイスループットスクリーニング

E. coli JZ919 の化学的コンピテントセルは、従来技術に従って、例えば、「分子生物学実験ガイド」に記載されている方法によって調製することができる。さらに、

50

u x a E 変異体ライブラリーを保有する大腸菌 J Z 9 1 9 細胞を、D - キシロースを含む LB 固形培地で培養した。37 で 12 時間培養した後、4 時間ごとにコロニーの色が観察された。コロニーの蛍光強度を検出するために、目視観察又は紫外線照射によって陽性クローンを選んだ。より強い蛍光強度を示すクローンを選び、D - キシロースを添加した 0 . 5 m l の LB 培地を含む 96 ディープウェルプレートで培養し、37 で 12 時間培養した。Synergy Mx 多機能マイクロプレートリーダー (Bert on、Verm ont、U S A) を使用して、96 ウェルプレートの細胞培養培地からの蛍光シグナルを測定した。蛍光励起スキャンは 589 nm で実行され、発光スキャンは 610 nm で実行された。

【0191】

ポリペプチド / 酵素が Xu 4 E 酵素活性を有するかどうかを判断するための測定方法

D - キシロース / D - キシルロース混合液を用意した。D - キシロース / D - キシルロース混合物は、1 M キシロース、5 m M M g C l₂ 及び 50 m g の固定化 D - X I を含む 1 m l の 50 m M H E P E S バッファー (p H 7 . 5) で調製し、X I は S i g m a - A l d r i c h (G 4 1 6 6) から購入した。70 で一晩反応させた後、固定化された X I を遠心分離により除去した。D - キシロース / D - キシルロース混合物は、約 700 m M のキシロース及び 300 m M のキシルロースを含んでいた。

【0192】

Xu 4 E の酵素活性アッセイは、段階的な酵素活性測定方法を使用して実施された。反応溶液は、70 m M キシロース、30 m M キシルロース、及び 0 . 2 m M C o²⁺又は 2 m M Z n²⁺を含む 50 m M T r i s バッファーでした。特に指定のない限り、Xu 4 E 酵素活性アッセイは 30 ~ 80 で 15 分 ~ 24 時間実施し、酵素タンパク質の溶解度は 0 . 001 ~ 10 g / L であった。Xu 4 E が反応を触媒した後、65 µ L の反応溶液をピペットで取り、35 µ L の 1 . 88 M H C l O₄ と混合し、13 . 5 µ L の 5 M K O H を混合物に加えて中和した。遠心分離して沈殿物を除去した後、10 U / m L (過剰) L - A I と 1 m M M n²⁺を含む 50 m M H E P E S バッファー (p H 7 . 5) で L - リブロースを含む上清を L - アラビノースへの 2 回目の変換反応を行い、酵素反応は 50 で 15 分間行った。L - アラビノース濃度は、メガザイム L - アラビノース / D - ガラクトースアッセイキット (K - A R G A、ブレイ、アイルランド) を使用して決定した。

【0193】

速度論的パラメーターを決定するために、Xu 4 E の酵素活性アッセイを、50 で 0 . 2 m M C o²⁺を含む 50 m M T r i s バッファー (p H 8 . 5) で実施した。D - キシロースと D - キシルロースの合計濃度は 1 . 5 ~ 1000 m M であり、D - キシルロースの濃度は 0 . 5 ~ 300 m M であった。酵素活測定は 50 行う 15 m i n。酵素活性アッセイは 50 で 15 分間行った。D - キシルロースに対する Xu 4 E の見かけ K_m 及び k_{cat} 定数は、ミカエリス式の非線形フィッティングに基づいて Graph P a d P r i s m 5 ソフトウェア (G r a p h p a d S o f t w a r e、I n c .、L o s A n g e l e s、C A、U S A) を使用して計算した。

【0194】

D - キシロースからの L - アラビノースの生産

50 m M D - キシロースからの L - アラビノースの生成は、1 m l の反応系で実施され、反応系は、0 . 2 m M C o²⁺、1 m M M n²⁺、1 g / L Xu 4 E (DNA 配列が配列番号 1 で示される野生型、及びアミノ酸配列が配列番号 40 で示される代表的な変異体 M 8)、1 U / m L D - X I 及び 1 U / m L L - A I を含む 100 m M H E P E S バッファー (p H 8 . 0) であった。L - アラビノースが 500 m M D - キシロースから生成された場合、Xu 4 E の濃度は 10 g / L に増加し、D - X I 及び L - A I の濃度も 10 U / m L に増加した。3 つの酵素を混合した後、反応溶液を 50 で反応させた。L - アラビノースの濃度は、メガザイム L - アラビノース / D - ガラクトースアッセイキット (K - A R G A、ブレイ、アイルランド) を使用して測定し、D - キシロース、D - キシルロース及び L - リブロースの濃度は、示差屈折率検出器を備えた島津高速液体クロマ

10

20

30

40

50

トグラフィーを使用して検出され、Bio-Rad Aminex HPLC HPX-87H 液体カラムを使用して分離された。

【0195】

Xu4EがD-キシロースを使用して製造した産物がL-リブロースであることの確認

野生型又は変異型Xu4Eにより、得られた生成物について、LC-ESI-QTOF-MSにてL-リブロースに確認された。1 mLの反応系には、50 mM Trisバッファ（pH 8.5）、10 mM D-キシロース、0.2 mM Co^{2+} 及び1 g/L Xu4Eが含まれる。反応を50℃で1時間実施し、次に538 μL の HClO_4 を添加することにより反応を停止させた。207 μL の5 M KOHを加えることにより混合物を中和した。不活性化されたタンパク質と沈殿物を遠心分離で除去し、サンプルを島津高速液体クロマトグラフィーで分離し、エレクトロスプレーイオン化（ESI）を備えた四重極飛行時間型タンデム質量分析QTOF（compact QTOF、Bruker、ドイツ）で生成物を検出した。Waters Sugar Pak Iカルシウムイオン交換カラム（300 x 6.5 mm、10 μm 粒子サイズ）をサンプル分離の固定相として使用しました（Waters Co、米国マサチューセッツ州ミルフォード）。移動相は脱イオン水、流量は0.5 mL/minであった。カラム温度は80℃、サンプルローディングは20 μL であった。ESIは負イオンモードを使用した。キャピラリー電圧は4500 V、噴霧器圧力は2 bar、乾燥ヒーターは200℃、乾燥気流は8 L/minであった。

10

【0196】

発酵生成物又は細胞溶解物

20

本開示はまた、本開示のポリペプチドを含む発酵生成物又は細胞溶解物に関する。発酵生成物には、全細胞（目的のポリペプチドを産生するために使用される本開示のポリペプチドをコードする遺伝子を含む宿主細胞を含む）、又は細胞溶解物などの発酵プロセスで使用される他の成分がさらに含まれる。いくつかの実施形態において、該組成物は、前記酵素を含む死滅した全細胞、前記酵素を含む細胞溶解物、及び培地を含む前記酵素を含む細胞死滅した全培養液である。

【0197】

擬似移動床による分離

擬似移動床（SMB）は、液体分離操作に吸着の原理を利用する物質移動装置であり、逆流連続操作モードで実行されている。工業用SMBは、有機酸、アミノ酸、希少糖などの低付加価値の生物学的製品を分離するためにますます使用されている。酵素固定化とSMB分離を組み合わせることで、必要なL-ペントースの製造コストを効果的に削減し、基質の利用効率を向上させることができる。例示的に、SMB樹脂には、Shodex Sugar KS-801ナトリウムイオン交換カラム、Waters Sugar Pak Iカルシウムイオン交換カラム、Bio-Rad Aminex HPX-87P鉛イオン交換カラム又はBio-Rad Aminex HPX-87H水素イオン交換カラムのいずれかが含まれる。或いは、類似の樹脂、又はそれらのシリーズの組み合わせである。

30

【実施例】

【0198】

実施例

40

本開示の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本開示の特定の実施形態を示す一方で、この詳細な説明を読んだ後、様々な変形例及び修正が当業者に明らかになるので、詳細な説明及び特定の例は例示の目的のみ与えられることを理解されたい。

【0199】

実施例で使用されるすべての試薬は、特に断りのない限り、市販されているものである。

【0200】

材料及び方法

【0201】

試薬及び材料

50

【0202】

特に明記されていない限り、すべての薬剤は分析グレード以上であり、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) 又は China Sinopharm Group (上海、中国) から購入した。サーモスポラマリーナ (*Thermotoga maritima*) MSB8 及び *Aquifexaerobicus* のゲノムDNAは、American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) から購入した。大腸菌 TOP10 及び DH5 (ThermoFisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム) をDNA操作及びプラスミド増幅に使用した。組換えタンパク質の発現には、大腸菌 E. coli BL21 (DE3) (Invitrogen Biotech Co., Ltd., Carlsbad, CA, USA) を使用した。

10

【0203】

本開示の技術的な構成において、記載のヌクレオチド及びアミノ酸配列リストの番号によって表される意味は以下の通りである：

【0204】

配列番号1に示されているのは、テルモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*) MSB8 の野生型タガチュロネート (tagaturonate) 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_004081526.1、KEGG ID TM0440) のヌクレオチド配列である。

【0205】

20

配列番号2に示されているのは、テルモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*) MSB8 の野生型タガチュロネート 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_004081526.1、KEGG ID TM0440) のアミノ酸配列である。

【0206】

配列番号3に示されているのは、サーモトガ・ネアポリタナ (*Thermotoga neapolitana*) のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_015918744.1) のアミノ酸配列である。

【0207】

配列番号4に示されているのは、*Thermotoga* sp SG1 のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_101512888.1) のアミノ酸配列である。

30

【0208】

配列番号5に示されているのは、サーモトガカルディフォンティス (*Thermotoga caldifontis*) のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_041077375.1) のアミノ酸配列である。

【0209】

配列番号6に示されているのは、シュードサーモトガ・レティンガエ (*Pseudothermotoga lettingae*) のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_012002872.1) のアミノ酸配列である。

40

【0210】

配列番号7に示されているのは、ハラナエロビウムコンゴレンス (*Halanaerobium congolense*) のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：WP_081374543.1) のアミノ酸配列である。

【0211】

配列番号8に示されているのは、サーモセディミバクターリトリペルエンシス (*Thermosediminibacter litoriperuensis*) の4 - エピメラーゼ遺伝子 (NCBI 参照配列：TYP53248.1) のアミノ酸配列である。

【0212】

配列番号9に示されているのは、*Rhodothermus marinus* の4 - エピ

50

メラゼ遺伝子 (NCBI 参照配列: WP_012844026.1) のアミノ酸配列である。

【0213】

配列番号10に示されているのは、*Gracilibacillus timonensis* の4-エピメラゼ遺伝子 (NCBI 参照配列: WP_066188474.1) のアミノ酸配列である。

【0214】

配列番号11に示されているのは、サーモトガ (*Thermotoga bacterium*) の4-エピメラゼ遺伝子 (NCBI 参照配列: HCZ06146.1) のアミノ酸配列である。

10

【0215】

配列番号12に示されているのは、*Thermotoga bacterium* の4-エピメラゼ遺伝子 (NCBI 参照配列: RKX45454.1) のアミノ酸配列である。

【0216】

配列番号13に示されているのは、*Candidatus Acetothermia bacterium* の4-エピメラゼ遺伝子 (NCBI 参照配列: HAF71394.1) のアミノ酸配列である。

【0217】

配列番号14に示されているのは、*Pseudothermotoga thermarum* の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: Theth_1083) のアミノ酸配列である。

20

【0218】

配列番号15に示されているのは、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM571 の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: Tthe_2391) のアミノ酸配列である。

【0219】

配列番号16に示されているのは、*Thermophilum adornatus* 1505 の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: TCARB_0828) のアミノ酸配列である。

【0220】

30

配列番号17に示されているのは、*Thermoanaerobacter italicus* の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: Thit_1746) のアミノ酸配列である。

【0221】

配列番号18に示されているのは、*Thermotoga naphthophila* の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: Tnap_0222) のアミノ酸配列である。

【0222】

配列番号19に示されているのは、*Thermoclostridium stercorearium* DSM8532 の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: Cst_c08510) のアミノ酸配列である。

40

【0223】

配列番号20に示されているのは、*Dictyoglomus thermophilum* の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: DICTH_1923) のアミノ酸配列である。

【0224】

配列番号21に示されているのは、*Spirochaeta thermophila* DSM6192 の4-エピメラゼ遺伝子 (Kegg ID: STHERM_c04350) のアミノ酸配列である。

【0225】

配列番号22に示されているのは、*Singulisphaera acidiphila*

50

aの4 - エピメラーゼ遺伝子 (K e g g I D : S i n a c _ 2 8 0 6) のアミノ酸配列である。

【 0 2 2 6 】

配列番号 2 3 に示されているのは、T h e r m o t o g a m a r i t i m a M S B 8 的 D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (K e g g I D : T M 0 2 8 3) のアミノ酸配列である。

【 0 2 2 7 】

配列番号 2 4 に示されているのは、サーモトガカルディフォンティス (T h e r m o t o g a c a l d i f o n t i s) 的 D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : W P _ 0 4 1 0 7 7 2 9 1 . 1) のアミノ酸配列である。

10

【 0 2 2 8 】

配列番号 2 5 に示されているのは、T h e r m o t o g a n e a p o l i t a n a D S M 4 3 5 9 的 D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (G e n B a n k : A C M 2 2 5 7 7 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 2 2 9 】

配列番号 2 6 に示されているのは、P s e u d o t h e r m o t o g a l e t t i n g a e の I I アルドラーゼ (G e n B a n k : K U K 2 1 0 9 4 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 2 3 0 】

20

配列番号 2 7 に示されているのは、枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) の D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (K e g g I D : B S U 2 8 7 8 0) のアミノ酸配列である。

【 0 2 3 1 】

配列番号 2 8 に示されているのは、G e o b a c i l l u s z a l i h a e 的 D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : W P _ 0 6 0 7 8 8 4 8 8 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 2 3 2 】

配列番号 2 9 に示されているのは、G e o b a c i l l u s s t e a r o t h e r m o p h i l u s 的 D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (G e n B a n k : K F L 1 5 0 5 2 . 1) のアミノ酸配列である。

30

【 0 2 3 3 】

配列番号 3 0 に示されているのは、P a r a g e o b a c i l l u s t h e r m o g l u c o s i d a s i u s 的 D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : W P _ 0 4 2 3 8 5 6 3 3 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 2 3 4 】

配列番号 3 1 に示されているのは、T h e r m o a n a e r o b a c t e r i u m t h e r m o s a c c h a r o l y t i c u m の D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : W P _ 0 9 4 0 4 3 8 7 8 . 1) のアミノ酸配列である。

40

【 0 2 3 5 】

配列番号 3 2 に示されているのは、大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) K - 1 2 M G 1 6 5 5 の D - キシルロース 5 - リン酸 4 - エピメラーゼ遺伝子 (K e g g I D : b 0 0 6 1) のアミノ酸配列。

【 0 2 3 6 】

配列番号 3 3 ~ 1 2 2 に示されているのは、本発明者らによって構築された変異体である。変異体の特定の変異部位については、本開示の表 3 の説明を参照されたい。

【 0 2 3 7 】

なお、先行技術 (例えば、G e n B a n k) のデータベースに開示された内容によれば

50

、配列番号 3 ~ 32 で示されるアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列もまた、当技術分野の当業者に知られている。

【0238】

実施例 1 . ペントースの分離と検出

【0239】

D - キシロース、D - キシルロース、D - リブロース及び L - アラビノースは、以下の (1) ~ (4) に記載されている方法のいずれかを使用して分離された：

【0240】

(1) Bio - Rad Aminex HPLC HPX - 87H 液相イオン交換カラムを使用して分離した。その分離条件は：カラム温度が 60 、流動相が 5 mM 硫酸、流量が 0.6 mL / min であった。

10

【0241】

(2) Bio - Rad Aminex HPX - 87P 鉛イオン交換カラム、カラム温度が 80 、流動相が脱イオン水、流量が 0.6 mL / min であった。

【0242】

(3) Waters Sugar Pak I カルシウムイオン交換カラム、カラム温度が 80 、流動相が脱イオン水、流量が 0.5 mL / min であった。

【0243】

(4) Shodex Sugar KS - 801 ナトリウムイオン交換カラム、カラム温度が 70 、流動相が脱イオン水、流量が 0.5 mL / min であった。

20

【0244】

上記 (1) ~ (4) の方法で分離した D - キシルロース、D - キシロース、D - リブロース、L - アラビノースの場合、その濃度は、示差屈折率検出器を備えた島津高速液体クロマトグラフィーで検出できる。

【0245】

実験結果：D - キシロース、D - キシルロース、D - リブロース及び L - アラビノースについて、上記 (1) ~ (4) に示した HPLC によるクロマトグラフィー分離の効果を図 4 に示した。その中で、(1) に示す HPLC 分離条件が最も優れた分離効果を示している。

【0246】

30

実施例 2 . L - リブロース - 5 - リン酸 4 - エピメラーゼからの Xu4E 機能を持つ酵素のマイニング

【0247】

基質構造の類似性と類似な酵素触媒メカニズムを考慮して、L - リブロース - 5 - リン酸 4 - エピメラーゼファミリー (RP4E、EC5.1.3.4) から D - キシルロースを L - リブロースに変換する可能性のある Xu4E 酵素を選択した。我々が、枯草菌 (*Bacillus subtilis* 168)、*Geobacillus stearothermophilus*、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サーモスポラマリーナ (*T. maritima*) のそれぞれから 4 つの RP4E をクローニングし、pET プラスミドにクローニングした。発現プラスミドを保有する *E. coli* BL21 (DE3) を増殖させ、組換えタンパク質を発現させた。

40

【0248】

His - tag 付きタンパク質をアフィニティー吸着により精製した後、本開示に記載の「ポリペプチド / 酵素が Xu4E 酵素活性を有するかどうかを判断するための測定方法」により、得られた組換えタンパク質を検出した。試験結果から、サーモスポラマリーナ (*Thermus marinus*)、枯草菌及びバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) に由来する 3 つの RP4E は、ある程度の Xu4E 活性を示し、比活性は約 0.0002 ~ 0.0003 U / mg であったが、*E. coli* 由来の RP4E の比活性は 0.0001 U / mg 未満であった。

【0249】

50

上記の実験結果に基づいて、L - リブロース - 5 - リン酸 4 - エピメラーゼファミリー (R P 4 E、E C 5 . 1 . 3 . 4) を保有する多くの微生物から対応する r p 4 e 遺伝子をクローニングし、それらを p E T プラスミドにクローニングした。前述の発現プラスミドを保有する大腸菌 B L 2 1 (D E 3) を培養し、組換えタンパク質を発現させた。さらに、得られた組換えタンパク質は、本開示に記載の「ポリペプチド / 酵素が X u 4 E 酵素活性を有するかどうかを判断するための測定方法」によって検出された。

【 0 2 5 0 】

前述の実験方法により、X u 4 E 酵素活性を有する天然酵素は、配列番号 2 3 ~ 3 2 で示される配列によってコードされる酵素であることが見出された。

【 0 2 5 1 】

実施例 3 . タガチュロネート 3 - エピメラーゼからの X u 4 E 機能を有する新しい酵素のマイニング

【 0 2 5 2 】

基質構造の類似性と類似な酵素触媒作用メカニズムを考慮して、例 2 と同様の方法を使用して、タガチュロネート 3 - エピメラーゼ (U x a E、E C 5 . 1 . 2 . 7) から D - キシルロースを L - リブロースに変換する機能を持つ可能な新しい酵素を選択した。様々な微生物から複数の u x a e 遺伝子をクローニングし、それらを p E T プラスミドにクローニングした。発現プラスミドを保有する E . c o l i B L 2 1 (D E 3) を増殖させ、組換えタンパク質を発現させた。

【 0 2 5 3 】

H i s - t a g 付きタンパク質をアフィニティー吸着により精製した後、本開示に記載の「ポリペプチド / 酵素が X u 4 E 酵素活性を有するかどうかを判断するための測定方法」により、得られた組換えタンパク質を検出した。試験結果から、サーモスポラマリナ (T h e r m u s m a r i n u s) 由来のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ (T m 0 4 4 0) は、最適化された反応条件なしで、約 0 . 0 1 2 U / m g の比活性を示した。

【 0 2 5 4 】

前述の実験方法により、X u 4 E 酵素活性を有する天然酵素は、配列番号 2 ~ 2 2 で示される配列によってコードされる酵素であることが見出された。

【 0 2 5 5 】

実施例 4 . 活性の増強された X u 4 E 変異体 M 4

【 0 2 5 6 】

指向性進化のための天然酵素として、熱安定性が高く、触媒作用のある無差別活性が高いサーモスポラマリナ (T h e r m u s m a r i n u s) 由来のタガチュロネート 3 - エピメラーゼ (T m X u 4 E) を使用した。ここで、前述の T m X u 4 E のアミノ酸配列は、配列番号 2 で示される配列であり、前述のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 1 で示される配列である。

【 0 2 5 7 】

x u 4 e 変異体のライブラリーを構築するために、変異率が低い (即ち、遺伝子ごとに約 1 つの変異部位を生成する) E r r o r - p r o n e P C R を使用した。プラスミド p G S - X u 4 E に挿入された変異体のライブラリーを宿主大腸菌 J Z 9 1 9 に形質転換し、D - キシルロースを含む L B 培地の固体プレートにプレATINGした。プレート上で約 1 0 , 0 0 0 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 9 6 ウェルプレートに播種し、D - キシルロースを含む L B 培地で培養した。本開示に記載の「X u 4 E 変異体ライブラリーのハイスループットスクリーニング」法を使用して、マイクロプレートリーダーを使用して、マイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出し、陽性変異体を確認した。1 回ごとにいくつかの陽性変異体を選んだ。

【 0 2 5 8 】

スクリーニングされた変異体から、S 1 2 5 D を含む変異体 M 4 を選択した。変異体 M 4 の比活性の検出を行った。M 4 は、天然酵素と比較して比活性が 2 5 % 増加したことが分かった (図 5) 。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 9 】

実施例 5 . 活性を高め続ける X u 4 E 変異体 M 4 7

【 0 2 6 0 】

実施例 4 より選択した変異体 M 2 から、変異率が低い（つまり、遺伝子ごとに約 1 つの変異部位を生成する）E r r o r - p r o n e P C Rを使用して、x u 4 e 変異体のライブラリーを構築した。プラスミド p G S - X u 4 E に挿入された変異体のライブラリーを宿主大腸菌 J Z 9 1 9 に形質転換し、D - キシロースを含む L B 培地の固体プレートに塗布した。プレート上で約 1 0 , 0 0 0 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 9 6 ウェルプレートに播種し、D - キシロースを含む L B 培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

10

【 0 2 6 1 】

スクリーニングで得られた変異体から、2 つのアミノ酸変異 S 1 2 5 D / N 2 9 7 F を含む変異体 M 4 7 を選択した。前述の変異体 M 4 7 の比活性の検出を行った。M 4 7 はより高い比活性を示すことが分かった（図 5 ）。

【 0 2 6 2 】

実施例 6 . 活性を高め続ける X u 4 E 変異体 M 5 7

【 0 2 6 3 】

実施例 5 で選択された変異体 M 4 7 から出発して、低い変異率（即ち、遺伝子あたり約 1 つの変異部位を生成する）で E r r o r - p r o n e P C R を使用して、x u 4 e 変異体のライブラリーを構築した。プラスミド p G S - X u 4 E に挿入された変異体のライブラリーを宿主 E . c o l i J Z 9 1 9 に形質転換し、D - キシロースを含む L B 培地の固体プレートに塗布した。プレート上で約 1 0 , 0 0 0 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 9 6 ウェルプレートに播種し、D - キシロースを含む L B 培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

20

【 0 2 6 4 】

スクリーニングで得られた変異体から、3 つのアミノ酸変異 S 1 2 5 D / V 2 6 7 I / N 2 9 7 F を含む変異体 M 5 7 を選択した。前述の変異体 M 5 7 の比活性の検出を行った。結果として、M 5 7 はより高い比活性を示すことが分かった（図 5 ）。

30

【 0 2 6 5 】

実施例 7 . 活性を高め続ける X u 4 E 変異体 M 6 1

【 0 2 6 6 】

実施例 6 で選択された変異体 M 5 7 から出発して、低い変異率（即ち、遺伝子あたり約 1 つの変異部位を生成する）で E r r o r - p r o n e P C R を使用して、x u 4 e 変異体のライブラリーを構築した。プラスミド p G S - X u 4 E に挿入された変異体のライブラリーを宿主 E . c o l i J Z 9 1 9 に形質転換し、D - キシロースを含む L B 培地の固体プレートに塗布した。プレート上で約 2 0 , 0 0 0 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 9 6 ウェルプレートに播種し、D - キシロースを含む L B 培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

40

【 0 2 6 7 】

スクリーニングで得られた変異体から、4 つのアミノ酸変異 S 1 2 5 D / V 1 6 3 K / V 2 6 7 I / N 2 9 7 F を含む変異体 M 6 1 を選択した。前述の変異体 M 6 1 の比活性の検出を行った。結果として、M 6 1 はより高い比活性を示すことが分かった（図 5 ）。

【 0 2 6 8 】

実施例 8 . 活性を高め続ける X u 4 E 変異体 M 6 4

【 0 2 6 9 】

実施例 7 で選択された変異体 M 6 1 から出発して、低い変異率（即ち、遺伝子あたり約 1 つの変異部位を生成する）で E r r o r - p r o n e P C R を使用して、x u 4 e 変異

50

体のライブラリーを構築した。プラスミド pGS - Xu4E に挿入された変異体のライブラリーを宿主 E. coli JZ919 に形質転換し、D - キシロースを含む LB 培地の固体プレートに塗布した。プレート上で約 15,000 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 96 ディープウェルプレートに播種し、D - キシロースを含む LB 培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

【0270】

スクリーニングで得られた変異体から、5つのアミノ酸変異 S125D / V163K / V267I / N297F / Y403W を含む変異体 M64 を選択した。前述の変異体 M64 の比活性の検出を行った。結果として、M64 はより高い比活性を示すことが分かった (図5)。

10

【0271】

実施例9．活性を高め続ける Xu4E 変異体 M72

【0272】

実施例8で選択された変異体 M64 から出発して、低い変異率 (即ち、遺伝子あたり約1つの変異部位を生成する) で Error-prone PCR を使用して、xu4e 変異体のライブラリーを構築した。プラスミド pGS - Xu4E に挿入された変異体のライブラリーを宿主 E. coli JZ919 に形質転換し、D - キシロースを含む LB 培地の固体プレートに塗布した。プレート上で約 12,000 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 96 ウェルプレートに播種し、D - キシロースを含む LB 培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

20

【0273】

スクリーニングで得られた変異体から、6つのアミノ酸変異 S125D / V163K / V267I / N297F / S402V / Y403W を含む変異体 M72 を選択した。前述の変異体 M72 の比活性の検出を行った。結果として、M72 はより高い比活性を示すことが分かった (図5)。

【0274】

実施例10．活性を高め続ける Xu4E 変異体 M75

【0275】

実施例9で選択された変異体 M72 から出発して、低い変異率 (即ち、遺伝子あたり約1つの変異部位を生成する) で Error-prone PCR を使用して、xu4e 変異体のライブラリーを構築した。プラスミド pGS - Xu4E に挿入された変異体のライブラリーを宿主 E. coli JZ919 に形質転換し、D - キシロースを含む LB 培地の固体プレートに塗布した。プレート上で約 18,000 クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して 96 ウェルプレートに播種し、D - キシロースを含む LB 培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

30

【0276】

スクリーニングで得られた変異体から、7つのアミノ酸変異 S125D / V163K / V267I / N297F / W306M / S402V / Y403W を含む変異体 M75 を選択した。前述の変異体 M75 の比活性の検出を行った。結果として、M75 はより高い比活性を示すことが分かった (図5)。

40

【0277】

実施例11．活性を高め続ける Xu4E 変異体 M87

【0278】

実施例9で選択された変異体 M72 から出発して、低い変異率 (即ち、遺伝子あたり約1~2つの変異部位を生成する) で Error-prone PCR を使用して、xu4e 変異体のライブラリーを構築した。プラスミド pGS - Xu4E に挿入された変異体のライブラリーを宿主 E. coli JZ919 に形質転換し、D - キシロースを含む LB 培地

50

の固体プレートに塗布した。プレート上で約25,000クローンをスクリーニングし、陽性変異体を選択して96ディープウェルプレートに播種し、D-キシロースを含むLB培地で培養した。マイクロプレートリーダーを使用してマイクロプレート内の細胞培養液の蛍光シグナルを検出することにより、陽性変異体を確認した。

【0279】

スクリーニングで得られた変異体から、9つのアミノ酸変異S125D/R131S/V163K/V267I/N297F/W306M/Q318K/S402V/Y403Wを含む変異体M87を選択した。前記変異体M87のアミノ酸配列は、配列番号119で示される配列である。

【0280】

実施例12. M87変異体の比活性の測定

【0281】

実施例11で得られた変異体M87の比活性を野生型Xu4Eと比較した(図5)。

【0282】

比較結果から、変異体M87の比活性は約2U/mgであった。つまり、野生型Xu4Eと比較して、変異体の比活性が大幅に改善されている。

【0283】

実施例13. 単一変異の変異体の調製

【0284】

野生型TmXu4Eから出発して、本開示に記載の「Xu4E変異体ライブラリーの構築」の方法により、部位飽和変異誘発により野生型TmXu4E上の1つのアミノ酸を変更することにより、9つの単一アミノ酸部位の変異体ライブラリーを調製した。ここで、前述の野生型TmXu4Eのアミノ酸配列は、配列番号2で示される配列であり、前述のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1で示される配列である。

【0285】

9つのアミノ酸変異部位が変異体M87から選択され、これらは、それぞれ125位のセリンで、131位のアルギニン、161位のバリン、267位のバリン、297位のアスパラギン、306位のトリプトファン、318位のグルタミン、402位のセリン、又は403位のチロシンである。9つの変異体ライブラリーを宿主大腸菌JZ919のプラスミドpGS-Xu4Eに挿入し、D-キシロースを含む各LB培地にプレーティングした。陽性変異体は、本開示に記載されている「Xu4E変異体ライブラリーのハイスループットスクリーニング」法によってスクリーニングされた。陽性変異体は野生型酵素と比較して96ウェルマイクロプレートで検証され、DNAシーケンシングによってシーケンシングされた。

【0286】

スクリーニングにより得られた変異体から、以下の9つの変異体：S125D、R131S、V163K、V267I、N297F、W306M、Q318K、S402V及びY403Wが選択された。ここで、前述の変異体におけるアミノ酸の番号付けは、配列番号2に従って番号が付けられている。

【0287】

上記の9つの変異体は、大腸菌BL21(DE3)で過剰発現し、ニッケル含有イオン樹脂へのアフィニティー吸着によって精製された。変異体S125D、V163K、V267I、N297F、W306M、Q318K、S402V及びY403WのXu4E酵素の比活性を図6に示す。これらのうち、8つの変異体は野生型TmXu4Eよりも高い比活性を示し、R131S変異体は野生型TmXu4Eよりもわずかに低い比活性を示した。

【0288】

実施例14. Xu4E多重変異体の調製及び比活性の測定

【0289】

実施例4 - 実施例11と同じ方法で、Xu4E変異体をさらにスクリーニングした。

10

20

30

40

50

【0290】

スクリーニング後、Xu4Eに基づいて以下のアミノ酸多重変異体を得た（ここで、前述のXu4E変異体はすべて配列番号2に従って番号が付けられている）：

【0291】

M41（二重変異）：V267I / N297F、

【0292】

M46（二重変異）：W306M / Y403W、

【0293】

M50（3つの変異）：V163K / V267I / Y403W、

【0294】

M58（4つの変異）：V163K / V267I / N297F / Y403W、

【0295】

M68（6つの変異）：V163K / V267I / N297F / W306M / S402V / Y403W、

【0296】

M78（7つの変異）：R131S / V163K / V267I / N297F / W306M / S402V / Y403W。

【0297】

上記の変異体の比活性は、本開示に記載されている「Xu4E酵素活性測定」の方法によって検出された。

【0298】

実験結果から、M41、M46、M50、M58、M68、M78の酵素活性は、それぞれ約0.30 U / mg、0.21 U / mg、0.18 U / mg、0.33 U / mg、0.41 U / mg、0.57 U / mgであった。

【0299】

実施例15．単一変異のXu4E変異体の調製及び比活性の測定

【0300】

実施例4と同じ方法で、Xu4E変異体ライブラリーを取得した。

【0301】

得られたXu4E変異体は以下の通りである（ここで、前述のXu4E変異体はすべて配列番号2に従って番号が付けられている）：

【0302】

M13（単一変異）：D161A、

【0303】

M19（単一変異）：E266A、

【0304】

M1（単一変異）：G102L、

【0305】

M30（単一変異）：K337D、

【0306】

M31（単一変異）：D394M。

【0307】

実験結果から、M13、M19、M1、M30、M31の比活性は、それぞれ約0.008 U / mg、0.013 U / mg、0.03 U / mg、0.06 U / mg、0.04 U / mgであった。

【0308】

上記の実験結果から、上記のXu4E変異体の比活性は野生型TmXu4E（0.09 U / mg）よりも低い、それでもXu4E酵素活性を有している。

【0309】

実施例16．組換え熱安定性酵素の単純な精製

10

20

30

40

50

【0310】

T. thermophiles 由来の D - キシロースイソメラーゼ、サーモスポラマリーナ (*T. maritima*) 由来の Xu4E、及びバチルス・ステアロサーモフィラス (*G. stearothermophilus*) 由来の L - アラビノースイソメラーゼは、大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) で異種発現した。細胞を回収して破碎した後、細胞溶解物の上清を熱処理 (70、20 min) した。遠心分離後、3つの熱安定性酵素を含む上清を混合して、それにより D - キシロースから L - アラビノースへの生物変換を行った。SDS - PAGE により、標的タンパク質の発現量と精製タンパク質の純度を検出した (図7)。

【0311】

実施例17. D - キシロースからの L - リブロースの合成

【0312】

D - キシロースイソメラーゼ (D - XI)、及び Xu4E 変異体 M87 を含む 2 酵素システムを構築した。基質は 50 mM D - キシロースであった。反応混合物には、100 mM HEPES バッファー (pH 8.0)、0.2 mM Co^{2+} 、1 mM Mn^{2+} 、1 g/L Xu4E M87 及び 1 U/mL XI が含まれる。反応溶液を穏やかに混合し、次に嫌気性条件下で 50 で反応させた。

【0313】

12 時間の反応後、L - リブロースが HPLC により検出され、L - リブロースの取得に成功した。人工ルートの結果は設計と一致していることが証明されている。

【0314】

実施例18. 50 mM D - キシロースを使用した L - アラビノースの合成

【0315】

D - キシロースイソメラーゼ (D - XI)、Xu4E 変異体 M87 及び L - アラビノース合成酵素 (L - AI) を含む 3 酵素システムを構築した。基質は 50 mM D - キシロースであった。反応混合物は、0.2 mM Co^{2+} 、1 mM Mn^{2+} 、1 g/L Xu4E (ここで、Xu4E は野生型又は M87 変異体から選択される)、1 U/mL D - XI 及び 1 U/mL L - AI を含む 100 mM Tris バッファー (pH 8.0) である。3つの酵素と基質を含む反応液を混合した後、50 で反応を行った。

【0316】

Xu4E 変異体 M87 を含む 3 酵素システムは 8 時間の反応後に 21 mM の L - アラビノースを生成したが、野生型を含む 3 酵素システムは 24 時間の反応でわずか 1.25 mM の L - アラビノースを生成した (図8)。

【0317】

実施例19. 500 mM D - キシロースを使用した L - アラビノースの合成

【0318】

D - キシロースイソメラーゼ (D - XI)、Xu4E 変異体 M87 及び L - アラビノース合成酵素 (L - AI) を含む 3 酵素システムを構築した。基質は 500 mM D - キシロースであった。反応混合物には、100 mM Tris バッファー (pH 8.0)、0.2 mM Co^{2+} 及び 1 mM Mn^{2+} を含む。Xu4E の濃度が 15 g/L で、XI 及び AI の濃度が 20 U/mL に増加した。

【0319】

M87 を含む 3 酵素系は、4 時間の反応後に 175 mM L - アラビノースを生成した。その L - アラビノースの比容積生産率は 6.56 g/リットル/時間に達した。8 時間の反応後、反応が平衡に達したとき、基質の D - キシロースは 207 mM、中間生成物の D - キシルロースと L - リブロースは、それぞれ 55 mM と 42 mM、生成物の L - アラビノースは 196 mM であった (図9)。

【0320】

実施例20. D - キシロースからの L - リボースの生産

【0321】

10

20

30

40

50

D - キシロースイソメラーゼ (D - X I)、X u 4 E 変異体 M 8 7 及びリン酸マンノースイソメラーゼ (M P I) を含む 3 酵素システムを構築した。基質は 5 0 m M D - キシロースであった。G . t h e r m o d e n i t r i f i c a n s 由来の m p i 遺伝子をクローン化し、p E T プラスミドに挿入した (K i m e t a l . 2 0 1 4)。反応混合物は、0 . 2 m M C o ²⁺、1 m M M n ²⁺、1 g / L X u 4 E (M 8 7 変異体)、1 U / m L X I 及び 1 U / m L M P I を含む 5 0 m M T r i s バッファー (p H 8 . 0) である。3 つの酵素と基質を含む反応溶液とを混合した後、触媒反応を 4 0 で実施した。

【 0 3 2 2 】

2 4 時間の反応後、L - リボースが H P L C で検出され、この人工経路の結果が設計と一致していることが証明された。

【 0 3 2 3 】

実施例 2 1 . L - ペントースの製造と分離

【 0 3 2 4 】

エピメラーゼとイソメラーゼによって触媒される反応は反応平衡状態で存在するため、標的基質を酵素及び基質/中間体から効果的に分離することが非常に重要である。例えば、D - グルコースを使用して高フルクトースシロップを製造するには、擬似移動床 (S M B) を使用して D - グルコースとフルクトースシロップを分離し、未利用の D - グルコースをさらにリサイクルし、高フルクトース含有シロップを取得する (図 1 0)。固定化キシロースイソメラーゼ及びキシロースイソメラーゼを含む固定化微生物全細胞は、高フルクトースシロップの工業生産に広く使用されている (図 1 0)。精製リコンビナーゼ又は過剰発現リコンビナーゼを含む粗細胞溶解物に限定されないが、複数の酵素の共固定化は、酵素の耐用年数を延長し、酵素及び生成物/中間体の分離を容易にし、酵素コストの使用を削減する。さらに、酵素を含む微生物の全細胞を固定化して、生体触媒の安定性及び生体触媒の再利用性を改善することは、オプションのソリューションである。さらに、反応速度を上げるために、微生物の全細胞の透過処理もオプションのソリューションでもある。

【 0 3 2 5 】

本実施例では、擬似移動床 (S M B) を使用しているが、充填樹脂は S h o d e x S u g a r K S - 8 0 1 ナトリウムイオン交換カラム、W a t e r s S u g a r P a k I カルシウムイオン交換カラム、B i o - R a d A m i n e x H P X - 8 7 P 鉛イオン交換カラム、B i o - R a d A m i n e x H P X - 8 7 H 水素イオン交換カラム、又は同様の機能を備えたクロマトグラフィー分離カラムがあるが、これらに限定されない。

【 0 3 2 6 】

L - アラビノースの製造を例にとると、擬似移動床 (S M B) を使用して、未使用の D - キシロース及び中間生成物である L - リブロースと D - キシルロースから L - アラビノースを分離できる (図 1 0)。

【 0 3 2 7 】

実施例 2 2 . X u 4 E 触媒による生成物 L - リブロースの特徴付け

【 0 3 2 8 】

基質 D - キシルロースの反応は、野生型 X u 4 E 及び X u 4 E 変異体 M 8 7 で触媒された。野生型 X u 4 E は 5 0 で 2 4 時間行い、X u 4 E 変異体 M 8 7 は 5 0 で 1 0 分間行った。基質の D - キシルロースと生成物の L - リブロースを、W a t e r s S u g a r P a k カラムを備えた H P L C で分離した。

【 0 3 2 9 】

H P L C クロマトグラムを図 1 1 に示す。生成物 (L - リブロース) の保持時間は 1 5 . 4 9 分で新しいピーク (黒い実線) であり、L - リブロース標準の保持時間と同じである。H P L C で分離された生成物のピークは、D - キシルロース及び L - リブロース標準品と比較して、一次質量分析 (図 1 2) 及び二次質量分析 (図 1 3) によって特徴づけられた。

【 0 3 3 0 】

実験結果は、野生型 X u 4 E 及び X u 4 E 変異体 M 8 7 が D - キシルロースから L - リ

10

20

30

40

50

ブロースへの酵素反応を触媒できることを明確に示している。

【0331】

実施例23. 異なる由来の野生型Xu4Eの変異体の機能の検出

【0332】

バイオインフォマティクスに基づいて、実施例3、実施例14及び実施例15で得られた異なる野生型Xu4Eの配列を分析及び比較した。その中で、*は異なる由来の野生型Xu4Eの保存されたアミノ酸部位を示す。

【0333】

同時に、本出願の実施例に記載の試験方法により配列番号2に示す配列と比較して配列同一性を算出する際に、前述の異なる野生型Xu4Eのアミノ酸に番号を付けた。

10

【0334】

図14A及び図14Bで示されるように、前述の異なる野生型Xu4Eについて、配列番号2で示される前述の番号付けに対応して番号付けされる場合、配列番号2で示される番号付けの以下の部位に対応するアミノ酸は、変異後も依然としてXu4E活性を有する：G102、S125、R131、D161、V163、E266、V267、N297、W306、Q318、K337、D394、S402、Y403。

【0335】

実施例24. 短縮された配列を有するXu4E変異体の構築

【0336】

本発明者らは、野生型Xu4Eをコードする配列を切断して、1～86位及び196 - 236位をコードするアミノ酸配列を別々に又は一緒に除去し、本開示に記載の方法によって、切断したXu4E変異体の生物活性を測定した。

20

【0337】

実験結果は、配列切断後のタンパク質の活性が、90%（1～86番目のアミノ酸除去）、87%（196～236番目のアミノ酸除去）、又は85%（196～236番目のアミノ酸除去）、85%（196 - 236番目アミノ酸を同時に除去）であるXu4Eの活性を依然として維持していることを示している。

【0338】

実施例25. 本開示におけるXu4E活性を有する酵素の統計

【0339】

本開示の実施例4～16に記載の方法により、Xu4E活性を有する酵素の配列及びその酵素活性の実験結果を得た。

30

【0340】

実験結果を表3に示す。

【0341】

40

50

【表 3 - 1】

表 3 本開示におけるXu4E活性を有する酵素の実験結果

配列番号	変異の部位	102	125	131	161	163	266	267	297	306	318	337	394	402	403	変異したアミノ酸の数	比活性
1	WT DNA																
2	WT																100
3-22	uxae																
23-32	rp4e																
33	M1	L														1	32
34	M2		C													1	148
35	M3		Y													1	136
36	M4		D													1	125
37	M5		Q													1	112
38	M6		E													1	120
39	M7		T													1	105
40	M8		N													1	110
41	M9			T												1	125
42	M10			D												1	120
43	M11			E												1	95
44	M12			S												1	87
45	M13				A											1	4
46	M14					K										1	117
47	M15					R										1	128
48	M16					S										1	105
49	M17					I										1	132
50	M18					M										1	110
51	M19						A									1	8
52	M20							I								1	148
53	M21							L								1	152
54	M22							M								1	165
55	M23								F							1	157
56	M24								Y							1	120
57	M25								K							1	165
58	M26									S						1	147
59	M27									M						1	137
60	M28									T						1	105
61	M29										K					1	109
62	M30											D				1	64

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

さらに、前述の説明から、当業者は、本開示からその主要な特徴を容易に理解することができ、本開示の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な異なる目的に適応するために本発明に多くの修正を加えることができる。使用条件、したがってそのような変更も、

添付の特許請求の範囲に含まれることを意図している。

【 0 3 4 4 】

参考文献

【 0 3 4 5 】

Antila, J., V. Ravanko and P. Walliander (1997). Method of preparing L-arabinose from sugar beet pulp. US6506897B1.

【 0 3 4 6 】

Bhosale, S. H., M. B. Rao and V. V. Deshpande (1996). "Molecular and industrial aspects of glucose isomerase." Microbiological Reviews 60(2): 280.

【 0 3 4 7 】

Boku, T., I. Kusakabe, N. Matsuo and e. al. (2001). Method for isolating l-arabinose. JP2002262899A.

【 0 3 4 8 】

Izumori, K., S. Sugimoto and B. Kraska (1980). "Induction of D-ribose isomerase by L-ribose in Mycobacterium smegmatis." Agric. Biol. Chem. 44: 223-225.

【 0 3 4 9 】

Izumori, K., Y. Ueda and K. Yamanaka (1978). "Pentose metabolism in Mycobacterium smegmatis: comparison of L-arabinose isomerase induced by L-arabinose and D-galactose." J. Bacteriol. 133: 413-414.

【 0 3 5 0 】

Kim, K.-R., E.-S. Seo and D.-K. Oh (2014). "l-Ribose Production from l-Arabinose by Immobilized Recombinant Escherichia coli Co-expressing the l-Arabinose Isomerase and Mannose-6-Phosphate Isomerase Genes from Geobacillus thermodenitrificans." Appl. Biochem. Biotechnol. 172(1): 275-288.

【 0 3 5 1 】

Kim, Y. S., K. C. Shin, Y. R. Lim and D. K. Oh (2013). "Characterization of a recombinant L-rhamnose isomerase from Dictyoglomus turgidum and its application for L-rhamnulose production." Biotechnol. Lett. 35: 259-264.

【 0 3 5 2 】

Morimoto, A., K. Mukai, Y. Nisikawa, H. Tanaka and G. Yoshikawa (2001). Process for producing l-arabinose, l-arabinose-containing enzymatically processed products, diet foods, diabetic diet foods and fruit or vegetable juices and process for producing the same. EP1167536A1.

【 0 3 5 3 】

Mortlock, R. P. (1966). "D-Arabinose isomerase." Methods Enzymol. 9: 583-585.

【 0 3 5 4 】

Park, C. S., S. J. Yeom, Y. R. Lim, Y. S. Kim and D. K. Oh (2010). "Characterization of a recombinant thermostable L-rhamnose isomerase from Thermotoga maritima ATCC 43589 and its application in the production of L-lyxose and L-mannose." Biotechnol. Lett. 32: 1947-1953.

【 0 3 5 5 】

Rodionova, I. A., D. A. Scott, N. V. Grishin, A. L. Osterman and D. A. Rodionov (2012). "Tagaturonate-fructuronate epimerase UxaE, a novel enzyme in the hexuronate catabolic network in Thermotoga maritima." Environ. Microbiol. 14(11): 2920-2934.

【 0 3 5 6 】

Uechi, K., G. Takata, Y. Fukai, A. Yoshihara and K. Morimoto (2013). "Gene Cloning and Characterization of L-Ribulose 3-epimerase from Mesorhizobium loti and Its Application to Rare Sugar Production." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 77(3): 511-515.

10

20

30

40

50

【 0 3 5 7 】

Wu, R., C. Ma, Y.-H. P. Zhang and Z. Zhu (2018). "Complete oxidation of xylose for bioelectricity generation by reconstructing a bacterial xylose utilization pathway in vitro." ChemCatChem 10(9): 2030-2035.

【 0 3 5 8 】

Yang, S. J., Y. H. Kim, S. B. Kim, S. W. Park, I. H. PARK, M. H. Kim and Y. M. Lee (2014). Production method for tagatose. WO2014196811A1, US20160138053A1. .

【 0 3 5 9 】

Yang, S. J., Y. H. Kim, I. H. PARK, Y. M. Lee, H. K. CHO, S. B. Kim and S. W. Park (2015). Hexuronate C4-epimerase mutant with improved conversion activity, and method for producing D-tagatose by using same. US10196626B2.

10

20

30

40

50

【 図 5 】

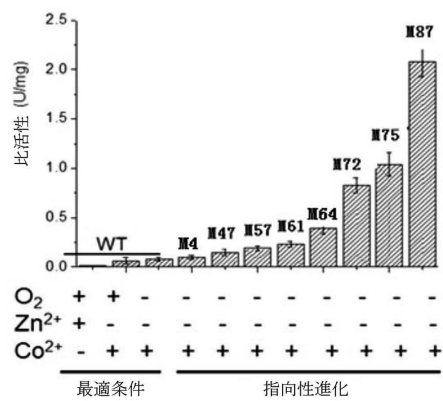


図 5

【 図 6 】

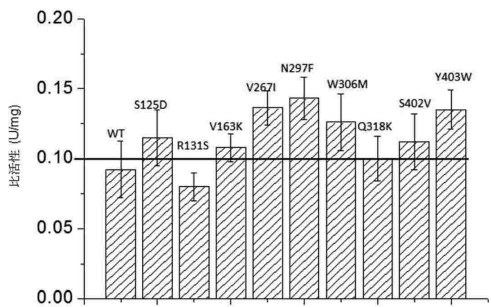


図 6

10

【 図 7 】

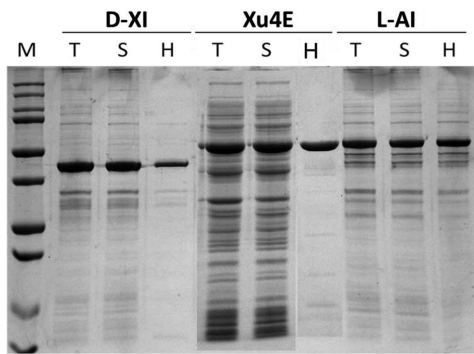


図 7

【 図 8 】

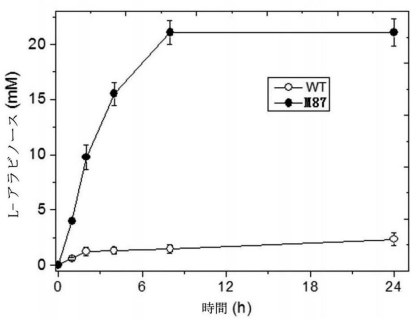


図 8

20

【 図 9 】

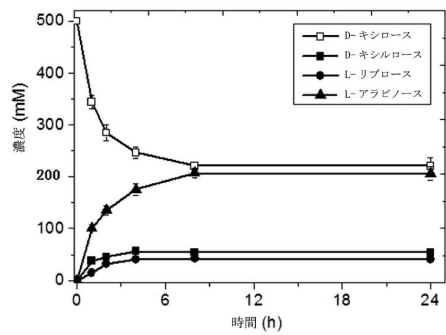


図 9

【 図 10 】

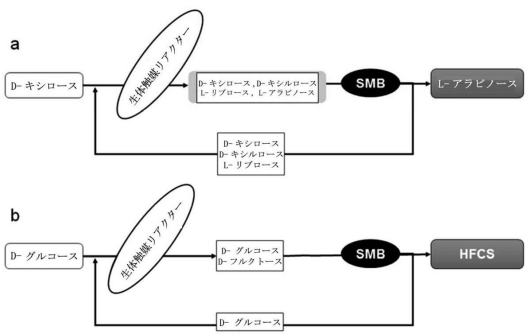


図 10

30

40

50

【図 1 1】

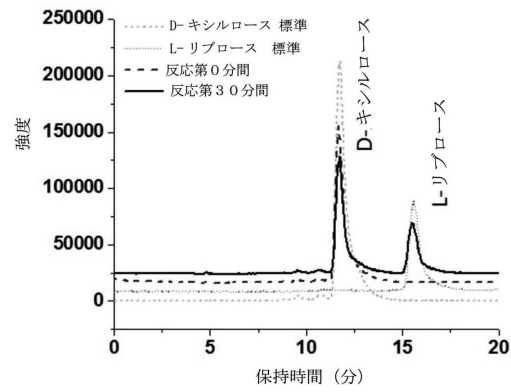


図 11

【図 1 2】

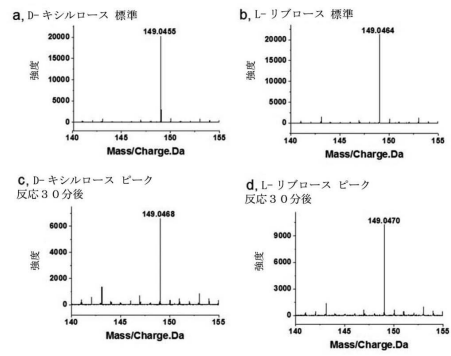


図 12

10

【図 1 3】

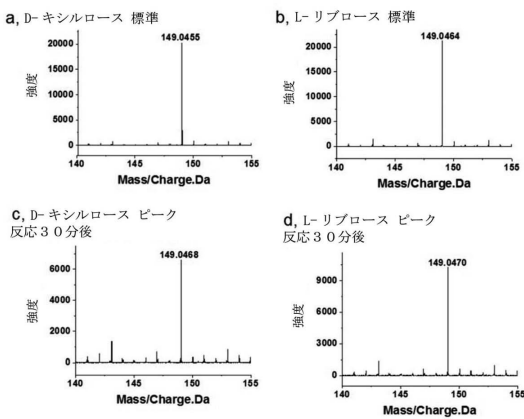


図 13

【図 1 4】

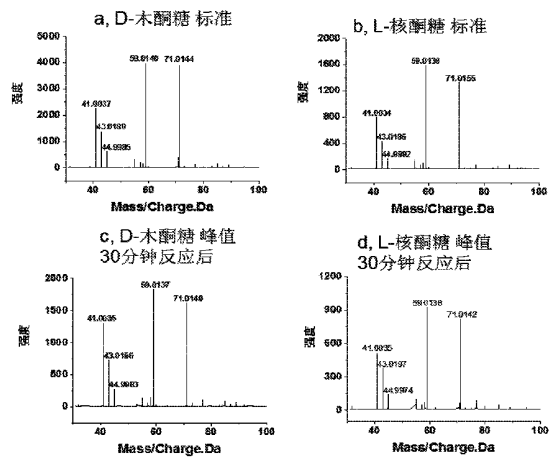


図 14

20

30

40

50

【 図 1 4 B 】

[illegible][illegible]

图 14B

10

20

図 14A

0007581355000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		
C 1 2 P 19/24 (2006.01)	C 1 2 P 19/24		
C 1 3 K 13/00 (2006.01)	C 1 3 K 13/00		
C 1 2 N 15/61 (2006.01)	C 1 2 N 15/61	Z N A	
C 1 2 N 9/90 (2006.01)	C 1 2 N 9/90		
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	2 0 0 Z	
(74)代理人 100141977			
弁理士 中島 勝			
(74)代理人 100138210			
弁理士 池田 達則			
(74)代理人 100203828			
弁理士 喜多村 久美			
(72)発明者 チャン イー - ホン パーシバル			
中華人民共和国, ティエンチン 3 0 0 3 0 8 , ティエンチン エアポート エコノミック エリア			
, ウエスト セブンス アベニュー 3 2			
(72)発明者 チョウ ウェイ			
中華人民共和国, ティエンチン 3 0 0 3 0 8 , ティエンチン エアポート エコノミック エリア			
, ウエスト セブンス アベニュー 3 2			
審査官 松井 一泰			
(56)参考文献	RODIONOVA, Irina A. et al. , “ Tagaturonate-fructuronate epimerase UxaE, a novel enzyme in the hexuronate catabolic network in Thermotoga maritima ” , Environmental Microbiology , 2012年08月23日 , Vol. 14 , No. 11 , pp.2920-2934 , DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02856.x		
	D-tagaturonate epimerase UxaE [Thermotoga maritima] , NCBI Reference Sequence: WP_004081526.1 [online] 10-JUL-2019 , 2024年04月11日 , URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_004081526.1?report=genbank&log\$=protopp&blast_rank=1&RID=1F0K4ZEY013		
	KIM, Jae-Eung , In Vitro Synthetic Biology Platform and Protein Engineering for Biorefinery , Dissertation for PhD in Biological Systems Engineering , the Virginia Polytechnic Institute and State University , 2017年05月05日		
(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)	C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0		
	C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0		
	C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8		
	C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)		
	U n i P r o t / G e n e S e q		