

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4593476号
(P4593476)

(45) 発行日 平成22年12月8日 (2010. 12. 8)

(24) 登録日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 R 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19

請求項の数 18 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-515364 (P2005-515364)

(86) (22) 出願日 平成16年11月4日 (2004. 11. 4)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2004/016710

(87) 国際公開番号 W02005/045006

(87) 国際公開日 平成17年5月19日 (2005. 5. 19)

審査請求日 平成19年3月29日 (2007. 3. 29)

(31) 優先権主張番号 特願2003-375823 (P2003-375823)

(32) 優先日 平成15年11月5日 (2003. 11. 5)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(31) 優先権主張番号 特願2004-189010 (P2004-189010)

(32) 優先日 平成16年6月25日 (2004. 6. 25)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 308032666

協和発酵バイオ株式会社

東京都千代田区大手町一丁目6番1号

(72) 発明者 橋本 信一

山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工

業株式会社 生産技術研究所内

(72) 発明者 田畑 和彦

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗

酵工業株式会社 バイオフロンティア研究

所内

審査官 ▲高▼ 美葉子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジペプチドを生産する微生物および該微生物を用いたジペプチドの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PepA、PepB、PepD、PepN、PepP、PepQ、PepE、PepT、DcpおよびIadAより選ばれる1種以上のペプチダーゼおよびDppA、DppB、DppC、DppD、DppF、OppA、OppB、OppC、OppD、OppF、YddO、YddP、YddQ、YddR、YddS、YbiK、MppA、SapA、SapB、SapC、SapDおよびSapFより選ばれる1種以上のペプチド取り込み活性を有する蛋白質（以下、ペプチド取込み蛋白質ともいう）の活性が低下または喪失し、かつジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリ。

【請求項 2】

PepA、PepB、PepD、PepN、PepP、PepQ、PepE、PepT、DcpおよびIadAより選ばれる3種以上のペプチダーゼの活性が低下または喪失し、かつジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリ。

【請求項 3】

ペプチダーゼが、配列番号1～4のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1または2記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 4】

ペプチド取込み蛋白質が、配列番号5～9のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質である請求項1または3記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 5】

ジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリが、以下の[1]～[4]のいずれ

10

20

れかに記載の蛋白質を生産する能力を有する微生物である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のエシェリヒア・コリ。

[1] 配列番号 1 9 ~ 2 5 および 6 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

[2] 配列番号 1 9 ~ 2 5 および 6 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 ~ 2 0 個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[3] 配列番号 1 9 ~ 2 5 および 6 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 9 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[4] 配列番号 3 3 で表されるアミノ酸配列と 9 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質

10

【請求項 6】

ジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリが、以下の [1] ~ [4] のいずれかに記載の DNA を有するエシェリヒア・コリである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のエシェリヒア・コリ。

[1] 請求項 5 の [1] ~ [4] のいずれかに記載の蛋白質をコードする DNA

[2] 配列番号 2 6 ~ 3 2、6 4 および 6 5 のいずれかで表される塩基配列を有する DNA

[3] 配列番号 2 6 ~ 3 2、6 4 および 6 5 のいずれかで表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする DNA

20

[4] 配列番号 3 4 で表される塩基配列と 9 5 % 以上の同一性を有する塩基配列を有し、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする DNA

【請求項 7】

ジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリが、請求項 6 の [1] ~ [4] のいずれかに記載の DNA とベクター DNA が連結した組換え体 DNA を有するエシェリヒア・コリである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 8】

ジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリが、L - アミノ酸エステルと L - アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有するエシェリヒア・コリである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のエシェリヒア・コリ。

30

【請求項 9】

L - アミノ酸エステルと L - アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有するエシェリヒア・コリが、プロリンイミノペプチダーゼを生産するエシェリヒア・コリである請求項 8 記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 10】

L - アミノ酸エステルと L - アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有するエシェリヒア・コリが、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA とベクター DNA が連結した組換え体 DNA を有するエシェリヒア・コリである請求項 8 または 9 記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 11】

40

ジペプチドを生産する能力を有するエシェリヒア・コリが、L - アミノ酸アミドと L - アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有するエシェリヒア・コリである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 12】

L - アミノ酸アミドと L - アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有するエシェリヒア・コリが、L - アミノ酸アミドハイドrolラーゼ活性を有する蛋白質を生産するエシェリヒア・コリである請求項 11 記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項 13】

L - アミノ酸アミドと L - アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有するエシェリヒア・コリが、L - アミノ酸アミドハイドrolラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA と

50

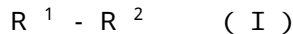
ベクターDNAが連結した組換え体DNAを有するエシェリヒア・コリである請求項11記載のエシェリヒア・コリ。

【請求項14】

請求項1～8のいずれか1項に記載のエシェリヒア・コリの培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、1種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法。

【請求項15】

ジペプチドが式(I)



(式中、 R^1 および R^2 は同一または異なってアミノ酸を表す) で表されるジペプチドである請求項14記載の製造法。

【請求項16】

請求項8～10のいずれか1項に記載のエシェリヒア・コリの培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法。

【請求項17】

請求項11～13のいずれか1項に記載の微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法。

【請求項18】

培養物の処理物が、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、または該菌体の固定化物であることを特徴とする請求項14～17のいずれか1項に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、ジペプチドを生産する微生物および該微生物を用いたジペプチドの製造法に関する。

【背景技術】

ジペプチドは、食品、医薬品、化粧品等として重要な化合物である。

ジペプチドの製造法としては、天然物からの抽出法、化学合成法、酵素法が知られている。天然物からの抽出法は、生産できるジペプチドの種類が限られている上、天然物中に含まれる目的のジペプチドの含量が低く生産性が悪い。化学合成法によるジペプチドの合成では、官能基の保護・脱保護などの操作が必要であり、またラセミ体も合成されることから、化学合成法は経済的、効率的な方法とはいえない。また、化学合成法は大量の有機溶媒等を使うため環境衛生上も好ましい方法ではない。

酵素法によるジペプチドの合成に関しては、タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)の逆反応を利用した方法[J. Biol. Chem., 119, 707-720(1937)]、耐熱性アミノアシルt-RNA合成酵素を利用する方法(特開昭58-146539号公報、特開昭58-209991号公報、特開昭58-209992号公報、特開昭59-106298号公報)、非リボゾームペプチドシンセターゼ(以下、NRPSと称す)を利用する方法[Chem. Biol., 7, 373-384(2000)、FEBS Lett., 498, 42-45(2001)、米国特許第579538号、米国特許第5652116号]、D-Ala-D-Alaリガーゼを利用する方法[Biochemistry, 35, 10464-10471(1996)]、バシリシン合成酵素を利用する方法[J. Ind. Microbiol., 2, 201-208(1987)、E

10

20

30

40

50

nzyme. Microbial. Technol., 29, 400-406 (2001)]、L-アミノ酸アミドヒドロラーゼまたはプロリンイミノペプチダーゼを利用する方法(国際公開第WO03/010307号パンフレット)が知られている。

しかし、タンパク分解酵素の逆反応を利用した方法では、基質となるアミノ酸の官能基の保護・脱保護が必要であり、ペプチド形成反応の効率化およびペプチド分解反応の阻止が困難といった問題点がある。耐熱性アミノアシル-t-RNA合成酵素を利用する方法には、酵素の発現、副生物の生成反応の阻止が困難という問題点がある。

一方、NRPS、D-Ala-D-Alaリガーゼおよびバシリシン合成酵素を利用する方法は、上記したような問題点はなく、特定の配列のジペプチドを製造することができる方法であるが、ATPなどのエネルギー供給源を必要とする反応であるため、効率的な方法ではない。

10

L-アミノ酸アミドヒドロラーゼまたはプロリンイミノペプチダーゼを利用する方法では、該酵素を生産する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物菌体の処理物を用いてジペプチドを製造することができる旨記載されているが、該製造法によるジペプチドの生産量は十分なものではない。

生細胞は、不要になった蛋白質を構成アミノ酸にまで分解し、生じたアミノ酸を必要な蛋白質の合成に用いる代謝を営んでいる。該機能は細胞の生存、増殖に必須であるため、生物には多種のプロテアーゼやペプチダーゼが存在することが知られている。

例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)には少なくとも7種のジペプチダーゼが存在する他、他のプロテアーゼやペプチダーゼによっても分解されるジペプチドがあることが知られている[FEMS Microbial. Rev., 63, 265-276 (1989)]。また、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)、バチルス・サチリス(Bacillus subtilis)、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)の染色体DNA上にはペプチダーゼ遺伝子と同定されている遺伝子が、それぞれ25以上、14以上、20以上存在している。

20

しかしながら、ジペプチドを生産する微生物に、ペプチダーゼの欠損を導入することによりジペプチドの生産量が上昇することについては知られていない。

また、生細胞には複数のペプチド取込みシステムが備わっていることが知られている。

例えばエシェリヒア・コリにはジペプチドを取り込む3つのシステムがあることが報告されている[Chem. Biol., 5, 489-504 (1998)、Microbiol., 145, 2891-2901 (1999)]。ゲノムDNA情報からも、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属に属する微生物にはいずれも3種類あるいはそれ以上のペプチド取込みシステムが存在することが確認されている。

30

しかしながら、細胞内で合成されたジペプチドが細胞外に排出されるか否かは知られておらず、ましてジペプチドを生産する微生物に、ペプチドの取込みに関与する蛋白質の欠損を導入することにより、ジペプチドの生産量が上昇することは知られていない。

【発明の開示】

本発明の目的は、ジペプチドを生産する微生物および該微生物を用いたジペプチド製造法を提供することにある。

40

本発明は、以下の(1)~(21)に関する。

(1) 1種以上のペプチダーゼおよび1種以上のペプチド取り込み活性を有する蛋白質(以下、ペプチド取込み蛋白質ともいう)の活性が低下または喪失し、かつジペプチドを生産する能力を有する微生物。

(2) 3種以上のペプチダーゼの活性が低下または喪失し、かつジペプチドを生産する能力を有する微生物。

(3) ペプチダーゼが、配列番号1~4のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号1~4のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつペプチダーゼ活性を有する蛋白質である上記(1)ま

50

たは(2)の微生物。

(4) ペプチド取込み蛋白質が、配列番号5～9のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号5～9のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつペプチド取り込み活性を有する蛋白質である上記(1)または(3)の微生物。

(5) ジペプチドを生産する能力を有する微生物が、以下の[1]～[4]のいずれかに記載の蛋白質を生産する能力を有する微生物である上記(1)～(4)のいずれか1つの微生物。

[1] 配列番号19～25および68のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

[2] 配列番号19～25および68のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[3] 配列番号19～25および68のいずれかで表されるアミノ酸配列と65%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[4] 配列番号33で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質

(6) ジペプチドを生産する能力を有する微生物が、以下の[1]～[4]のいずれかに記載のDNAを有する微生物である上記(1)～(4)のいずれか1つの微生物。

[1] 上記(5)の[1]～[4]のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNA

[2] 配列番号26～32、64および65のいずれかで表される塩基配列を有するDNA

[3] 配列番号26～32、64および65のいずれかで表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA

[4] 配列番号34で表される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列を有し、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA

(7) ジペプチドを生産する能力を有する微生物が、上記(6)の[1]～[4]のいずれかに記載のDNAとベクターDNAが連結した組換え体DNAを有する微生物である上記(1)～(6)のいずれか1つの微生物。

(8) 微生物が、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属またはサッカロマイセス属に属する微生物である上記(1)～(7)のいずれか1つの微生物。

(9) ジペプチドを生産する能力を有する微生物が、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有する微生物である上記(1)～(4)のいずれか1つの微生物。

(10) L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有する微生物が、プロリンイミノペプチダーゼを生産する微生物である上記(9)の微生物。

(11) L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有する微生物が、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAとベクターDNAが連結した組換え体DNAを有する微生物である上記(9)または(10)の微生物。

(12) 微生物が、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属またはサッカロマイセス属に属する微生物である上記(9)～(11)のいずれか1つの微生物。

(13) ジペプチドを生産する能力を有する微生物が、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有する微生物である上記(1)～(4)のいずれか1つの微生物。

(14) L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有する微生物が、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有する蛋白質を生産する微生物である上記(13)の微生物。

(15) L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを生成する能力を有する微生物が、L-アミノ酸アミドハイドロラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAと

10

20

30

40

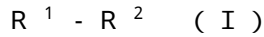
50

ベクターDNAが連結した組換え体DNAを有する微生物である上記(13)の微生物。

(16) 微生物が、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属またはサッカロマイセス属に属する微生物である上記(13)~(15)のいずれか1つの微生物。

(17) 上記(1)~(8)のいずれか1つの微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、1種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から、該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法。

(18) ジペプチドが下式(I)



(式中、 R^1 および R^2 は同一または異なってアミノ酸を表す)で表されるジペプチドである上記(17)の製造法。

10

(19) 上記(9)~(12)のいずれか1つの微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法。

(20) 上記(13)~(16)のいずれか1つの微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法。

(21) 培養物の処理物が、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、または該菌体の固定化物であることを特徴とする上記(17)~(20)のいずれか1つの製造法。

20

以下に本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の微生物

本発明の微生物は、1種以上のペプチダーゼおよび1種以上のペプチド取り込み活性を有する蛋白質(以下、ペプチド取込み蛋白質と略す)の活性が低下または喪失し、かつジペプチドを生産する能力を有する微生物、または3種以上のペプチダーゼの活性が低下または喪失し、かつジペプチドを生産する能力を有する微生物である。

30

1種以上のペプチダーゼおよび1種以上のペプチド取込み蛋白質の活性が低下または喪失している微生物としては、該微生物が正常に生育できる限りにおいて、任意の1種以上のペプチダーゼおよび任意の1種以上のペプチド取込み蛋白質の活性が低下または喪失している微生物をあげることができ、好ましくは1種以上9種以下、より好ましくは1種以上7種以下、さらに好ましくは1種以上4種以下のペプチダーゼの活性が低下または喪失しており、かつ好ましくは1種以上5種以下、より好ましくは1種以上3種以下、さらに好ましくは1種以上2種以下、特に好ましくは1種のペプチド取込み蛋白質の活性が低下または喪失している微生物をあげることができる。

該微生物としては、より具体的には、該微生物のゲノムDNA上に存在するペプチダーゼをコードする遺伝子(以下、ペプチダーゼ遺伝子と略す)およびペプチド取込み蛋白質をコードする遺伝子(以下、ペプチド取込み蛋白質遺伝子)のうち、1種以上のペプチダーゼ遺伝子の塩基配列および1種以上のペプチド取込み蛋白質遺伝子の塩基配列において、該塩基配列の全部または一部が欠失しているため、または該塩基配列中に塩基の置換または付加があるために該ペプチダーゼおよび該ペプチド取込み蛋白質の活性が低下または喪失している微生物をあげることができる。

40

ペプチダーゼの活性が低下しているとは、上記した塩基の欠失、置換または付加がないペプチダーゼに比べ、ペプチド分解活性が低くなっていることを意味する。

微生物のペプチド分解活性は、基質となるペプチドと微生物菌体とを水性媒体中に共存せしめ、ペプチド分解反応を行った後、残存しているペプチド量を公知の方法、例えばHPLCなどを用いた分析法によって定量することにより測定することができる。

50

上記ペプチダーゼとしては、ペプチド分解活性を有する蛋白質であればいずれでもよく、好ましくはジペプチド分解活性が高い蛋白質、より好ましくはジペプチダーゼをあげることができる。

より具体的なペプチダーゼとしては、例えばエシェリヒア・コリに存在する、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するPepA、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するPepB、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するPepD、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するPepN、PepP[GenBank accession no. (以下、GenBankと略す) AAC75946]、PepQ(GenBank AAC76850)、PepE(GenBank AAC76991)、PepT(GenBank AAC74211)、Dcp(GenBank AAC74611)およびIadA(GenBank AAC77284)など、バチルス・サチリスに存在するAmpS(GenBank AF012285)、PepT(GenBank X99339)、YbaC(GenBank Z99104)、YcdD(GenBank Z99105)、YjbG(GenBank Z99110)、YkvY(GenBank Z99111)、YqjE(GenBank Z99116)、YwaD(GenBank Z99123)など、コリネバクテリウム・グルタミカムに存在するBAB97732、BAB97858、BAB98080、BAB98880、BAB98892、BAB99013、BAB99598およびBAB99819(いずれも日本DNAデータバンクの登録番号)で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質など、サッカロマイセス・セレビシエに存在するOCT1(GenBank NC_001143)、SPC2(GenBank NC_003143)、SPY2[Saccharomyces genome database(<http://www.yeastgenome.org/>) accession no. L0002875]およびYIM1(GenBank NC_001145)などをあげることができ、ジペプチダーゼとしては、配列番号1~4で表されるアミノ酸配列を有するPepA、PepB、PepDおよびPepN、並びにPepQ、PepE、IadAをあげることができる。また、配列番号1~4のいずれかのアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有し、かつペプチダーゼ活性を有する蛋白質もジペプチド分解活性が高い蛋白質としてあげることができる。

アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63(1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、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には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

また、ペプチド取込み蛋白質の活性が低下しているとは、上記した塩基の欠損、置換または挿入がないDNAにコードされるペプチド取込み蛋白質に比べ、ペプチド取り込み活性が低くなっていることを意味する。

微生物のペプチド取り込み活性は、基質となるペプチドと微生物菌体とを水性媒体中に共存せしめ、ペプチド取り込み反応を行った後、水性媒体中に残存しているペプチド量を公知の方法、例えばHPLCなどを用いた分析法によって定量することにより測定することができる。

上記ペプチド取り込み蛋白質としては、染色体DNA上でオペロンを形成する遺伝子にコードされている蛋白質であり、細胞膜上で複合体を形成してジペプチド取り込み活性を

発現する蛋白質、および単独の蛋白質としてペプチド取り込み活性を有する蛋白質など、微生物のペプチド取り込みに関与している蛋白質であればいずれでもよく、好ましくはペプチド取り込み活性が高い蛋白質をあげることができる。

より具体的なペプチド取り込み蛋白質としては、例えばエシェリヒア・コリに存在する配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するDppA、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するDppB、配列番号7で表されるアミノ酸配列を有するDppC、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するDppD、配列番号9で表されるアミノ酸配列を有するDppF、OppA (GenBank AAC76569)、OppB (GenBank AAC76568)、OppC (GenBank AAC76567)、OppD (GenBank AAC76566)、OppF (GenBank AAC76565)、YddO (GenBank AAC74556)、YddP (GenBank AAC74557)、YddQ (GenBank AAC74558)、YddR (GenBank AAC74559)、YddS (GenBank AAC74560)、YbiK (GenBank AAC73915)、MppA (GenBank AAC74411)、SapA (GenBank AAC74376)、SapB (GenBank AAC74375)、SapC (GenBank AAC74374)、SapD (GenBank AAC74373)、およびSapF (GenBank AAC74372)など、バチルス・サチリスに存在するDppA (GenBank CAA40002)、DppB (GenBank CAA40003)、DppC (GenBank CAA40004)、DppD (GenBank CAA40005)、DppE (GenBank CAA40006)、OppA (GenBank CAA39787)、OppB (GenBank CAA39788)、OppC (GenBank CAA39789)、OppD (GenBank CAA39790)、OppF (GenBank CAA39791)、AppA (GenBank CAA62358)、AppB (GenBank CAA62359)、AppC (GenBank CAA62360)、AppD (GenBank CAA62356)、AppF (GenBank CAA62357)、YclF (GenBank CAB12175)およびYkfD (GenBank CAB13157)など、コリネバクテリウム・グルタミカムに存在するBAB99048、BAB99383、BAB99384、BAB99385、BAB99713、BAB99714、BAB99715、BAB99830、BAB99831、BAB99832 (いずれも日本DNAデータベースの登録番号)で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質など、サッカロマイセス・セレピシエに存在するOPT1 (GenBank NP_012323)、OPT2 (GenBank NP_015520)およびPTR2 (GenBank CAA82172)などをあげることができ、また、ペプチド取り込み活性が高い蛋白質としては、配列番号5～9で表されるアミノ酸配列を有するDppA、DppB、DppC、DppD、DppFおよびそれらいずれかのアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有する蛋白質もペプチド取り込み活性が高いペプチド取り込み蛋白質としてあげることができる。

アミノ酸配列の相同性は、上記したBLASTまたはFASTA等のプログラムを用いて決定することができる。

3種以上のペプチダーゼの活性が低下または喪失している微生物としては、該微生物が正常に生育できる限りにおいて、任意の3種以上のペプチダーゼの活性が低下または喪失している微生物をあげることができ、好ましくは3種以上9種以下、より好ましくは3種以上6種以下、さらに好ましくは3種または4種のペプチダーゼの活性が低下または喪失している微生物をあげることができる。

具体的なペプチダーゼとしては、上記したエシェリヒア・コリ、バチルス・サチリス、コリネバクテリウム・グルタミカムおよびサッカロマイセス・セレピシエに存在するペプチダーゼおよびジペプチダーゼをあげることができる。また、配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつペプチダーゼ活性を有する蛋白質もジペプチド分

10

20

30

40

50

解活性が高い蛋白質としてあげることができる。

アミノ酸配列の相同性は、上記したBLASTやFASTA等のプログラムを用いて決定することができる。

ジペプチドを生産する能力を有する微生物としては、ジペプチドを生産する能力を有する微生物であれば特に限定されず、例えば、1種以上のアミノ酸を縮合、連結することによりジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を生産する微生物、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を生産する微生物、L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を生産する微生物などをあげることができる。

1種以上のアミノ酸を縮合、連結することによりジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を生産する微生物としては、NRPS、D-Ala-D-Alaリガーゼ、バシリシン合成酵素からなる群より選ばれる蛋白質を生産する微生物をあげることができる。

NRPSを生産する微生物としては、バチルス属をはじめとする原核生物、ペニシリウム属をはじめとする真核生物、BacA、BacBおよびBacC (GenBank AF007865)を生産する微生物、TycA、TycBおよびTycC (GenBank AF004835)を生産する微生物、PcbAB (GenBank M57425)を生産する微生物、およびBacA、BacB、BacC、TycA、TycB、TycC、PcbABから選ばれるいずれかの蛋白質のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有し、かつNRPSの活性を有する蛋白質を生産する微生物などをあげることができる。

D-Ala-D-Alaリガーゼを生産する微生物としては、ペプチドグリカン形成する原核微生物、DdlA (GenBank accession no. M58467)を生産する微生物、DdlB (GenBank accession no. AE000118)を生産する微生物、DdlC (GenBank accession no. D88151)を生産する微生物、およびDdlA、DdlB、DdlCから選ばれるいずれかのアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつD-Ala-D-Alaリガーゼ活性を有する蛋白質を生産する微生物などをあげることができる。

アミノ酸配列の相同性は、上記したBLASTやFASTA等のプログラムを用いて決定することができる。

バシリシン合成酵素を生産する微生物としては、バチルス属に属する微生物、好ましくはバチルス・サチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・コグラニス (Bacillus coagulans)、バチルス・リケチノフォルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium)、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus)、および以下の[1]~[4]、

[1] 配列番号19~25および68のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、

[2] 配列番号19~25および68のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質、

[3] 配列番号19~25および68のいずれかで表されるアミノ酸配列と65%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質、または

[4] 配列番号33で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質、から選ばれる蛋白質を生産する微生物をあげることができる。

L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を生産する微生物としては、プロリンイミノペプチダーゼを生産する微生物をあげることが

10

20

30

40

50

でき、具体的にはバチルス属、コリネバクテリウム属またはシュードモナス属に属する微生物などをあげることができる。具体的には、バチルス・サチリス A T C C 6 6 3 3、バチルス・コアギュランス E K 0 1 [J . B a c t e r i o l . , 1 7 4 , 7 9 1 9 (1 9 9 2)]、コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 2 8 6、シュードモナス・ブチダ A J - 2 4 0 2 (F E R M B P - 8 1 0 1)、シュードモナス・ブチダ A T C C 1 2 6 3 3、シュードモナス・ブチダ A J 2 0 4 8 (F E R M B P - 8 1 2 3) (以上、W O 0 3 / 0 1 0 3 0 7 に記載の微生物)などをあげることができる。また、アースロバクター・ニコチアナ [F E M S M i c r o b i o l . L e t t . , 7 8 , 1 9 1 (1 9 9 9)]、エッシェリヒア・コリ (特開平 2 - 1 1 3 8 8 7)、フラボバクテリウム・メニコゴセプチティカム [A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . , 3 3 6 , 3 5 (1 9 9 6)]、ハフニア・アルベイ [J . B i o c h e m . , 1 1 9 , 4 6 8 (1 9 9 6)]、ラクトバチルス・デブルキー [M i c r o b i o l o g y , 1 4 0 , 5 2 7 (1 9 9 4)]、バチルス・コアギュランス [J . B a c t e r i o l . , 1 7 4 , 7 9 1 9 (1 9 9 4)]、アエロモナス・ソブリア [J . B i o c h e m . , 1 1 6 , 8 1 8 (1 9 9 4)]、キサントモナス・キャンペストリス (特開平 9 - 1 2 1 8 6 0)、ナイセリア・ゴノレーヤー [M o l . M i c r o b i o l . , 9 , 1 2 0 3 (1 9 9 3)]、プロピオニバクテリウム・フリュデンリチー [A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . , 6 4 , 4 7 3 6 (1 9 9 8)]、セラチア・マルエッセンス [J . B i o c h e m . , 1 2 2 , 6 0 1 (1 9 9 7)]、コリネバクテリウム・パリアピリス [J . A p p l . M i c r o b i o l . , 9 0 , 4 4 9 (2 0 0 1)]、サーモプラズマ・アシドフィラム [F E B S L e t t . , 3 9 8 , 1 0 1 (1 9 9 6)]、シュードモナス・アルギノーサ [N a t u r e , 4 0 6 , 9 5 9 (2 0 0 0)] などプロリンイミノペプチダーゼを生産する微生物としてあげることができる。

さらに、プロリンイミノペプチダーゼを生産する微生物としては、以下の [1] ~ [3] から選ばれる蛋白質、

[1] W O 0 3 / 0 1 0 3 0 7、F E M S M i c r o b i o l . L e t t . , 7 8 , 1 9 1 (1 9 9 9)、特開平 2 - 1 1 3 8 8 7、A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . , 3 3 6 , 3 5 (1 9 9 6)、J . B i o c h e m . , 1 1 9 , 4 6 8 (1 9 9 6)、M i c r o b i o l o g y , 1 4 0 , 5 2 7 (1 9 9 4)、J . B a c t e r i o l . , 1 7 4 , 7 9 1 9 (1 9 9 4)、J . B i o c h e m . , 1 1 6 , 8 1 8 (1 9 9 4)、特開平 9 - 1 2 1 8 6 0、M o l . M i c r o b i o l . , 9 , 1 2 0 3 (1 9 9 3)、A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . , 6 4 , 4 7 3 6 (1 9 9 8)、J . B i o c h e m . , 1 2 2 , 6 0 1 (1 9 9 7)、F E B S L e t t . , 3 9 8 , 1 0 1 (1 9 9 6)、N a t u r e , 4 0 6 , 9 5 9 (2 0 0 0) のいずれかに記載のプロリンイミノペプチダーゼ、

[2] 上記 [1] のいずれかのプロリンイミノペプチダーゼのアミノ酸配列において、1 個以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質、

[3] 上記 [1] のいずれかのプロリンイミノペプチダーゼのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質、

を生産する能力を有する微生物をあげることができる。

L - アミノ酸アミドと L - アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を生産する微生物としては、L - アミノ酸アミドヒドロラーゼを生産する微生物をあげることができ、具体的にはバチルス属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ロドコッカス属、クリセオバクテリウム属、ミクロコッカス属、シュードモナス属、クリプトコッカス属、トリコスボロン属、ロドスポリジウム属、スポロボロマイセス属、トレメラ属、トルラスポラ属、ステリグマトマイセス属、またはロドトルラ属に属する微生物、好ましくはバチルス属、コリネバクテリウム属またはシュードモナス属に属する微生物、より好ましくはバチルス・メガテリウム A J 3 2 8 4 (F E R M B P - 8 0 9 0)、コリネバクテ

10

20

30

40

50

リウム・グルタミカム A T C C 1 3 2 8 6、ミクロコッカス・ルテウス A T C C 9 3 4 1、シュードモナス・サッカロフィラ A T C C 1 5 9 4 6（以上、W O 0 3 / 0 1 0 1 8 7 に記載の微生物）などをあげることができる。

また、L - アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質を生産する微生物としては、以下の [1] または [2] 記載の蛋白質、

[1] W O 0 3 / 0 1 0 1 8 7 記載の L - アミノ酸アミドヒドロラーゼのアミノ酸配列において、1 個以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ L - アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質

[2] W O 0 3 / 0 1 0 1 8 7 記載の L - アミノ酸アミドヒドロラーゼのアミノ酸配列と 8 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ L - アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質を生産する能力を有する微生物、
をあげることができる。

上記において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、ジペプチド合成活性を有する蛋白質は、M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s (1 9 8 9) (以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す)、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s (1 9 8 7 - 1 9 9 7) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 10 , 6 4 8 7 (1 9 8 2)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 79 , 6 4 0 9 (1 9 8 2)、G e n e , 34 , 3 1 5 (1 9 8 5)、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 13 , 4 4 3 1 (1 9 8 5)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 82 , 4 8 8 (1 9 8 5) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 1 9 ~ 2 5 および 6 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質および L - アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質のいずれかの蛋白質をコードする D N A に部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換または付加できる程度の数であり、1 個から数十個、好ましくは 1 ~ 2 0 個、より好ましくは 1 ~ 1 0 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個である。

配列番号 1 9 ~ 2 5 および 6 8 で表されるアミノ酸配列、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質および L - アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質のアミノ酸配列のいずれかにおいて 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたとは、同一配列中の任意の位置において、1 または複数のアミノ酸の欠失、置換または付加があってもよい。

欠失、置換または付加は同時に生じてよく、置換または付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸としては、L - アラニン、L - アスパラギン、L - アスパラギン酸、L - アルギニン、L - グルタミン、L - グルタミン酸、グリシン、L - ヒスチジン、L - イソロイシン、L - ロイシン、L - リジン、L - メチオニン、L - フェニルアラニン、L - プロリン、L - セリン、L - スレオニン、L - トリプトファン、L - チロシン、L - バリン、L - システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A 群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2 - アミノブタン酸、メチオニン、O - メチルセリン、t - プチルグリシン、t - プチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B 群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2 - アミノアジピン酸、2 - アミノスベリン酸

C 群：アスパラギン、グルタミン

D 群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4 - ジアミノブタン酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸

E 群：プロリン、3 - ヒドロキシプロリン、4 - ヒドロキシプロリン

F 群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G 群：フェニルアラニン、チロシン

また、上記した 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加が導入される位置は、該変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛋白質がジペプチド合成活性を有する限り、特に限定されず、例えば配列番号 19 ~ 25 および 68 で表されるアミノ酸配列を比較したとき、該アミノ酸配列中の 1 つ以上のアミノ酸配列において保存されていないアミノ酸残基をあげる事ができる。

10

また、上記した 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質であり、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質としては、配列番号 19 ~ 25 および 68 のいずれかで表されるアミノ酸配列との相同性が、通常は 65 % 以上、好ましくは 80 % 以上、より好ましくは 90 % 以上、特に好ましくは 95 % の相同性を有する蛋白質、プロリンイミノペプチダーゼのアミノ酸配列または L - アミノ酸アミドハイドロラーゼのアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列との相同性が、通常は 80 % 以上、好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上の相同性を有する蛋白質をあげる事ができる。

アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、上記した BLAST または FASTA 等のプログラムを用いて決定することができる。

20

配列番号 33 で表されるアミノ酸配列は、配列番号 19 ~ 25 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の間で保存されている領域であり、かつ各種微生物の Ala - Ala リガーゼ活性を有する蛋白質のコンセンサス配列に対応する領域である。

配列番号 33 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上、好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質であり、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質を生産する微生物もまたジペプチドを生産する微生物である。

配列番号 33 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上、好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質が、ジペプチド合成活性を有する蛋白質であるためには、該蛋白質のアミノ酸配列と配列番号 19 ~ 25 で表されるいずれかのアミノ酸配列との相同性が、少なくとも 80 % 以上、通常は 90 % 以上、特に 95 % 以上の相同性を有していることが好ましい。

30

アミノ酸配列の相同性は、上記した BLAST や FASTA 等のプログラムを用いて決定することができる。

また、1 種以上のアミノ酸を縮合、連結することによりジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードする DNA、L - アミノ酸エステルと L - アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードする DNA、または L - アミノ酸アミドと L - アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードする DNA とベクター DNA を連結して得られる組換え体 DNA を有する微生物もまた本発明の微生物である。

該微生物としては、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属またはサッカロマイセス属に属する微生物をあげる事ができる。

40

1 種以上のアミノ酸を縮合、連結することによりジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードする DNA としては、NRPS、D - Ala - D - Ala リガーゼまたはバシリシン合成酵素をコードする DNA などをあげる事ができる。

NRPS をコードする DNA としては Bac A、Bac B、Bac C、Tyc A、Tyc B、Tyc C および Pcb A B からなる群より選ばれる蛋白質をコードする DNA をあげる事ができる。

D - Ala - D - Ala リガーゼをコードする DNA としては Ddl A、Ddl B および Ddl C からなる群より選ばれる蛋白質をコードする DNA をあげる事ができる。

バシリシン合成酵素をコードする DNA としては、以下の [1] ~ [4] 記載の蛋白質

50

をコードする DNA、

[1] 配列番号 19 ~ 25 および 68 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、

[2] 配列番号 19 ~ 25 および 68 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質、

[3] 配列番号 19 ~ 25 および 68 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 65 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質、

[4] 配列番号 33 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつジペプチドの合成活性を有する蛋白質、

および、以下の [5] ~ [7] 記載の DNA、

[5] 配列番号 26 ~ 32、64 および 65 のいずれかで表される塩基配列を有する DNA、

[6] 配列番号 26 ~ 32、64 および 65 のいずれかで表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする DNA、

[7] 配列番号 34 で表される塩基配列と 80 % 以上の相同性を有する塩基配列を有する DNA であり、かつジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする DNA、
をあげることができる。

L - アミノ酸エステルと L - アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードする DNA としては、以下の [1] ~ [3] 記載の蛋白質をコードする DNA、

[1] WO 03 / 010307、FEMS Microbiol. Lett., 78, 191 (1999)、特開平 2 - 113887、Arch. Biochem. Biophys., 336, 35 (1996)、J. Biochem., 119, 468 (1996)、Microbiology, 140, 527 (1994)、J. Bacteriol., 174, 7919 (1994)、J. Biochem., 116, 818 (1994)、特開平 9 - 121860、Mol. Microbiol., 9, 1203 (1993)、Appl. Environ. Microbiol., 64, 4736 (1998)、J. Biochem., 122, 601 (1997)、FEBS Lett., 398, 101 (1996)、Nature, 406, 959 (2000) のいずれかに記載のプロリンイミノペプチダーゼ、

[2] 上記 [1] のいずれかのプロリンイミノペプチダーゼのアミノ酸配列において、1 個以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質、

[3] 上記 [1] のいずれかのプロリンイミノペプチダーゼのアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する蛋白質、

および以下の [4] または [5] 記載の DNA、

[4] WO 03 / 010307、FEMS Microbiol. Lett., 78, 191 (1999)、特開平 2 - 113887、Arch. Biochem. Biophys., 336, 35 (1996)、J. Biochem., 119, 468 (1996)、Microbiology, 140, 527 (1994)、J. Bacteriol., 174, 7919 (1994)、J. Biochem., 116, 818 (1994)、特開平 9 - 121860、Mol. Microbiol., 9, 1203 (1993)、Appl. Environ. Microbiol., 64, 4736 (1998)、J. Biochem., 122, 601 (1997)、FEBS Lett., 398, 101 (1996)、Nature, 406, 959 (2000) のいずれかに記載の塩基配列を有するプロリンイミノペプチダーゼをコードする DNA、

[5] 上記 [4] のいずれかのプロリンイミノペプチダーゼをコードする DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する

10

20

30

40

50

蛋白質をコードするDNA、
をあげることができる。

L-アミノ酸アミドとL-アミノ酸からジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードするDNAとしては、以下の[1]または[2]記載の蛋白質をコードするDNA、
[1]WO03/010187記載のL-アミノ酸アミドヒドロラーゼのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質、

[2]WO03/010187記載のL-アミノ酸アミドヒドロラーゼのアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質、

10

および以下の[3]または[4]記載のDNA、

[3]WO03/010187記載の塩基配列を有するL-アミノ酸アミドヒドロラーゼをコードするDNA、

[4]WO03/010187記載の塩基配列からなるL-アミノ酸アミドヒドロラーゼをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA、
をあげることができる。

上記のストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記のいずれかのDNAの一部、または全部をプローブとして、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あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/l、好ましくは0.9mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度、好ましくは0.1倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/lの塩化ナトリウム、および15mmol/lのクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に起載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、上記したBLASTおよびFASTA等のプログラムを用いて、上記パラメーターに基づいて計算したときに、上記したいずれかのDNAの塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

20

30

上記したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが、ジペプチドの合成活性を有する蛋白質をコードするDNAであることは、該DNAを発現する組換えDNAを作製し、該組換えDNAを宿主細胞に導入して得られる微生物を酵素源に用い、1)該酵素源および1種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドが生成、蓄積するか否かをHPLC等により分析する方法、2)該酵素源、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドが生成、蓄積するか否かをHPLC等により分析する方法、3)該酵素源、L-アミノ酸アミドおよびL-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドが生成、蓄積するか否かをHPLC等により分析する方法、によって確認することができる。

40

塩基配列の相同性は、上記したBLASTまたはFASTA等のプログラムを用いて決定することができる。

2. 本発明の微生物の製造法

本発明の微生物は、1)1種以上のペプチダーゼおよび1種以上のペプチド取り込み活性を有する蛋白質の機能が低下または喪失した微生物、または3種以上のペプチダーゼの

50

機能が低下または喪失した微生物に、ジペプチド生産能を付与する方法、または2)ジペプチドを生産する能力を有する微生物の、a)1種以上のペプチダーゼおよび1種以上のペプチド取り込み蛋白質、またはb)3種以上のペプチダーゼ、の機能を低下または喪失させる方法のいずれの方法によっても取得することができる。

(1)1種以上のペプチダーゼおよび1種以上のペプチド取り込み蛋白質の機能が低下または喪失した微生物、または3種以上のペプチダーゼの機能が低下または喪失した微生物に、ジペプチド生産能を付与する方法

(i)ペプチダーゼ、ペプチド取り込み蛋白質の活性が低下または喪失した微生物の製造
ペプチダーゼ、ペプチド取り込み蛋白質の活性が低下または喪失した微生物は、該微生物を取得できる方法であれば、その取得方法に制限はないが、例えば以下に示す微生物の染色体DNAのペプチダーゼ遺伝子やペプチド取り込み蛋白質遺伝子に塩基の欠失、置換または付加を導入する方法により取得することができる。

微生物の染色体DNAの遺伝子に塩基の欠失、置換または付加を導入する方法としては、相同組換えを利用した方法をあげることができる。一般的な相同組換えを利用した方法としては、塩基の欠失、置換または付加が導入された変異遺伝子を、塩基の欠失等を導入したい宿主細胞内では自立複製できない薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドDNAと連結して作製できる相同組換え用プラスミドを用いる方法をあげることができる。

該相同組換え用プラスミドを常法により宿主細胞に導入した後、薬剤耐性を指標にして相同組換えによって染色体DNA上に該相同組換え用プラスミドが組込まれた形質転換株を選択する。得られた形質転換株を該薬剤を含有しない培地で数時間~1日間培養した後、該薬剤含有寒天培地、および該薬剤非含有寒天培地に塗布し、前者の培地で生育せず、後者の培地で生育できる株を選択することで、染色体DNA上において2回目の相同組換えが生じた株を取得することができる。染色体DNA上の欠失等を導入した遺伝子が存在する領域の塩基配列を決定することで、染色体DNA上の目的遺伝子に塩基の欠失、置換または付加が導入されたことを確認することができる。

上記方法により、染色体DNA上の目的遺伝子に塩基の欠失、置換または付加を導入することができる微生物としては、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属、またはサッカロマイセス属に属する微生物をあげることができる。

また、複数の遺伝子に効率よく塩基の欠失、置換または付加を導入する相同組換えを利用した方法としては、直鎖DNAを用いた方法をあげることができる。

具体的には、塩基の欠失、置換または付加を導入したい遺伝子を含有する直鎖DNAを細胞内に取り込ませ、染色体DNAと導入した直鎖DNAとの間で相同組換えを起こさせる方法である。本方法は、直鎖DNAを効率よく取り込む微生物であれば、いずれの微生物にも適用でき、好ましい微生物としてはエシェリヒア属またはバチルス属に属する微生物、より好ましくはエシェリヒア・コリ、さらに好ましくはλファージ由来の組換えタンパク質群(Red組換え系)を発現しているシェリヒア・コリをあげることができる。

λRed組換え系を発現しているエシェリヒア・コリとしては、λRed組換え系遺伝子を有するプラスミドDNAであるpKD46[エシェリヒア・コリ ジェネティックストック センター(米国エール大学)より入手可能]を保有するエシェリヒア・コリJM101株等をあげることができる。

相同組換えに用いられるDNAとしては、

(a)塩基の欠失、置換または付加の導入対象である染色体DNA上の領域の両外側に存在するDNAまたは該DNAと相同性を有するDNAを、薬剤耐性遺伝子の両端に有する直鎖DNA、

(b)塩基の欠失、置換または付加の導入対象である染色体DNA上の領域の両外側に存在するDNAまたは該DNAと相同性を有するDNAを直接連結した直鎖DNA、

(c)塩基の欠失、置換または付加の導入対象である染色体DNA上の領域の両外側に存在するDNAまたは該DNAと相同性を有するDNAを、薬剤耐性遺伝子およびネガティブセレクションに用いることができる遺伝子の両端に有する直鎖DNA、

(d)上記(a)の直鎖DNAにおいて、薬剤耐性遺伝子と染色体DNA上の領域の両外

10

20

30

40

50

側に存在するDNAまたは該DNAと相同性を有するDNAの間に、さらに酵母由来のFlp recombinase [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 5875 (1985)] が認識する塩基配列を有するDNA、
をあげることができる。

薬剤耐性遺伝子としては、宿主微生物が感受性を示す薬剤に対し、薬剤耐性を付与する薬剤耐性遺伝子であれば、いずれの薬剤耐性遺伝子も使用することができる。宿主微生物にエシェリヒア・コリを用いた場合は、薬剤耐性遺伝子としては、例えば、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子等をあげることができる。

10

ネガティブセレクションに用いることができる遺伝子とは、宿主微生物で該遺伝子を発現させたとき、一定培養条件下においては、該微生物に致死性である遺伝子のことをいい、該遺伝子としては例えば、バチルス属に属する微生物由来のsacB遺伝子 [Appl. Environ. Microbiol., 59, 1361-1366 (1993)]、およびエシェリヒア属に属する微生物由来のrpsL遺伝子 [Genomics, 72, 99-104 (2001)] 等をあげることができる。

上記の直鎖DNAの両末端に存在する、染色体DNA上の置換または欠失の導入対象となる領域の両端の外側に位置するDNAまたは該DNAと相同性を有するDNAは、直鎖DNAにおいて、染色体DNA上の方向と同じ方向に配置され、その長さは10bp~100bp程度が好ましく、20bp~50bp程度がより好ましく、30~40bp程度
がさらに好ましい。

20

酵母由来のFlp recombinaseが認識する塩基配列とは、該蛋白質が認識し、相同組換えを触媒する塩基配列であれば、特に限定されないが、好ましくは配列番号39で表される塩基配列を有するDNA、および該DNAにおいて1個~数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつ酵母由来のFlp recombinaseが認識し、相同組換えを触媒する塩基配列を有するDNAをあげることができる。

相同性を有するDNAとは、上記直鎖DNAが、染色体DNA上の目的とする領域において、相同組換えが起こる程度の同一性を有するDNAのことであり、具体的な相同性としては、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは100%の相同性を有するDNAをあげることができる。

30

上記塩基配列の相同性は、上記したBLASTやFASTA等のプログラムを用いて決定することができる。

上記直鎖DNA断片は、PCRにより作製することができる。また上記直鎖DNAを含むDNAをプラスミド上にて構築した後、制限酵素処理にて目的の直鎖DNAを得ることもできる。

微生物の染色体DNAに塩基の欠失、置換または付加を導入する方法としては、以下の方法1~4があげられる。

方法1：上記(a)または(d)の直鎖DNAを宿主微生物に導入し、薬剤耐性を指標に該直鎖DNAが染色体DNA上に相同組換えにより挿入された形質転換株を選択する方法。

40

方法2：上記方法1により取得された形質転換株に、塩基の欠失、置換または付加の導入対象である染色体DNA上の領域の両外側に存在するDNAまたは該DNAと相同性を有するDNAを直接連結したDNAを導入し、該方法により染色体DNA上に挿入された薬剤耐性遺伝子を削除することにより、微生物の染色体DNA上の領域を置換または欠失させる方法。

方法3：

[1] 上記(c)の直鎖DNAを宿主微生物に導入し、薬剤耐性を指標に該直鎖DNAが染色体DNA上に相同組換えにより挿入された形質転換株を選択する、

[2] 染色体DNA上の置換または欠失の対象領域の両端の外側に位置するDNAと相同性を有するDNAを、染色体DNA上における方向と同一の方向で連結したDNAを合成

50

し、上記〔１〕で得られた形質転換株に導入する、

〔３〕ネガティブセレクションに用いることができる遺伝子が発現する条件下において、上記〔２〕の操作を行った形質転換株を培養し、該培養において生育可能な株を、薬剤耐性遺伝子およびネガティブセレクションに用いることができる遺伝子が染色体DNA上から削除された株として選択する方法。

方法４：

〔１〕上記（ｄ）の直鎖DNAを宿主微生物に導入し、薬剤耐性を指標に該直鎖DNAが染色体DNA上に相同組換えにより挿入された形質転換株を選択する、

〔２〕上記〔１〕で得られた形質転換株にFlp recombinase遺伝子発現プラスミドを導入し、該遺伝子を発現させた後、上記〔１〕で用いた薬剤に感受性である株

10

を取得する方法。
上記方法で用いられる、直鎖DNAを宿主微生物に導入する方法としては、該微生物へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法（特開昭63-248394）、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

方法２または方法３〔２〕で用いられるDNAにおいて、該DNAの中央部付近に、染色体DNA上に挿入したい任意の遺伝子を組み込んだDNAを用いることにより、薬剤耐性遺伝子等を削除すると同時に、任意の遺伝子を染色体DNA上に挿入することが

20

できる。
上記方法２～４では、最終的に得られる形質転換株の染色体DNA上には薬剤耐性遺伝子およびネガティブセレクションに用いることができる遺伝子等の外来遺伝子を残さない方法であるため、該方法を用いることにより、同一の薬剤耐性遺伝子およびネガティブセレクションに用いることができる遺伝子を用いて、方法２、方法３〔１〕～〔３〕、および方法４〔１〕〔２〕の操作を繰り返すことにより、容易に染色体DNA上の位置の異なる２以上の領域に塩基の欠失、置換または付加を有する微生物を製造することができる。

（ii）ジペプチドを生産する能力を付与する方法

上記（i）で用いた微生物に、ジペプチドを生産する能力を付与する方法としては、例えば以下の方法をあげることができる。

30

（a）ジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードするDNAの調製

上記したジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードするDNAは、該DNAの塩基配列情報を利用し、以下に記載する方法により取得することができる。

例えば、バシリシン合成酵素をコードするDNAを取得する方法としては、配列番号26～32、64および65のいずれかで表される塩基配列に基づき設計することができるプローブを用いた、バチルス属に属する微生物の染色体DNAライブラリーに対するザンハイブリダイゼーション法、または配列番号26～32、64および65のいずれかで表される塩基配列に基づき設計することができるプライマーDNAを用いた、バチルス属に属する微生物の染色体DNAを鋳型としたPCR[PCR Protocols, Academic Press (1990)]等をあげることができる。

40

また、各種の遺伝子配列データベースに対して配列番号19～25、33および68のいずれかで表されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列と65%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する配列を検索し、該検索によって得られた塩基配列に基づき、該塩基配列を有する生物の染色体DNA、cDNAライブラリー等から上記した方法によりジペプチドを合成する活性を有する蛋白質をコードするDNAを取得することもできる。

取得したDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後、常法によりベクターに組み込み、組換え体DNAを取得し、該組換え体DNAをエシェリヒア・コリに導入して得られる形質転換体からプラスミドDNAを抽出して、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74,

50

5 4 6 3 (1 9 7 7)] あるいは 3 7 3 A ・ DNA シークエンサー (パーキン・エルマー社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

塩基配列を決定した結果、取得された DNA が部分長であった場合は、該部分長 DNA をプローブに用いた、染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション法により、全長 DNA を取得することができる。

更に、決定された DNA の塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8 9 0 5 型 DNA 合成装置等を用いて化学合成することにより目的とする DNA を調製することもできる。

上記のようにして取得される DNA として、例えば、配列番号 2 6 ~ 3 2 、 6 4 および 6 5 で表される塩基配列を有する DNA をあげることができる。

該 DNA を組み込むベクターとしては、p B l u e s c r i p t I I K S (+) (ストラタジーン社製) 、 p D I R E C T [N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 8 , 6 0 6 9 (1 9 9 0)] 、 p C R - S c r i p t A m p S K (+) (ストラタジーン社製) 、 p T 7 B l u e (ノバジェン社製) 、 p C R I I (インビトロジェン社製) および p C R - T R A P (ジーンハンター社製) などあげることができる。

エシェリヒア・コリとしては、例えば、エシェリヒア・コリ X L 1 - B l u e 、エシェリヒア・コリ X L 2 - B l u e 、エシェリヒア・コリ D H 1 、エシェリヒア・コリ M C 1 0 0 0 、エシェリヒア・コリ K Y 3 2 7 6 、エシェリヒア・コリ W 1 4 8 5 、エシェリヒア・コリ J M 1 0 1 、エシェリヒア・コリ J M 1 0 9 、エシェリヒア・コリ H B 1 0 1 、エシェリヒア・コリ N o . 4 9 、エシェリヒア・コリ W 3 1 1 0 、エシェリヒア・コリ N Y 4 9 、エシェリヒア・コリ M P 3 4 7 、エシェリヒア・コリ N M 5 2 2 、エシェリヒア・コリ M E 8 4 1 5 等をあげることができる。

組換え体 DNA の導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , 6 9 , 2 1 1 0 (1 9 7 2)] 、プロトプラスト法 (特開昭 6 3 - 2 4 8 3 9 4) 、エレクトロポレーション法 [N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 6 , 6 1 2 7 (1 9 8 8)] 等をあげることができる。

上記方法によって得られるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする DNA を保有する微生物としては、後述する配列番号 1 9 で表される配列を有する DNA を含有する組換え体 DNA を保有する微生物であるエシェリヒア・コリ N M 5 2 2 / p P E 4 3 をあげることができる。

(b) ジペプチド合成活性を有する蛋白質の生産

ジペプチド合成活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、上記 (a) の方法により取得した DNA を宿主細胞中で発現させて、生産することができる。

上記 (a) の方法により取得した DNA をもとにして、必要に応じて、ジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることができる。

該 DNA 断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体 DNA を作製する。

該組換え体 DNA を、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ジペプチド合成活性を有する蛋白質を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌および酵母等、目的とする遺伝子を発現できる微生物であればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、ジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

10

20

30

40

50

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、ジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNAを有する組換え体DNAは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA、転写終結配列より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガー・マンハイム社製）、pHelix1（ロシュ・ダイアグノスティクス社製）、pKK233-2（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pET-3（ノバジェン社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(+), pBluescript II KS(-)（ストラタジーン社製）、pTrs30 [エシェリヒア・コリJM109 / pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [エシェリヒア・コリJM109 / pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pPAC31 (WO98/12343)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造桂製）、pPA1（特開昭63-233798）等を例示することができる。

プロモーターとしては、エシェリヒア・コリ等の宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（P_{trp}）、lacプロモーター（P_{lac}）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、エシェリヒア・コリやファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

プロモーターとしては、バチルス属細菌中で発現させるためのxylAプロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 594-599 (1991)] やコリネバクテリウム属細菌中で発現させるためのP54-6プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)] など用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18核酸）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

ジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNAを発現ベクターに結合させた組換え体DNAにおいては、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

このような組換え体DNAとしては、例えば後述するpPE43をあげることができる。

宿主細胞として用いる原核生物としては、エシェリヒア属、バチルス属、またはコリネバクテリウム属などに属する微生物、例えば、エシェリヒア・コリXL1-Blue、エシェリヒア・コリXL2-Blue、エシェリヒア・コリDH1、エシェリヒア・コリDH5α、エシェリヒア・コリMC1000、エシェリヒア・コリKY3276、エシェリヒア・コリW1485、エシェリヒア・コリJM101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリNo. 49、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリNY49、エシェリヒア・コリMP347、エシェリヒア・コリNM522、バチルス・サチリスATCC33712、バチルス・メガテリウム（Bacillus megaterium）、バチルス・エスピー（Bacillus sp.）FERM BP-6030、バチルス・アミロリケファシエンス（Bacillus

lus amyloliquefaciens)、バチルス・コアギュランス(Bacillus coagulans)、バチルス・リケニフォルミス(Bacillus licheniiformis)、バチルス・プミルス(Bacillus pumilus)、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14297 等をあげることができる。

組換え体 DNA の導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

10

サッカロマイセス属に属する菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC 37115)、YEp24 (ATCC 37051)、YCp50 (ATCC 37419)、pHS19、pHS15 等を用いることができる。

プロモーターとしては、サッカロマイセス属に属する菌株中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属等に属する菌株をあげることができ、具体的には、サッカロマイセス・セレビスエ等をあげることができる。

20

組換え体 DNA の導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

(2) ジペプチドを生産する能力を有する微生物の、a) 1 個以上のペプチダーゼおよび 1 個以上のペプチド取り込み系蛋白質、または b) 3 個以上のペプチダーゼ、の機能を低下または喪失させる方法

任意の微生物を宿主細胞に用いて、上記 (1) の (ii) の方法を実施することにより、ジペプチドを生産する能力を有する微生物を製造することができるので、該微生物を用いて、上記 (1) の (i) の方法を実施することにより、1 個以上のペプチダーゼと 1 個以上のペプチド取り込み系蛋白質、または 3 個以上のペプチダーゼの機能が低下または喪失した微生物であり、かつジペプチドを生産する能力を有する微生物を製造することができる。

30

また、本来の性質としてジペプチドを生産する能力を有する微生物は、該微生物に対し、上記 (1) の (i) の方法を実施することにより、本発明の微生物を製造することができる。

上記微生物としては、エシェリヒア属、バチルス属、コリネバクテリウム属またはサッカロマイセス属に属する微生物などをあげることができ、より好ましくはエシェリヒア・コリ、バチルス・サチリス、コリネバクテリウム・グルタミカムおよびサッカロマイセス・セレビスエなどをあげることができる。

40

3. 本発明のジペプチドの製造法

本発明の製造法としては、

(i) 本発明の微生物の培養物または培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、および 1 種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法、

(ii) 本発明の微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、L-アミノ酸エステルおよび L-アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法、および

50

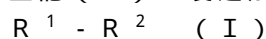
(i i i) 本発明の微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、
L - アミノ酸アミドおよびL - アミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペ
プチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取するジペプチドの製造法、
などをあげることができる。

上記 (i) の製造法において、基質に用いられる1種以上のアミノ酸、好ましくは1種
または2種のアミノ酸としては、アミノ酸、好ましくはL - アミノ酸、グリシン (Gly)
およびβ - アラニン (β Ala) からなる群より選ばれるアミノ酸であれば、いずれの
アミノ酸をいずれの組み合わせで用いてもよい。L - アミノ酸としては、例えばL - アラ
ニン (L - Ala)、L - グルタミン (L - Gln)、L - グルタミン酸 (L - Glu)
、L - バリン (L - Val)、L - ロイシン (L - Leu)、L - イソロイシン (L - Ile)
、L - プロリン (L - Pro)、L - フェニルアラニン (L - Phe)、L - トリ
プトファン (L - Trp)、L - メチオニン (L - Met)、L - セリン (L - Ser)
、L - スレオニン (L - Thr)、L - システイン (L - Cys)、L - アスパラギン (L - Asn)
、L - チロシン (L - Tyr)、L - リジン (L - Lys)、L - アルギニン (L - Arg)
、L - ヒスチジン (L - His)、L - アスパラギン酸 (L - Asp)
、L - α - アミノ酪酸 (L - α - AB)、L - アザセリン (L - Azaserine)、
L - テアニン (L - theanine)、L - 4 - ヒドロキシプロリン (L - 4 - HYP)
、L - 3 - ヒドロキシプロリン (L - 3 - HYP)、L - オルニチン (L - Orn)、
L - シトルリン (L - Cit) およびL - 6 - ジアゾ - 5 - オキソノルロイシン (L - 6 -
- diazo - 5 - oxo - norleucine) などをあげることができる。

上記 (i) の製造法に用いられる、より好ましいアミノ酸としては、L - Ala、Gly
、L - Met、L - Ser、L - Thrおよびβ - Alaから選ばれる1種のアミノ酸
とL - Ala、L - Gln、L - Glu、Gly、L - Val、L - Leu、L - Ile
、L - Pro、L - Phe、L - Trp、L - Met、L - Ser、L - Thr、L - Cys
、L - Asn、L - Tyr、L - Lys、L - Arg、L - His、L - Asp、L
- α - AB、β - Ala、L - Azaserine、L - theanine、L - 4 - HYP
、L - 3 - HYP、L - Orn、L - CitおよびL - 6 - diazo - 5 - oxo
- norleucineから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L - GlnとL - Phe
の組み合わせ、およびL - α - ABとL - Gln、L - ArgまたはL - α - ABの
組み合わせ、さらに好ましくはL - AlaとL - Ala、L - Gln、Gly、L - Val
、L - Leu、L - Ile、L - Phe、L - Trp、L - Met、L - Ser、L - Thr
、L - Cys、L - Asn、L - Tyr、L - Lys、L - Arg、L - His、
L - α - AB、L - Azaserine、L - CitおよびL - theanineから選
ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、GlyとL - Gln、Gly、L - Phe、L - Trp
、L - Met、L - Ser、L - Thr、L - Cys、L - Tyr、L - Lys、L
- Arg、L - α - ABおよびL - Citから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L
- MetとL - Phe、L - Met、L - Ser、L - Thr、L - Cys、L - Tyr
、L - LysおよびL - Hisから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L - Serと
L - Gln、L - Phe、L - Ser、L - Thr、L - Tyr、L - HisおよびL
- α - ABから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L - ThrとL - Gln、L - Phe
、L - Leu、L - ThrおよびL - α - ABから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わ
せ、L - GlnとL - Pheの組み合わせ、β - AlaとL - Phe、L - Met、L - His
およびL - Citから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、およびL - α - AB
とL - Gln、L - ArgまたはL - α - ABの組み合わせをあげることができる。

上記 (i) の製造法において、基質として用いるアミノ酸は、0 . 1 ~ 500 g / L、
好ましくは0 . 2 ~ 200 g / Lの濃度になるように水性媒体中に初発または反応途中に
添加する。

上記 (i) の製造法で製造されるジペプチドとしては、下式 (I)



(式中、R¹ およびR² は、同一または異なってアミノ酸を表す) で表されるジペプチド

をあげることができ、好ましくは、上記式 (I) において R^1 および R^2 が同時にまたは異なって、L-Ala、L-Gln、L-Glu、Gly、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Pro、L-Phe、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Asn、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L-His、L-Asp、L- α -AB、 β -Ala、L-Azaserine、L-theanine、L-4-HYP、L-3-HYP、L-OrnおよびL-6-diazo-5-oxo-norleucineから選ばれるアミノ酸であるジペプチドをあげることができ、より好ましくは R^1 がL-Ala、Gly、L-Met、L-Ser、L-Thrまたは β -Alaの場合は、 R^2 がL-Gln、L-Glu、Gly、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Pro、L-Phe、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Asn、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L-His、L-Asp、L- α -AB、 β -Ala、L-Azaserine、L-theanine、L-4-HYP、L-3-HYP、L-OrnまたはL-6-diazo-5-oxo-norleucineであるジペプチドをあげることができ、さらに好ましくは、 R^1 がL-Alaの場合は、 R^2 はL-Gln、Gly、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Phe、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Asn、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L-His、L- α -AB、L-AzaserineまたはL-theanineであるジペプチド、 R^1 がGlyの場合は、 R^2 はL-Gln、Gly、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Tyr、L-Lys、L-ArgまたはL- α -ABであるジペプチド、 R^1 がL-Metの場合は、 R^2 はL-Phe、L-Met、L-Cys、L-Tyr、L-LysまたはL-Hisであるジペプチド、 R^1 がL-Serの場合は、 R^2 はL-Gln、Gly、L-Phe、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Tyr、L-HisまたはL- α -ABであるジペプチド、 R^1 がL-Thrの場合は、 R^2 はL-Gln、L-Gly、L-Phe、L-Met、L-Ser、L-ThrまたはL- α -ABであるジペプチド、 R^1 がL-Glnの場合は、 R^2 はL-PheまたはL- α -ABであるジペプチド、 R^1 がL-Pheの場合は、 R^2 はL-Glnであるジペプチド、 R^1 がL-Trpの場合は、 R^2 はGlyであるジペプチド、 R^1 がL-Cysの場合は、 R^2 はL-Ala、L-Gln、Gly、またはL-Metであるジペプチド、 R^1 がL-Lysの場合は、 R^2 はL-Ala、GlyまたはL-Metであるジペプチド、 R^1 がL-Argの場合は、 R^2 はL- α -ABであるジペプチド、 R^1 がL-Hisである場合は、 R^2 はL-Metであるジペプチド、および R^1 がL- α -ABの場合は、 R^2 はL-Ala、L-Gln、Gly、L-Ser、L-Thr、L-ArgまたはL- α -ABであるジペプチドをあげることができる。

また上記製造法においては、必要に応じて、ATPの供給源として、本発明の微生物が代謝してATPを生産し得る化合物、例えばグルコースのような糖類、エタノールのようなアルコール類、酢酸のような有機酸類などを水性媒体中に加えることができる。

上記(ii)の製造法において、基質に用いられるL-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸としては、本発明の微生物が基質に用いてジペプチドを生成することができるL-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸であれば、いずれのL-アミノ酸エステルとL-アミノ酸をいずれの組み合わせで用いてもよく、好ましくはL-アミノ酸エステルが、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギン酸- γ -エステル、L-リジンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステルおよびL-グルタミン- γ -エステルからなる群より選ばれるL-アミノ酸エステルであり、L-アミノ酸がL-Gln、L-Asn、Gly、L-Ala、L-Leu、L-Met、L-Pro、L-Phe、L-Trp、L-Ser、L-Thr、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L-HisおよびL-Gluか

10

20

30

40

50

らなる群より選ばれる L - アミノ酸をあげることができる。

上記 (i i) の製造法において、基質として用いる L - アミノ酸エステルおよび L - アミノ酸は、0 . 1 ~ 5 0 0 g / L、好ましくは 0 . 2 ~ 2 0 0 g / L の濃度になるように水性媒体中に初発または反応途中に添加する。

上記 (i i i) の製造法において、基質に用いられる L - アミノ酸アミドおよび L - アミノ酸としては、本発明の微生物が基質に用いてジペプチドを生成することができる L - アミノ酸アミドおよび L - アミノ酸であれば、いずれの L - アミノ酸アミドと L - アミノ酸をいずれの組み合わせで用いてもよく、好ましくは L - アミノ酸アミドが、L - アラニンアミド、グリシンアミドおよび L - アスパラギン酸アミドからなる群より選ばれる L - アミノ酸アミドであり、L - アミノ酸が L - G l n、L - A s n、G l y、L - A l a、
L - V a l、L - L e u、L - I l e、L - M e t、L - P r o、L - P h e、L - T r p、L - S e r、L - T h r、L - T y r、L - L y s、L - A r g、L - H i s および
L - G l u からなる群より選ばれる L - アミノ酸をあげることができる。

10

上記 (i i i) の製造法において、基質として用いる L - アミノ酸アミドおよび L - アミノ酸は、0 . 1 ~ 5 0 0 g / L、好ましくは 0 . 2 ~ 2 0 0 g / L の濃度になるように水性媒体中に初発または反応途中に添加する。

本発明の製造法で用いられる水性媒体としては、ジペプチドの生成反応を阻害しない限り、いかなる成分、組成の水性媒体であってもよく、例えば、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液などをあげることができる。また、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類を含有していてもよい。

20

ジペプチドの生成反応は水性媒体中、p H 5 ~ 1 1、好ましくは p H 6 ~ 1 0、2 0 ~ 6 0、好ましくは 2 5 ~ 4 5 の条件で 2 ~ 1 5 0 時間、好ましくは 6 ~ 1 2 0 時間行う。

さらに必要に応じて、水性媒体中に界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミン S - 2 1 5、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオン F 2 - 4 0 E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミン F B、日本油脂社製）などの三級アミン類など、ジペプチドの生成を促進するものであればいずれでもよく、1 種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常 0 . 1 ~ 5 0 g / l の濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどがあげられ、通常 0 . 1 ~ 5 0 m l / l の濃度で用いられる。

30

培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、および該菌体の固定化物などをあげることができる。また、本発明の培養物の処理物には、上記菌体を界面活性剤処理、超音波処理、機械的摩砕処理、溶媒処理または酵素処理等して得られる処理物から、不溶物等を除いて得られる蛋白質の粗抽出物も含まれる。

40

培養物または該培養物の処理物を酵素源として用いる場合、該酵素源の量は、当該酵素源の比活性等により異なるが、例えば、基質であるアミノ酸、L - アミノ酸エステルまたは L - アミノ酸アミド 1 m g あたり 5 ~ 1 0 0 0 m g、好ましくは 1 0 ~ 4 0 0 m g 添加する。

水性媒体中に生成、蓄積したジペプチドの採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法あるいは、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

その他、上記 (i i) および (i i i) の製造法は、W O 0 3 / 0 1 0 1 8 9 または W O 0 3 / 0 1 0 1 8 7 の記載に準じて行うことができる。

50

以下に、本発明の実験例を示す。

実験例 1 バチルス・サチリス由来の y w f E 遺伝子発現プラスミドの造成

バチルス・サチリスの y w f E 遺伝子断片を以下のようにして取得した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて、配列番号 35 および配列番号 36 で表される塩基配列を有する DNA (以下、それぞれプライマー A、プライマー B と呼ぶ) を合成した。プライマー A は、y w f E 遺伝子の開始コドン (a t g) を N c o I 認識配列 (c c a t g g) に置換した領域を含む塩基配列である。プライマー B は、y w f E の終止コドンを B a m H I 認識配列 (g g a t c c) に置換した領域を含む塩基配列である。

バチルス・サチリスの染色体 DNA を鋳型とし、上記プライマー A およびプライマー B をプライマーセットとして用いた PCR を行った。PCR は、0.1 μ g の染色体 DNA、0.5 μ mol/L の各プライマー、2.5 units の P f u DNA ポリメラーゼ、4 μ L の P f u DNA ポリメラーゼ用 $\times 10$ 緩衝液、200 μ mol/L の各 d N T P を含む反応液 40 μ L を調製し、94 で 1 分間、55 で 2 分間、72 で 3 分間の工程を 30 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1/10 量をアガロース電気泳動し、y w f E 遺伝子断片に相当する約 1.4 kb の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 に 30 分間放置した。該溶液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。該 DNA の沈殿を 20 μ L の TE に溶解した。

該溶解液 5 μ L を用い、増幅した DNA を制限酵素 N c o I および B a m H I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キット (B I O 101 社製) により、y w f E 遺伝子を含む 1.4 kb の DNA 断片を回収した。

C 末端 H i s タグ付加型組換え体発現ベクター p Q E 60 (キアゲン社製) 0.2 μ g を制限酵素 N c o I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、上記と同様の方法により 3.4 kb の DNA 断片を回収した。

上記で得られた y w f E 遺伝子を含む 1.4 kb の DNA 断片と 3.4 kb の DNA 断片をライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて、16 で 16 時間反応させ連結した。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株 (ストラタジーン社製) をカルシウムイオンを用いる方法 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , 69 , 2110 (1972)] によって形質転換し、該形質転換体を 50 μ g/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布後、30 で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーから公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、C 末 H i s タグ付加型 y w f E 遺伝子発現ベクターである p Q E 60 y w f E を得た。該ベクターの構造を制限酵素消化により確認した (図 1)。

実験例 2 y w f E 遺伝子産物の取得

p Q E 60 y w f E を保有するエシェリヒア・コリ NM522 / p Q E 60 y w f E 株を 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 8 mL の LB 培地の入った太型試験管に接種し 28 で 17 時間培養した。該培養液を 50 μ g/mL のアンピシリンを含む 50 mL の LB 培地の入った 250 mL 容三角フラスコに接種し 30 で 3 時間培養した後、終濃度が 1 mmol/L になるようにイソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) を添加し、さらに 30 で 4 時間培養した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体から、H i s T r a p (H i s タグ付加タンパク精製キット、A m e r s h a m P h a r m a s i a B i o t e c h 社製) を用いて、説明書に従い H i s タグ付加組換え型酵素を精製した。

実験例 3 H i s タグ付加組換え型酵素を用いたジペプチドの生産 (1)

(i) 実験例 2 で取得した精製した H i s タグ付加組換え型酵素 0.04 mg、100 mmol/L の T r i s - H C l (p H 8.0)、60 mmol/L の塩化マグネシウム、

10

20

30

40

50

60 mmol / L の ATP、30 mmol / L の L - Ala、30 mmol / L の L - Gln からなる 0.1 ml の反応液を調製し、37 で 16 時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をジニトロフェノール化法で誘導体化した後に HPLC 法により分析した。HPLC 法による分析は、分離カラムに関東化学社製の Lichrosorb - RP - 18 カラムを用い、溶離液として 1% (v/v) リン酸、25% (v/v) アセトニトリルを用い、0.7 ml / 分の流動速度で行った。反応液中に 3.7 g / L の L - Ala - L - Gln と 0.3 g / L の L - アラニル - L - アラニン (L - Ala - L - Ala) が生成蓄積していることを確認した。

(ii) 酵素を 0.01 mg、L - Gln の代わりに L - Phe、L - Met、L - Leu または L - Val を含有する以外は、上記 (i) の反応液の組成と同じ反応液を調製し、上記 (i) の反応条件で反応させた。

10

反応終了後、上記 (i) と同様の方法により反応生成物を分析し、反応液中にそれぞれ、7.0 / L の L - アラニル - L - フェニルアラニン (L - Ala - L - Phe) のみ、7.0 g / L の L - アラニル - L - メチオニン (L - Ala - L - Met) および 0.03 g / L の L - Ala - L - Ala、5.0 g / L の L - アラニル - L - ロイシン (L - Ala - L - Leu) および 0.2 g / L の L - Ala - L - Ala、または 1.6 g / L の L - アラニル - L - バリン (L - Ala - L - Val) および 0.3 g / L の L - Ala - L - Ala が生成蓄積していることを確認した。

(iii) 酵素を 0.01 mg、L - Ala の代わりに Gly、L - Gln の代わりに L - Phe または L - Met を含有する以外は、上記 (i) の反応液の組成と同じ反応液を調製し、上記 (i) の反応条件で反応させた。

20

反応終了後、上記 (i) と同様の方法により反応生成物を分析し、反応液中にそれぞれ 5.2 g / L のグリシル - L - フェニルアラニン (Gly - L - Phe) または 1.1 g / L のグリシル - L - メチオニン (Gly - L - Met) が生成蓄積していることを確認した。

上記反応液組成から ATP を除くとジペプチドは全く生成されなかった。

以上の結果から、ywfE 遺伝子産物は、ATP 存在下において、L - Ala と L - Gln、L - Phe、L - Met、L - Leu または L - Val とから、L - Ala - L - Gln および L - Ala - L - Ala、L - Ala - L - Phe、L - Ala - L - Met および L - Ala - L - Ala、L - Ala - L - Leu および L - Ala - L - Ala、または L - Ala - L - Val および L - Ala - L - Ala を生成する活性、Gly と L - Phe または L - Met とから Gly - L - Phe または Gly - L - Met を生成する活性を有することが明らかになった。

30

実験例 4 His タグ付加組換え型酵素を用いたジペプチドの生産 (2)

実験例 2 で得られた精製した His タグ付加組換え型酵素 0.04 mg、100 mmol / L の Tris - HCl (pH 8.0)、60 mmol / L の塩化マグネシウム、60 mmol / L の ATP からなる 0.1 ml の反応液を調製し、表 1 の第 1 行目と最左列のアミノ酸の組み合わせからなる各種 L - アミノ酸、Gly または β - Ala をそれぞれ 30 mmol / L ずつになるように反応液に添加し、37 で 16 時間反応を行った。反応終了後、反応生成物を HPLC 分析したところ、第 1 表に示すジペプチドが生成していることが確認された。

40

第1表-1

	Ala	Gln	Glu	Gly	Val	Leu	Ile	Pro
Ala	AlaAla	AlaGln AlaAla	AlaAla	AlaGly AlaAla	AlaVal AlaAla	AlaLeu AlaAla	AlaIle AlaAla	AlaAla
Gln		×	×	GlyGln GlyGly	×	×	×	×
Glu				GlyGly				
Gly				GlyGly				GlyGly
Val								
Leu								
Ile								
Pro								
Phe								
Trp								
Met								
Ser								
Thr								
Cys								
Asn								
Tyr								
Lys								
Arg								
His								
Asp								
α AB								
β -Ala								
Cit								

10

20

30

第1表-2

	Phe	Trp	Met	Ser	Thr	Cys	Asn	Tyr
Ala	AlaPhe AlaAla	AlaTrp AlaAla	AlaMet	AlaSer AlaAla	AlaThr AlaAla	AlaAla ○	AlaAsn AlaAla	AlaTyr AlaAla
Gln	○	×	MetMet	SerGln SerSer	ThrGln ThrThr	○	×	×
Glu								
Gly	GlyPhe	GlyGly ○	GlyMet GlyGly	GlySer GlyGly SerGly SerSer	GlyThr GlyGly ThrGly ThrThr	GlyGly ○	GlyGly	GlyTyr GlyGly
Val			×					
Leu			MetMet		ThrLeu			
Ile			MetMet					
Pro			MetMet	SerSer	ThrThr			
Phe			MetPhe MetMet	SerPhe	ThrPhe ThrThr			
Trp								
Met			MetMet	SerMet	ThrMet ThrThr	MetMet ○		MetTyr MetMet
Ser				SerSer	SerThr SerSer ThrSer ThrThr			SerTyr SerSer
Thr					ThrThr			
Cys								
Asn								
Tyr								
Lys								
Arg								
His								
Asp								
α -AB								
β -Ala								
Cit								

10

20

30

40

第1表-3

	Lys	Arg	His	Asp	α -AB	β -Ala	Cit	アサセリン	テアニン
Ala	AlaAla ○	AlaArg AlaAla	AlaHis AlaAla	AlaAla	AlaAla ○		AlaAla ○	AlaAla ○	AlaAla ○
Gln	×	×	×	×	○				
Glu									
Gly	GlyGly ○	GlyArg GlyGly	GlyGly	GlyGly	GlyGly ○		○		
Val									
Leu									
Ile									
Pro									
Phe				×		○			
Trp									
Met	MetMet ○		MetMet ○			○			
Ser			SerHis		SerSer ○				
Thr					ThrThr ○				
Cys									
Asn									
Tyr									
Lys									
Arg					○				
His						β -AlaHis			
Asp									
α -AB					○				
β -Ala									
Cit						○			

第1表の第1行目と最左列に記載の2種類（もしくは1種類）のL-アミノ酸、Glyまたは β -Alaを基質として反応した場合に生成したジペプチドを枠内に記載した。○は配列は未確定だがジペプチドが生成したこと、×はジペプチドの生成が確認されなかったこと、および空欄は未実施を示す。

実験例5 Hisタグ付加組換え型酵素発現株を用いたジペプチドの生産

実験例1で得られたエシェリヒア・コリNM522/pQE60ywfE株を50 μ g/mlのアンピシリンを含む8mlのLB培地の入った太型試験管に接種し、28℃で17時間培養した。該培養液を50 μ g/mlのアンピシリンを含む50mlのLB培地の入った250ml容三角フラスコに接種し30℃で3時間培養した後、終濃度が1mmol/LになるようにIPTGを添加し、さらに30℃で4時間培養した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。

200g/Lの湿菌体、50g/Lのグルコース、5g/Lのフィチン酸（33%の濃水酸化ナトリウム溶液を用いて中性になるよう希釈）、15g/Lのリン酸二水素カリウム、5g/Lの硫酸マグネシウム・7水和物、4g/LのナイミーンS-215、10m

1 / L のキシレン、200 mmol / L の L - Ala、200 mmol / L の L - Glu からなる 20 ml の反応液 (pH 7.2) を 50 ml 容量のビーカーに入れ、32、900 rpm の条件下で 2 時間反応を行った。反応中は 2 mol / L の水酸化カリウムを用いて反応液の pH を 7.2 に保った。

反応生成物を実験例 3 記載の方法と同様の方法で分析したところ、25 mg / L の L - Ala - L - Glu の蓄積が確認された。

実験例 6 バチルス属に属する各種微生物から ywfE 遺伝子に相当する遺伝子のクローニングとその解析

配列番号 26 で表される塩基配列に基づき、バチルス・サチリス ATCC 15245、ATCC 6633、IAM 1213、IAM 1107、IAM 1214、ATCC 9466、IAM 1033、ATCC 21555、バチルス・アミロリケファシエンス IF03022、およびバチルス・プミルス NRRL B - 12025 に存在する ywfE 遺伝子に相当する遺伝子を以下のようにして取得した。

まず、バチルス・サチリス ATCC 15245、ATCC 6633、IAM 1213、IAM 1107、IAM 1214、ATCC 9466、IAM 1033、ATCC 21555、バチルス・アミロリケファシエンス IF03022、およびバチルス・プミルス NRRL B - 12025 をそれぞれ LB 培地に植菌し 30 で一晩静置培養した。培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の飽和フェノールを用いる方法により、該微生物の染色体 DNA をそれぞれ単離精製した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて、配列番号 37 および 38 で表される塩基配列を有する DNA (以下、それぞれプライマー C、プライマー D と呼ぶ) を合成した。プライマー C は、バチルス・サチリス 168 株の染色体 DNA の ywfE 遺伝子の開始コドンより上流を含む領域の配列である。プライマー D は、ywfE 遺伝子の終止コドンより下流を含む配列と相補的な配列である。

バチルス・サチリス ATCC 15245、ATCC 6633、IAM 1213、IAM 1107、IAM 1214、ATCC 9466、IAM 1033、ATCC 21555、またはバチルス・アミロリケファシエンス IF03022 の染色体 DNA を鋳型とし、上記プライマー C およびプライマー D をプライマーセットとして用いて PCR を行った。PCR は、0.1 μg の染色体 DNA、0.5 μmol / L の各プライマー、2.5 units の Pfu DNA ポリメラーゼ、4 μL の Pfu DNA ポリメラーゼ用 × 10 緩衝液、200 μmol / L の各 dNTP を含む反応液 40 μL を調製し、94 で 1 分間、55 で 2 分間、72 で 3 分間の工程を 30 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1 / 10 量をアガロースゲル電気泳動し、ywfE 遺伝子断片に相当する約 1.4 kb の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール / クロロホルム溶液を添加し、混合した。該溶液を遠心分離して得られた上層に、2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 に 30 分間放置した。該溶液を遠心分離して得られた DNA の沈殿を 20 μL の TE に溶解した。

上記で得られた各菌株染色体 DNA 由来の 1.4 kb 断片と pCR-blunt (インビトロジェン社製) を、ライゲーションキットを用いて、16 で 16 時間反応を行い連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換した後、50 μg / ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布して、30 で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてそれぞれの構造を解析することにより、ywfE 遺伝子に相当する遺伝子を含むプラスミドである pYWFE1 (ATCC 15245 株由来、配列番号 65 で表される塩基配列を有する DNA)、pYWFE2 (ATCC 6633 株由来、配列番号 27 で表される塩基配列を有する DNA)、pYWFE3 (IAM 1213 株由来、配列番号 28 で表される塩基配列を有する DNA)、pYWFE4 (IAM 1107 株由来、配列番号 29 で表される塩基配列を有する DNA)、pYWFE5 (IAM 1214 株由来、配

列番号30で表される塩基配列を有するDNA)、pYWFE6(ATCC9466株由来、配列番号26で表される塩基配列を有するDNA)、pYWFE7(IAM1033株由来、配列番号65で表される塩基配列を有するDNA)、pYWFE8(ATCC21555株由来、配列番号31で表される塩基配列を有するDNA)、pYWFE9(IFO3022株由来、配列番号32で表される塩基配列を有するDNA)が取得されていることを確認した。

一方、バチルス・プミルスNRRL B-12025由来のywfE遺伝子に相当する遺伝子(配列番号64で表される塩基配列を有するDNA)は以下のように取得した。

上記で調製したNRRL B-12025株の染色体DNAを鋳型にし、配列番号66および67で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いて、PCRを行った。PCRは、0.1μgの染色体DNA、0.5μmol/Lの各プライマー、2.5unitsのZ-taqポリメラーゼ(タカラバイオ社製)、5μLのZ-taqポリメラーゼ用×10緩衝液(タカラバイオ社製)、200μmol/Lの各dNTPを含む反応液50μLを調製し、98で5秒間、55で30秒間、72で1分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、約0.8kbの断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20μLのTEに溶解した。

上記で得られた各菌株染色体DNA由来の0.8kb断片とpGEM T-easy(プロメガ社製)を、ライゲーションキットを用いて、16で16時間反応を行い連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリDH5α株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換した後、50μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布して、30で一晩培養した。

上記で得られた形質転換体からプラスミドを抽出して、約0.8kbの挿入DNA断片の塩基配列を決定したところ、配列番号64で表される塩基配列中の塩基番号358~1160番からなる塩基配列が確認された。

次に該プラスミドをEcoRIで切断した後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した。該DNA断片をジーンクリーンIIキットを用いて精製した。約0.5μgの該精製DNA断片を、DIG-ハイプライムDNAラベリング&デテクションスターターキットI(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)を用いて、DIGラベル化した。DIGラベル化は、該キット添付の説明書に従って行った。

上記で得られたDIGラベル化DNAを用いて、NRRL B-12025株の染色体DNAのサザン解析を行った。

NRRL B-12025株の染色体DNAをBamHI、EcoRI、HindIII、KpnI、PstI、SacI、SalIおよびSphIを用いてそれぞれ完全消化し、アガロース電気泳動によりDNA断片を分離した後、常法に従いナイロンメンブレンプラスチャージ(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)に転移させた。

UVを照射することにより、該ナイロン膜にDNA断片を固定した後、上記プローブDNAおよび該ナイロン膜を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーションは、該プローブDNAと該ナイロン膜を65で16時間接触させ、その後該ナイロン膜を、0.1%SDSおよび2×SSCからなる溶液を用い、室温で5分間、2回洗浄し、さらに0.1%SDSおよび0.5×SSCからなる溶液を用い、65で15分間、2回洗浄することで行い、その他の操作、条件およびハイブリダイズしたDNAの検出は、上記したDIG-ハイプライムDNAラベリング&デテクションスターターキットIに添付されている説明書に準じて行った。

その結果、HindIIIおよびPstIの完全消化断片の3.5kb付近に発色が見られた。

次に、NRRL B - 12025株の染色体DNAをHindIIIおよびPstIを用いてそれぞれ全消化し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した。それぞれの制限酵素消化DNAから3 - 4 kbpの断片をジーンクリーンIIキットを用いて精製し、ライゲーションキットを用いて自己環化させた。

上記で決定した0.8 kbのDNA断片の塩基配列に基づき、配列番号71および72で表される塩基配列を設計、合成し、上記で取得した環化DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは、10 ngの環化DNA、0.5 μmol/Lの各プライマー、2.5 unitsのpyrobestポリメラーゼ（タカラバイオ社製）、5 μLのpyrobestポリメラーゼ用×10緩衝液（タカラバイオ社製）、200 μmol/Lの各dNTPを含む反応液50 μLを調製し、98 で5秒間、55 で30秒間、72 で3分30秒間の工程を30回繰り返すことにより行った。

10

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、約3.0 kbの断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20 μLのTEに溶解した。

上記で得られたDNA断片とZero Blunt PCR Cloning Kit（インビトロジェン社製）とをライゲーションキットを用いて連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリNM522株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換した後、50 μg/mlのアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布して、30 で一晚培養した。

20

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析することにより、ywfE遺伝子に相当する遺伝子を含むプラスミドであるpYWFE10（NRRL B - 12025株由来、配列番号64で表される塩基配列を有するDNA）が得られていることを確認した。

上記で得られたpYWFE1～pYWFE10に含まれるywfE遺伝子に相当する各遺伝子の塩基配列を塩基配列分析装置373A・DNAシーケンサーを用いて決定した。

pYWFE1、pYWFE6およびpYWFE7に含まれる遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列は、ywfE遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列と同一であったが、pYWFE2、pYWFE3、pYWFE4、pYWFE5、pYWFE8、pYWFE9およびpYWFE10に含まれる遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列は、ywfE遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列と異なっていた。

30

pYWFE2、pYWFE3、pYWFE4、pYWFE5、pYWFE8、pYWFE9、pYWFE10およびpYWFE1とpYWFE7に含まれるywfE遺伝子に相当する遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号20～25、68および19に、該遺伝子の塩基配列を配列番号27～32、65および26にそれぞれ示した。

実験例7 C末端Hisタグ付加型組換え型ジペプチド合成酵素の精製

バチルス・サチルスATCC15245、ATCC6633、IAM1213、IAM1107、IAM1214、ATCC9466、IAM1033、ATCC21555、またはバチルス・アミノリケファシエンスIFO3022の染色体DNAを鋳型とし、実験例1記載のプライマーAおよびプライマーBをプライマーセットとして用いてPCRを行った。PCRは、0.1 μgの染色体DNA、0.5 μmol/Lの各プライマー、2.5 unitsのPfu DNAポリメラーゼ、4 μLのPfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液、200 μmol/Lの各dNTPを含む反応液40 μLを調製し、94 で1分間、55 で2分間、72 で3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

40

バチルス・プミルスNRRL B - 12025の染色体DNAを鋳型とした場合は、配列番号69および70で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用い、上記と同様の条件でPCRを行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、ywfE断片に相当する約1.4

50

k bのDNA断片がそれぞれ増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、 -80°C に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20 μL のTEに溶解した。

該溶解液のそれぞれ5 μL を用い、増幅したDNAを制限酵素NcoIおよびBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットを用いて、ywfE遺伝子に相当する遺伝子を含む1.4 kbのDNA断片を回収した。

次にC末端Hisタグ付加型組換え体発現ベクターpQE60 0.2 μg を制限酵素NcoIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、上記と同様の方法により3.4 kbのDNA断片を回収した。

上記で得られたバチルス・サチルス168株のywfE遺伝子に相当する遺伝子を含む1.4 kbのDNA断片、および3.4 kbのDNA断片をライゲーションキットを用いて、16 $^{\circ}\text{C}$ で16時間反応を行いそれぞれ連結した。該反応液を用いて大腸菌NM522株をカルシウムイオンを用いる方法により形質転換した後、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布して、30 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてそれらの構造を解析することにより、C末Hisタグ付加型遺伝子発現ベクターであるpQE60ywfE1(ATCC15245由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE2(ATCC6633由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE3(IAM1213由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE4(IAM1107由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE5(IAM1214由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE6(ATCC9466由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE7(IAM1033由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE8(ATCC21555由来の遺伝子を含むベクター)、pQE60ywfE9(IFO3022由来の遺伝子を含むベクター)、およびpQE60ywfE10(NRRLB-12025由来の遺伝子を含むベクター)が取得されていることを確認した。

上記で得られたエシェリヒア・コリNM522/pQE60ywfE1~NM522/pQE60ywfE10株を、それぞれ50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンプシリンを含む8 mLのLB培地の入った太型試験管に接種し、28 $^{\circ}\text{C}$ で17時間培養した。該培養液を50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンプシリンを含む50 mLのLB培地の入った250 mL容の三角フラスコに接種し30 $^{\circ}\text{C}$ で3時間培養した後、終濃度が1 mmol/LになるようにIPTGを添加し、さらに30 $^{\circ}\text{C}$ で4時間培養した。該培養液を遠心分離して得られた湿菌体から、HisTrapをその使用説明書に従って用いて、Hisタグ付加組換え型酵素を精製した。

実験例8 精製酵素を用いたジペプチドの生産

実験例7で得られた組換え型酵素0.04 mg、100 mmol/LのTris-HCl(pH8.0)、60 mmol/Lの塩化マグネシウム、60 mmol/LのATP、30 mmol/LのL-Alaおよび30 mmol/LのL-Glnからなる0.1 mLの反応液を調製し、37 $^{\circ}\text{C}$ で16時間反応を行った。

反応終了後、実験例3記載の方法により反応液を分析した結果、それぞれ、3.0~3.5 g/LのL-Ala-L-Glnおよび0.25~0.3 g/LのL-Ala-L-Alaが生成蓄積していることが確認された。

また、上記反応液組成からATPを除くとL-Ala-L-GlnおよびL-Ala-L-Alaは全く生成されなかった。

以上の結果から、実験例7で得られた遺伝子の産物は、いずれもATP存在下でL-AlaとL-GlnとからL-Ala-L-GlnおよびL-Ala-L-Alaを生成する活性を有することが明らかになった。

実験例9 ywfE遺伝子の発現を強化した大腸菌の造成

パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて、配列番号6

10

20

30

40

50

0 ~ 63に記載の配列をそれぞれ有するDNA(以下、それぞれプライマーE、プライマーF、プライマーG、プライマーH)を合成した。配列番号60の配列は、プラスミドpQE60ywfEのywfEのリボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ配列を含む領域について5'にXhoI認識配列を含む配列を付加したものである。配列番号61の配列は、ywfEの終止コドンを含む配列と相補的な配列の5'にBamHI認識配列を含む配列を付加したものである。また配列番号62の配列は、trpプロモーターを含む発現ベクターpTrs30のtrpプロモーター領域の配列について5'にEcoRI認識配列を含む配列を付加したものである。配列番号63の配列は、trpプロモーターを含む発現ベクターpTrs30のtrpプロモーター領域の配列と相補的な配列の5'にXhoI認識配列を含む配列を付加したものである。

10

プラスミドpQE60ywfEを鋳型とし、ywfE断片の増幅には上記のプライマーEおよびプライマーFを、trpプロモーター領域の断片の増幅にはプライマーGおよびプライマーHをそれぞれプライマーセットとして用いたPCRを行った。PCRは、10ngのpQE60ywfE、0.5μmol/lの各プライマー、2.5unitsのPfu DNAポリメラーゼ、4μlのPfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液、200μmol/lの各dNTPを含む40μlの反応液を調製し、94で1分間、55で2分間、72で3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、プライマーEおよびプライマーFを用いたPCRではywfE遺伝子断片に相当する約1.4kb、プライマーGおよびプライマーHを用いた反応ではtrpプロモーター領域の断片に相当する約0.3kbの断片がそれぞれ増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該溶液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAを20μlのTEに溶解した。

20

上記で得られたそれぞれのDNA溶液5μlを用い、プライマーEおよびプライマーFで増幅したDNAを制限酵素XhoIおよびBamHIで、またプライマーGおよびプライマーHで増幅したDNAを制限酵素EcoRIおよびXhoIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより、それぞれywfE遺伝子を含む1.4kbおよびtrpプロモーター領域を含む0.3kbのDNA断片を回収した。

30

0.2μgのtrpプロモーターを含む発現ベクターpTrs30を制限酵素EcoRIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.5kbのDNA断片を回収した。

上記で得られたywfE遺伝子を含む1.4kb断片、trpプロモーター領域を含む0.3kb断片および4.5kbの断片をライゲーションキットを用いて、16で16時間、連結反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌NM522株をカルシウムイオンを用いる方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、trpプロモーター下流にywfE遺伝子を含む発現ベクターであるpPE56を得た。該ベクターの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

40

【図面の簡単な説明】

第1図は、Hisタグ付加型ywfE遺伝子発現ベクターであるpQE60ywfEの構築過程を示す図である。

第2図は、ywfE遺伝子発現強化型ベクターであるpPE56の構築過程を示す図である。

各図中の符号の意味は以下のとおりである。

P_{T5}; T5プロモーター

P_{trp}; トリプトファンプロモーター

50

以下に本発明の実施例を示すが、下記実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

【発明を実施するための最良の形態】

実施例1 p e p D遺伝子、p e p N遺伝子、p e p B遺伝子、p e p A遺伝子およびd p pオペロン欠損株の作製

エシェリヒア・コリ染色体DNA上の特定遺伝子が欠損した菌株は、ラムダファージの相同組換え系を利用した方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 6641-6645(2000)]に従って作製した。

以下に記載のプラスミドpKD46、pKD3およびpCP20は、エシェリヒア・コリ ジェネティック ストック センター(米国エール大学)から該プラスミドを保持するエシェリヒア・コリ株を入手し、該大腸菌から抽出したものをを用いた。

10

(1) 遺伝子欠損用DNA断片のクローニング

エシェリヒア・コリK12株の染色体DNA上に存在する配列番号10で表される塩基配列を有するp e p D遺伝子、配列番号11で表される塩基配列を有するp e p N遺伝子、配列番号12で表される塩基配列を有するp e p B遺伝子、配列番号13で表される塩基配列を有するp e p A遺伝子および配列番号14で表される塩基配列を有するd p p A遺伝子、配列番号15で表される塩基配列を有するd p p B遺伝子、配列番号16で表される塩基配列を有するd p p C遺伝子、配列番号17で表される塩基配列を有するd p p D遺伝子および配列番号18で表される塩基配列を有するd p p F遺伝子を欠損させることを目的に、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用い、エシェリヒア・コリK12株の染色体DNA上における各々の欠損標的遺伝子の上流および下流に位置する36bpからなる塩基配列と相同な塩基配列、および配列番号39で表される酵母由来Flp recombinaseが認識する塩基配列を有するDNAを合成した。ただし、d p p A遺伝子、d p p B遺伝子、d p p C遺伝子、d p p D遺伝子およびd p p F遺伝子は、オペロンを形成しているので、該オペロンの上流および下流に位置する塩基配列と相同な塩基配列を有するDNAを合成した。

20

すなわち、p e p D遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号40および41、p e p N遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号42および43、p e p A遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号44および45、p e p B遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号46および47、d p pオペロン欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号48および49で表される塩基配列からなるDNAをそれぞれ合成した。

30

次に、上記合成DNAをプライマーセットとして用い、pKD3 DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは10ngのプラスミドDNA、0.5 μmol/lの各プライマー、2.5 unitsのPfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)、4 μlのPfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液(ストラタジーン社製)、200 μmol/lの各deoxyNTP(dATP、dGTP、dCTPおよびTTP)を含む40 μlの反応液を用い、94 で1分間、55 で2分間、72 で3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

それぞれの反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE[10 mmol/l Tris-HCl(pH 8.0)、1 mmol/l EDTA]飽和フェノール/クロロホルム(1 vol/1 vol)を添加し、混合した。

40

該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 で30分間放置した。該溶液を遠心分離し、p e p D遺伝子、p e p N遺伝子、p e p B遺伝子、p e p A遺伝子およびd p pオペロン欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有DNA断片を取得した。

(2) p e p D遺伝子欠損エシェリヒア・コリJM101の作製

大腸菌JM101株をpKD46で形質転換し、100 mg/lのアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布し、30 で培養することで選択した。

プラスミドpKD46上にはλRed recombinase 遺伝子が挿入されてお

50

り、またその発現はL - アラビノースにより誘導されるよう設計されている。よって、L - アラビノース存在下で生育させた大腸菌を、直鎖状DNAを用いて形質転換すると、高頻度で相同組換えが起こる。またpKD46は温度感受性の複製起点を有するために、42℃で生育させることにより、プラスミドを容易に脱落させることができる。

10 mmol / l のL - アラビノースと50 µg / ml のアンピシリンを添加して培養して得られた大腸菌JM101 / pKD46に、電気パルス法により上記で取得したpepD遺伝子欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有DNA断片を導入し、大腸菌JM101の染色体DNA上にpepD遺伝子欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有DNA断片が相同組換えにより組込まれた形質転換株を25 mg / l のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地（バクトトリプトン10 g / l、バクトイーストエキストラクト5 g / l、塩化ナトリウム5 g / l、寒天15 g / l）に塗布し、30℃で培養することで選択した。

選択したクロラムフェニコール耐性株を、25 mg / l のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に植菌し、42℃で14時間培養した後、単コロニー分離した。得られた各コロニーを25 mg / l のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地、及び100 mg / l のアンピシリンを含むLB寒天培地にレプリカし、37℃で培養し、クロラムフェニコール耐性かつアンピシリン感受性を示すコロニーを選択することにより、pKD46脱落株を取得した。

次に上記で得られたpKD46脱落株をpCP20を用いて形質転換し、100 mg / l のアンピシリンを含むLB寒天培地上で選択することにより、pCP20を保持するpKD46脱落株を取得した。

プラスミドpCP20には酵母由来Flp recombinase遺伝子が挿入されており、該遺伝子の発現は42℃で誘導されるよう設計されている。

また、上記で作製したpepD遺伝子、pepN遺伝子、pepB遺伝子、pepA遺伝子及びdppオペロン欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有DNA断片の、クロラムフェニコール耐性遺伝子の両端にはFlp recombinaseが認識する塩基配列が存在するため、Flp recombinaseが触媒する相同組換えにより容易に該耐性遺伝子を脱落させることができる。

さらに、pCP20は温度感受性の複製起点を有しているため、pCP20保持株を42℃で生育させることにより、Flp recombinaseの発現とpCP20の脱落を同時に誘導することができる。

上記で取得したpCP20保有pKD46脱落株を薬剤無添加のLB寒天培地に植菌し、42℃で14時間培養した後、単コロニー分離した。得られた各コロニーを薬剤無添加LB寒天培地、25 mg / l のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地および100 mg / l のアンピシリンを含むLB寒天培地にレプリカして、30℃で培養し、クロラムフェニコール感受性かつアンピシリン感受性を示すコロニーを選択した。

上記で選択した各株からそれぞれ染色体DNAを常法（生物工学実験書、日本生物工学会編97～98ページ、培風館、1992年）に従って調製した。欠損の標的遺伝子であるpepD遺伝子の内部塩基配列に基づいて設計した配列番号50および51で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用い、染色体DNAを鋳型にしたPCRを行った。PCRは、0.1 µgの染色体DNA、0.5 µmol / lの各プライマー、2.5 unitsのPfu DNAポリメラーゼ、4 µlのPfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液、200 µmol / lの各deoxy NTPを含む40 µlの反応液を用い、94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間からなる工程を30回繰り返すことにより行った。

上記PCRにおいて、増幅DNA断片が検出されなかった株をpepD遺伝子欠損株とし、エシェリヒア・コリJPD1株と名づけた。

（3）エシェリヒア・コリJM101の染色体DNA上のpepD遺伝子およびpepN遺伝子が欠損した株の作製

上記（2）で得られたエシェリヒア・コリJPD1株をpKD46で形質転換し、10

10

20

30

40

50

0 mg / l のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布し、30 で培養することにより選択した。得られた形質転換株（エシェリヒア・コリ J P D 1 / p K D 4 6）に、電気パルス法により p e p N 遺伝子欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有 DNA 断片を導入し、エシェリヒア・コリ J P D 1 / p K D 4 6 の染色体 DNA 上に p e p N 遺伝子欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有 DNA 断片が相同組換えにより組込まれた形質転換株を取得した。

次に、上記（2）と同様の操作を行うことにより、染色体 DNA 上からクロラムフェニコール耐性遺伝子が欠落した株を取得し、該株をエシェリヒア・コリ J P D N 2 と名づけた。

（4）エシェリヒア・コリ J M 1 0 1 の染色体 DNA 上の p e p N 遺伝子、p e p A 遺伝子、p e p B 遺伝子または d p p オペロンが欠損した株、および多重遺伝子欠損株の作製 p e p N 遺伝子、p e p A 遺伝子、p e p B 遺伝子または d p p オペロンの欠損株は、上記（1）で作製した各遺伝子またはオペロン欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子含有 DNA 断片を用い、上記（2）と同様の方法により作製した。

上記方法により各々の遺伝子欠損株が取得されたことは、各々の欠損遺伝子の内部塩基配列に基づき設計、合成した配列番号 5 2 ~ 5 9 で表される塩基配列を有する DNA をプライマーセットとして用い、上記（2）と同様の PCR により確認した。ここで、配列番号 5 2 および 5 3 で表される塩基配列からなる DNA は p e p N 遺伝子欠損確認用、配列番号 5 4 および 5 5 で表される塩基配列からなる DNA は p e p A 遺伝子欠損確認用、配列番号 5 6 および 5 7 で表される塩基配列からなる DNA は p e p B 遺伝子欠損確認用、配列番号 5 8 および 5 9 で表される塩基配列からなる DNA は d p p オペロン欠損確認用プライマーセットである。

上記方法で取得された d p p オペロン欠損株をエシェリヒア・コリ J D P P 1 株、p e p N 遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P N 1 株、p e p A 遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P A 1 株、p e p B 遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P B 7 株と名付けた。

また、上記（3）の方法に準じて、p e p D 遺伝子、p e p N 遺伝子、p e p A 遺伝子、p e p B 遺伝子および d p p オペロンからなる群より選ばれる 2 以上の遺伝子またはオペロンの多重欠損株を作製した。多重欠損株が取得できたことの確認は、上記（2）と同様の PCR により確認した。前記方法で取得された p e p D 遺伝子および d p p オペロンが欠損した二重遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P D P 4 9 株、p e p B 遺伝子、p e p D 遺伝子および p e p N 遺伝子が欠損した三重遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P D N B 4 3 株、p e p D 遺伝子、p e p N 遺伝子および d p p オペロンが欠損した三重遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P N D D P 3 6 株、p e p A 遺伝子、p e p D 遺伝子、p e p N 遺伝子および d p p オペロンが欠損した四重遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P N D A P 5 株、p e p B 遺伝子、p e p D 遺伝子、p e p N 遺伝子および d p p オペロンが欠損した四重遺伝子欠損株をエシェリヒア・コリ J P N D B P 7 株と名づけた。第 2 表は、各遺伝子欠損株における欠損遺伝子名を示す。

10

20

30

第2表

菌株名	欠損遺伝子
JM101	なし
JDPP1	dpp オペロン
JPN1	pepN
JPA1	pepA
JPB7	pepB
JPD1	pepD
JPDN2	pepD, pepN
JPNDB43	pepB, pepD, pepN
JPDP49	pepD, dpp オペロン
JPNDDP36	pepD, pepN, dpp オペロン
JPNDAP5	pepA, pepD, pepN, dpp オペロン
JPNDBP7	pepB, pepD, pepN, dpp オペロン

10

20

実施例2 ペプチダーゼおよびペプチド取り込み活性が喪失した大腸菌株を用いた L - アラニル - L - グルタミン (以下、AlaGln と称す) 及び L - アラニル - L - アラニン (以下、AlaAla と称す) の生産性の評価。

実施例1 で得られた各種ペプチダーゼ遺伝子およびジペプチド取り込み蛋白質をコードするオペロンの欠損株を、実験例8 で造成したプラスミド pPE56 を用いて形質転換し、アンピシリン耐性を示す形質転換株を取得した。

30

得られた形質転換株を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 8 ml の LB 培地の入った試験管に接種し、 28°C で 17 時間培養した。該培養液を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 8 ml の生産培地 (リン酸水素二カリウム $16 \text{ g}/\text{l}$ 、リン酸二水素カリウム $14 \text{ g}/\text{l}$ 、硫酸アンモニウム $5 \text{ g}/\text{l}$ 、クエン酸 (無水) $1 \text{ g}/\text{l}$ 、カザミノ酸 (Difco 社製) $0.5 \text{ g}/\text{l}$ 、L-Pro $1 \text{ g}/\text{l}$ 、L-Ala $2.5 \text{ g}/\text{l}$ 、L-Gln $2.5 \text{ g}/\text{l}$ 、グルコース $10 \text{ g}/\text{l}$ 、ビタミン B₁ $10 \text{ mg}/\text{l}$ 、硫酸マグネシウム・7水和物 $25 \text{ mg}/\text{l}$ 、硫酸鉄 7水和物 $50 \text{ mg}/\text{l}$ 、 $10 \text{ mol}/\text{l}$ の水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7.2 に調整。L-Gln は 10 倍濃縮液をフィルターろ過滅菌後、グルコース、ビタミン B₁、硫酸マグネシウム・7水和物、硫酸鉄・7水和物は別個に煮沸後添加) を試験管に 1% 接種し、 30°C で 24 時間培養した。該培養液を遠心分離し培養上清を取得した。

40

培養上清中の生産物を F-moc 化法で誘導体化した後に HPLC 法により分析した。HPLC 法による分析は、分離カラムに ODS-HG5 (野村化学社製) を用い、溶離液として A 液 (酢酸 $6 \text{ ml}/\text{l}$ 、20% (v/v) アセトニトリル、トリエチルアミンにて pH 4.8 に調整) および B 液 (酢酸 $6 \text{ ml}/\text{l}$ 、70% (v/v) アセトニトリル、トリエチルアミンにて pH 4.8 調整) を用い、0 ~ 5 分までは A 液 : B 液 = 8 : 2、5 ~ 20 分までは、20 分目で A 液 : B 液 = 1 : 1 になるようにリニアグラジエントをかける条件で分析を行った。分析結果を第3表に示す。

第3表

菌株名	欠損遺伝子	AlaGln (g/l)	AlaAla(g/l)
JM101	なし	0	0
JDPP1	dpp オペロン	0.02	0.01
JPN1	pepN	0.01	0.01
JPA1	pepA	0.01	0.01
JPB7	pepB	0.01	0.01
JPD1	pepD	0.01	0.01
JPDN2	pepD, pepN	0.02	0.03
JPNDB43	pepB, pepD, pepN	0.05	0.12
JPDP49	pepD, dpp オペロン	0.11	0.08
JPNDDP36	pepD, pepN, dpp オペロン	0.16	0.21
JPNDAP5	pepA, pepD, pepN, dpp オペロン	0.28	0.26
JPNDBP7	pepB, pepD, pepN, dpp オペロン	0.43	0.22

第3表から、2種以下のペプチダーゼ遺伝子が欠損した微生物、1種のペプチド取り込み蛋白質遺伝子のみが欠損した微生物では、ジペプチドの生成、蓄積量は低い。1種以上のペプチダーゼ遺伝子および1種のペプチド取り込み蛋白質遺伝子が欠損した微生物、または3種以上のペプチダーゼ遺伝子が欠損した微生物では、ジペプチドの生成、蓄積量が大幅に増加していることがわかった。

実施例3 ペプチダーゼおよびペプチド取り込み蛋白質の活性が喪失した大腸菌株を用いたL-アラニル-L-バリン(以下、AlaValと称す)の生産性の評価

実施例2と同様に、各種ペプチダーゼ遺伝子およびペプチド取り込み蛋白質をコードするオペロンの欠損大腸菌株を、pPE56を用いて形質転換した。得られた形質転換株を50μg/mlのアンピシリンを含む8mlのLB培地の入った試験管に接種し、28で17時間培養した。該培養液を100μg/mlのアンピシリンを含む8mlの生産培地(リン酸水素二カリウム 16g/l、リン酸二水素カリウム 14g/l、硫酸アンモニウム 5g/l、クエン酸(無水) 1g/l、カザミノ酸(Difco社製) 0.5g/l、L-Pro 1g/l、L-Ala 2.5g/l、L-Val 2.5g/l、グルコース 10g/l、ビタミンB₁ 10mg/l、硫酸マグネシウム・7水和物 25mg/l、硫酸鉄・7水和物 50mg/l、10mol/lの水酸化ナトリウム溶液でpH7.2に調整。グルコース、ビタミンB₁、硫酸マグネシウム・7水和物、硫酸鉄・7水和物は別個に煮沸後に添加)が入った試験管に1%接種し、30で24時間培養した。該培養液を遠心分離し培養上清を取得した。

培養上清中の生成物を、実施例2記載の方法により分析した。結果を第4表に示す。

第4表

菌株名	欠損遺伝子	AlaVal (g/l)
JM101	なし	0
JDPP1	dpp オペロン	0
JPN1	pepN	0
JPA1	pepA	0
JPB7	pepB	0
JPD1	pepD	0
JPDN2	pepD, pepN	0
JPNDB43	pepB, pepD, pepN	0.04
JPDP49	pepD, dpp オペロン	0.11
JPNDDP36	pepD, pepN, dpp オペロン	0.22
JPNDBP7	pepB, pepD, pepN, dpp オペロン	0.20

第4表から、2種以下のペプチダーゼ遺伝子が欠損した微生物、および1種のペプチド取り込み蛋白質遺伝子のみが欠損した微生物はジペプチドを生産しないが、3種以上のペプチダーゼ遺伝子が欠損した微生物、または1種以上のペプチダーゼ遺伝子および1種のペプチド取り込み蛋白質遺伝子が欠損した微生物は、ジペプチドを生産することがわかった。

実施例4 ペプチダーゼおよびペプチド取り込み蛋白質の活性が喪失した大腸菌株を用いたグリシル-L-グルタミン（以下、GlyGlnと称す）の生産性の評価

実施例2と同様に各種ペプチダーゼ遺伝子およびペプチド取り込み蛋白質をコードするオペロンの欠損株を、pPE56を用いて形質転換した。得られた形質転換株を、50 μg/mlのアンピシリンを含む8 mlのLB培地の入った試験管に接種し、28℃で17時間培養した。

該培養液を100 μg/mlのアンピシリンを含む8 mlの生産培地（リン酸水素ナトリウム 16 g/l、リン酸二水素ナトリウム 14 g/l、硫酸アンモニウム 5 g/L、クエン酸（無水） 1 g/l、カザミノ酸（ディフコ社製） 0.5 g/l、L-Pro、1 g/l、Gly 2.5 g/l、L-Gln 2.5 g/l、グルコース 10 g/l、ビタミンB₁ 10 mg/L、硫酸マグネシウム・7水和物 25 mg/l、硫酸鉄7水和物 50 mg/l、10 mol/lの水酸化ナトリウム溶液を用いてpH7.2に調整。L-Glnは10倍濃縮液をフィルターろ過滅菌後、グルコース、ビタミンB₁、硫酸マグネシウム・7水和物、硫酸鉄・7水和物は別個に煮沸後添加）が入った試験管に1%接種し、30℃で24時間培養した。該培養液を遠心分離し培養上清を取得した。

培養上清中の生成物を、実施例2記載の方法より分析した。結果を第5表に示す。

第5表

菌株名	欠損遺伝子	GlyGln (g/l)
JM101	なし	0
JDPP1	dpp オペロン	0
JPDN2	pepD, pepN	0
JPNDB43	pepB, pepD, pepN	0.01
JPNDDB36	pepD, pepN, dpp オペロン	0.02
JPNDBP7	pepB, pepD, pepN, dpp オペロン	0.03

第5表から、2種以下のペプチダーゼ遺伝子が欠損した微生物、および1種のペプチド取り込み蛋白質遺伝子のみが欠損した微生物は、ジペプチドを生産しなかったが、3種以上のペプチダーゼ遺伝子が欠損した微生物、および2種以上のペプチダーゼ遺伝子および1種のペプチド取り込み蛋白質遺伝子が欠損した微生物は、ジペプチドを生産することがわかった。

【産業上の利用可能性】

本発明により、ジペプチドを生産する微生物および該微生物を用いたジペプチドの製造法を提供することができる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号35 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号36 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号37 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号38 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号39 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号40 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号41 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号42 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号43 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号44 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号45 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号46 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号47 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号48 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号49 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号50 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号51 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号52 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号53 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号54 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号55 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号56 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号57 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号58 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号59 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号60 - 人工配列の説明；合成DNA
 配列番号61 - 人工配列の説明；合成DNA

10

20

30

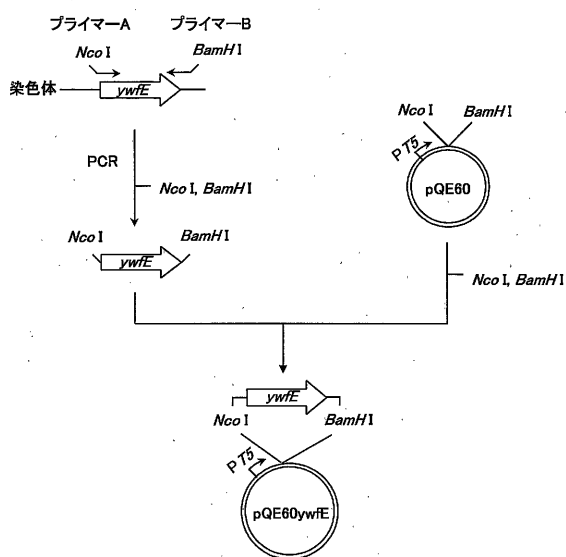
40

50

配列番号 6 2 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 6 3 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 6 6 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 6 7 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 6 9 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 7 0 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 7 1 - 人工配列の説明；合成 DNA
 配列番号 7 2 - 人工配列の説明；合成 DNA

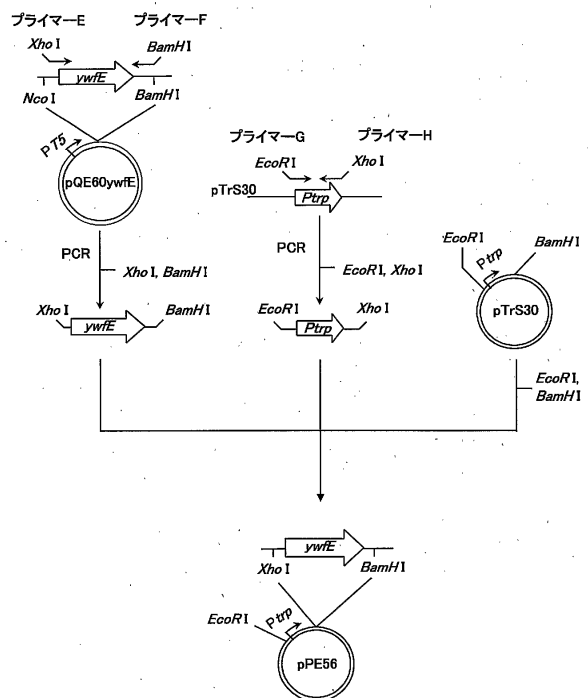
【図 1】

第1図



【図 2】

第2図



【配列表】

0004593476000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 R 1:19

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 0 3 0 7 (W O , A 1)
Journal of Bacteriology(1993),Vol.175,No.23,p.7523-7532

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 1/00
C12N 15/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)