(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117916378 A
(43)申请公布日 2024.04.19

(21)申请号 202280060889.5
(22)申请日 2022.09.09
(30)优先权数据
2021-147985 2021.09.10 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/033972 2022.09.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/038128 JA 2023.03.16
(71)申请人 协和发酵生化株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 堀一将 森田敏彦 西野恒代 氏原哲朗
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 鲁雯雯 金龙河
(51)Int.Cl.
C12N 15/54(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/55(2006.01)
C12P 19/32(2006.01)

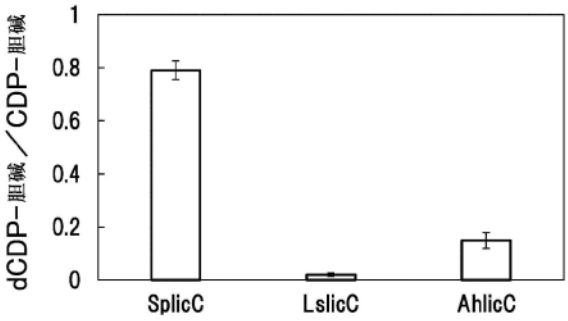
权利要求书1页 说明书15页
序列表（电子公布） 附图1页

(54)发明名称

用于制造CDP-胆碱的重组微生物和使用该重组微生物的CDP-胆碱的制造方法

(57)摘要

一种重组微生物,其为具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物,所述CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶为由特定的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽;以及一种CDP-胆碱的制造方法,其包括利用该重组微生物生成CDP-胆碱的步骤。



CN 117916378 A

1.一种重组微生物,其为具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物,其中,所述CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶为选自下述的(A1)～(A3)和(B1)～(B3)中的任一多肽:

(A1)由序列号10所示的氨基酸序列构成的多肽;

(A2)由与序列号10所示的氨基酸序列具有至少60％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽;

(A3)由在序列号10所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽;

(B1)由序列号14所示的氨基酸序列构成的多肽;

(B2)由与序列号14所示的氨基酸序列具有至少60％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽;

(B3)由在序列号14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽。

2.根据权利要求1所述的重组微生物,其中,以能够表达的方式导入了选自下述的(a1)～(a3)和(b1)～(b3)中的任一DNA:

(a1)编码序列号10所示的氨基酸序列的DNA;

(a2)编码由与序列号10所示的氨基酸序列具有至少60％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA;

(a3)编码由在序列号10所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA;

(b1)编码序列号14所示的氨基酸序列的DNA;

(b2)编码由在序列号14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA;

(b3)由与编码序列号14所示的氨基酸序列的DNA具有至少60％以上的一致性的DNA构成且编码具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA。

3.根据权利要求1或2所述的重组微生物,其为大肠杆菌。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的重组微生物,其中,在将对CTP的反应性设为1时,所述CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶对dCTP的反应性为0.75以下。

5.一种CDP-胆碱的制造方法,其包括利用权利要求1～4中任一项所述的重组微生物生成CDP-胆碱的步骤。

用于制造CDP-胆碱的重组微生物和使用该重组微生物的CDP-胆碱的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及具有生产底物特异性优良的具有合成胞苷二磷酸胆碱的活性的蛋白质的能力的转化体和使用该转化体的高效的胞苷二磷酸胆碱的制造方法。

背景技术

[0002] 胞苷二磷酸胆碱(Cytidine 5'-diphosphate Choline;以下记作CDP-胆碱)是作为高等生物的磷脂构成成分的磷脂酰胆碱的生物合成前体,已知有神经保护作用等(非专利文献1)。

[0003] 尽管具有上述有用性,但是CDP-胆碱难以通过来自天然的提取、化学合成来大量得到,主要利用生物所具有的酶反应以胞苷一磷酸(以下称为CMP)、乳清酸为起始原料进行合成(专利文献1和2以及非专利文献2和3)。

[0004] 由乳清酸制造CDP-胆碱时,首先由乳清酸通过多个酶反应合成胞苷三磷酸(以下称为CTP)。接着,在由胆碱通过酶反应合成的磷酸胆碱(以下称为P-胆碱)存在下,通过CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的作用使所得到的CTP缩合,由此可以合成CDP-胆碱(非专利文献3)。

[0005] 以CMP为起始原料时也同样,由CMP生产CTP,在P-胆碱存在下,通过CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶进行缩合,由此得到CDP-胆碱(非专利文献3)。

[0006] 由以上可知,在利用酶反应的CDP-胆碱的生产中,CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶承担着重要的作用。

[0007] CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶广泛分布于包括人在内的哺乳类、酵母等真核生物、细菌等中(非专利文献4、5和6)。这些CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶基本上具有由CTP和P-胆碱生成CDP-胆碱的活性。

[0008] 但是,已知存在脱氧胞苷三磷酸(以下记作dCTP)时接受dCTP作为底物来代替CTP,由dCTP和P-胆碱生成脱氧胞苷二磷酸胆碱(以下记作dCDP-胆碱)(非专利文献7)。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:国际公开第2003/095660号

[0012] 专利文献2:国际公开第2007/023830号

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:Nutrients(2020)Vol.12(3),793,p.1-17

[0015] 非专利文献2:Bull.Inst.Chem.Res.Kyoto U.(1976)Vol.53,p.546-562

[0016] 非专利文献3:Appl.Microbiol.Biotechnol.(2017)Vol.101,p.1409-1417

[0017] 非专利文献4:J.Bio.Chem.(1998)Vol.273,p.14022-14029

[0018] 非专利文献5:Eur.J.Biochem.(1987)Vol.169,p.477-486

[0019] 非专利文献6:J.Bio.Chem.(2002)Vol.277,p.4343-4350

[0020] 非专利文献7:Eur.J.Biochem.(1983)Vol.131,p.223-229

发明内容

[0021] 发明所要解决的问题

[0022] dCTP作为DNA的合成原料,是生命活动所必需的化合物,因此在使用微生物的CDP-胆碱生产中,不能完全抑制dCDP-胆碱的附带产生,成为高效生产CDP-胆碱的障碍。而且,dCDP-胆碱与CDP-胆碱具有极相近的物性,因此难以对它们进行分离。

[0023] 因此,需要显示出与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的底物特异性的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶,这样的酶迄今为止尚属未知。另外,对于肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶等而言,虽然晶体结构已被阐明(非专利文献6),但是对dCTP的反应性是无法预测的。

[0024] 本发明的目的在于,提供用于制造CDP-胆碱的重组微生物和使用该重组微生物的CDP-胆碱的制造方法。

[0025] 用于解决问题的方法

[0026] 本发明人对上述课题进行了研究,结果发现了显示出与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的优良的底物特异性的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶。进而发现,通过利用具有生产异源的该CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物能够高效地制造CDP-胆碱,基于这些见解完成了本发明。

[0027] 即,本发明涉及以下。

[0028] 1.一种重组微生物,其为具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物,其中,上述CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶为选自下述的(A1)~(A3)和(B1)~(B3)中的任一多肽。

[0029] (A1)由序列号10所示的氨基酸序列构成的多肽

[0030] (A2)由与序列号10所示的氨基酸序列具有至少60%以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0031] (A3)由在序列号10所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1~20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0032] (B1)由序列号14所示的氨基酸序列构成的多肽

[0033] (B2)由与序列号14所示的氨基酸序列具有至少60%以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0034] (B3)由在序列号14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1~20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0035] 2.根据上述1所述的重组微生物,其中,以能够表达的方式导入了选自下述的(a1)~(a3)和(b1)~(b3)中的任一DNA。

[0036] (a1)编码序列号10所示的氨基酸序列的DNA

[0037] (a2)编码由与序列号10所示的氨基酸序列具有至少60%以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0038] (a3)编码由在序列号10所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1~20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0039] (b1)编码序列号14所示的氨基酸序列的DNA

[0040] (b2)编码由在序列号14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0041] (b3)由与编码序列号14所示的氨基酸序列的DNA具有至少60％以上的一致性的DNA构成且编码具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0042] 3.根据上述1或2所述的重组微生物,其为大肠杆菌。

[0043] 4.根据上述1～3中任一项所述的重组微生物,其中,在将对CTP的反应性设为1时,上述CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶对dCTP的反应性为0.75以下。

[0044] 5.一种CDP-胆碱的制造方法,其包括利用上述1～4中任一项所述的重组微生物生成CDP-胆碱的步骤。

[0045] 发明效果

[0046] 本发明的重组微生物具有生产显示出与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的优良的底物特异性的异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力。通过利用本发明的重组微生物,可抑制dCDP-胆碱的附带产生、高效地制造CDP-胆碱。

附图说明

[0047] 图1为示出SplicC、LslicC或AhlicC对CTP或dCTP的反应性的图。纵轴为dCDP-胆碱量相对于使用CTP或dCTP和P-胆碱作为底物而生成的CDP-胆碱量的比率。SplicC、LslicC、AhlicC分别表示来自肺炎链球菌、来自唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)、来自产氢厌氧球菌(Anaerococcus hydrogenalis)的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶。

具体实施方式

[0048] 1.重组微生物及其制作方法

[0049] 本发明的重组微生物为具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物。本发明中,上述CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶为选自下述的(A1)～(A3)和(B1)～(B3)中的任一多肽。

[0050] (A1)由序列号10所示的氨基酸序列构成的多肽

[0051] (A2)由与序列号10所示的氨基酸序列具有至少60％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0052] (A3)由在序列号10所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0053] (B1)由序列号14所示的氨基酸序列构成的多肽

[0054] (B2)由与序列号14所示的氨基酸序列具有至少60％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0055] (B3)由在序列号14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽

[0056] 作为上述(A2)或(B2)中记载的多肽,可列举由与序列号10或14所示的氨基酸序列具有至少60％以上、依次优选70％以上、80％以上、90％以上、95％以上、更优选98％以上、最优选99％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多

肽。

[0057] 作为上述(A3)或(B3)中记载的多肽,可列举由在序列号10或14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个、优选1～10个、进一步优选1～8个、最优选1～5个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽。

[0058] 氨基酸序列和碱基序列的一致性可以使用Lipman-Pearson法[Science,227(4693),1435-41(1985)]、由Karlin和Altschul提出的算法BLAST[Pro.Natl.Acad.Sci.USA,90,5873(1993)]、FASTA[Methods Enzymol.,183,63(1990)]来确定。基于该算法BLAST开发出被称为BLASTN、BLASTX的程序[J.Mol.Biol.,215,403(1990)]。基于BLAST利用BLASTN分析碱基序列时,参数例如设为评分＝100、字长＝12。另外,基于BLAST通过BLASTX分析氨基酸序列时,参数例如设为评分＝50、字长＝3。使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各程序的默认参数。这些分析方法的具体方法是公知的。

[0059] 缺失、置换、插入或添加氨基酸而成的氨基酸序列是指:使成为基础的氨基酸序列中的氨基酸残基人为地缺失或置换、或者在该氨基酸序列中人为地插入或添加氨基酸残基而得到的氨基酸序列。

[0060] 缺失、置换、插入或添加的氨基酸为天然型和非天然型均可。作为天然型氨基酸,可列举L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-半胱氨酸等。

[0061] 以下示出可相互置换的氨基酸的例子。同一组中所含的氨基酸可相互置换。

[0062] A组:亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、甲硫氨酸、O-甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸

[0063] B组:天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸

[0064] C组:天冬酰胺、谷氨酰胺

[0065] D组:赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸

[0066] E组:脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸

[0067] F组:丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸

[0068] G组:苯丙氨酸、酪氨酸

[0069] CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性是指由CTP和P-胆碱合成CDP-胆碱的活性。

[0070] 上述多肽具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性这一点例如可以通过以下方法来确认。首先,通过后述方法制作含有编码该多肽的DNA的重组DNA。然后,用该重组DNA转化不能确认CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的微生物、例如大肠杆菌BL21株,培养所得到的微生物,从得到的培养物中制备含有该多肽的细胞提取液。接着,使该细胞提取液与作为底物的CTP和P-胆碱接触,生成CDP-胆碱。最后,通过使用高效液相色谱或气相色谱等的常规分析方法检测反应液中的CDP-胆碱,由此可以确认对象多肽具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性。

[0071] “具有生产CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物”可以通过将具有编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA的重组DNA以能够表达的方式导入母株而得到。

[0072] 母株是指成为基因改造和转化等的对象的原始株。将成为基于DNA导入的转化的对象的原始株称为宿主株。

[0073] 作为母株,优选原核生物或酵母菌株,更优选属于埃希氏菌属、沙雷氏菌属、芽孢杆菌属、短杆菌属、棒杆菌属、微杆菌属或假单胞菌属等的原核生物、或者属于酵母属、裂殖酵母属、克鲁维酵母属、丝孢酵母属、许旺酵母属、毕赤酵母属或假丝酵母属等的酵母菌株,这些中,优选属于埃希氏菌属的原核生物(大肠杆菌)。

[0074] 作为母株,具体而言,可列举例如大肠杆菌BL21 codon plus、大肠杆菌XL1-Blue、大肠杆菌XL2-Blue(均为安捷伦科技公司制)、大肠杆菌BL21(DE3)pLysS(默克密理博公司制)、大肠杆菌BL21、大肠杆菌DH5α、大肠杆菌HST08 Premium、大肠杆菌HST02、大肠杆菌HST04dam-/dcm-、大肠杆菌JM109、大肠杆菌HB101、大肠杆菌CJ236、大肠杆菌BMH71-18 mutS、大肠杆菌MV1184、大肠杆菌TH2(均为宝生物公司制)、大肠杆菌W(ATCC9637)、大肠杆菌JM101、大肠杆菌W3110、大肠杆菌MG1655、大肠杆菌DH1、大肠杆菌MC1000、大肠杆菌W1485、大肠杆菌MP347、大肠杆菌NM522、无花果沙雷氏菌(Serratia ficaria)、居泉沙雷氏菌(Serratia fonticola)、液化沙雷氏菌(Serratia liquefaciens)、粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、解糖短杆菌(Brevibacterium saccharolyticum)ATCC14066、产氨棒杆菌(Corynebacterium ammoniagenes)、谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)ATCC13032、谷氨酸棒杆菌ATCC14067、谷氨酸棒杆菌ATCC13869、嗜乙酰乙酸棒杆菌(Corynebacterium acetoacidophilum)ATCC13870、嗜氨微杆菌(Microbacterium ammoniaphilum)ATCC15354或假单胞菌(Pseudomonas sp.)D-0110等原核生物、或者酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、茁芽丝孢酵母(Trichosporon pullulans)、河岸许旺酵母(Schwanniomyces alluvius)、巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)或产朊假丝酵母(Candida utilis)等酵母菌株。

[0075] 另外,作为母株,也可以优选使用人工赋予或增强了生成作为CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的底物的CTP和/或P-胆碱的能力的育种株。

[0076] 作为对用作母株的微生物人工赋予或增强了生成CTP和/或P-胆碱的能力的方法,可列举下述的(1)~(5)等,上述公知方法可以单独或组合使用。

[0077] (1)使至少1种控制CTP和/或P-胆碱的生物合成途径的机制缓和或解除的方法

[0078] (2)使至少1种参与CTP和/或P-胆碱的生物合成途径的酶的表达增强的方法

[0079] (3)使至少1种参与CTP和/或P-胆碱的生物合成途径的酶基因的拷贝数增加的方法

[0080] (4)将至少1种从CTP和/或P-胆碱的生物合成途径分支到该目标物质以外的代谢产物的代谢途径弱化或切断的方法

[0081] (5)选择与野生株相比对CTP和/或P-胆碱的类似物的抗性度高的细胞株的方法

[0082] 作为上述的人工赋予或增强了生成CTP和P-胆碱的能力的方法的具体例,可列举各种基于基因操作的方法(专利文献1、专利文献2、非专利文献3)等公知方法。

[0083] 微生物为能生成CTP和P-胆碱的微生物这一点可以通过分别在培养基中培养育种株和母株、并比较CTP和P-胆碱的生成量来确认。另外,也可以用含有编码由序列号10或14所示的氨基酸序列构成的多肽的DNA的重组DNA转化该微生物,在培养基中培养转化后的该

微生物,使用后述的HPLC检测培养物中蓄积的CDP-胆碱,由此来确认。

[0084] 用作母株的微生物具有生产除上述(A1)～(A3)和(B1)～(B3)以外的具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的能力时,使用使该多肽的功能下降或缺损的株作为母株,由此能够抑制dCDP-胆碱的附带产生且高效地制造CDP-胆碱。作为使该多肽的功能下降或缺损的方法,只要是使该多肽的功能降低或完全停止的方式则没有特别限定,例如,可以适当使用除去编码该多肽的DNA的全部或一部分等公知方法。

[0085] 作为编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA,可列举选自以下的(a1)～(a3)、(b1)～(b3)和(c1)～(c3)中的任一种。

[0086] (a1)编码序列号10所示的氨基酸序列的DNA

[0087] (a2)编码由与序列号10所示的氨基酸序列具有至少60％以上的一致性的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0088] (a3)编码由在序列号10所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0089] (b1)编码序列号14所示的氨基酸序列的DNA

[0090] (b2)编码由在序列号14所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加1～20个氨基酸而成的氨基酸序列构成且具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0091] (b3)由与编码序列号14所示的氨基酸序列的DNA具有至少60％以上的一致性的DNA构成且编码具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0092] (c1)由序列号7或11所示的碱基序列构成的DNA

[0093] (c2)与由序列号7或11所示的碱基序列的互补碱基序列构成的DNA在严谨条件下杂交且编码具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的多肽的DNA

[0094] (c3)由与序列号7或11所示的碱基序列具有95％以上、优选97％以上、更优选98％以上、最优选99％以上的一致性的碱基序列构成且编码具有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶活性的DNA的DNA

[0095] 杂交是指DNA与具有特定碱基序列的DNA或该DNA的一部分进行杂交。因此,该具有特定碱基序列的DNA或其一部分为可用作Northern或Southern印迹分析的探针、或者可用作PCR分析的寡核苷酸引物的DNA。

[0096] 作为用作探针的DNA,可列举至少100个碱基以上、优选200个碱基以上、更优选500个碱基以上的DNA。作为用作引物的DNA,可列举至少10个碱基以上、优选15个碱基以上的DNA。

[0097] DNA的杂交实验的方法是众所周知的,可以按照例如分子克隆第4版(Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012))、Methods for General and Molecular Bacteriology(ASM Press(1994))、Immunology methods manual(Academic press(1997))、以及多种其它标准教科书来确定杂交的条件并进行实验。

[0098] 另外,通过按照市售的杂交试剂盒所附的说明书也可以获得在严谨条件下进行杂交的DNA。作为市售的杂交试剂盒,可列举例如通过随机引物法制作探针并在严谨条件下进行杂交的随机引物DNA标记试剂盒(罗氏诊断公司制)等。

[0099] 上述严谨条件可列举例如下述条件:将固定有DNA的过滤器和探针DNA在含有50％甲酰胺、5×SSC(750mM的氯化钠、75mM的柠檬酸钠)、50mM的磷酸钠(pH7.6)、5×邓哈特溶

液、10％的硫酸葡聚糖、以及20μg/l的变性鲑鱼精DNA的溶液中在42℃下孵育一晚后，在例如约65℃的0.2×SSC溶液中清洗该过滤器。

[0100] 上述各种条件也可以通过添加或变更用于抑制杂交实验的背景的封闭试剂来进行设定。上述的封闭试剂的添加也可以为了符合条件而伴有杂交条件的变更。

[0101] 作为能够在上述严谨条件下杂交的DNA，可列举例如使用BLAST、FASTA等基于上述参数等进行计算时与由序列号7或11所示的碱基序列构成的DNA具有至少95％以上、优选97％以上、进一步优选98％以上、最优选99％以上的一致性的DNA。

[0102] 编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA中，上述(a1)或(c1)中记载的DNA例如可以通过使用可基于序列号10所示的氨基酸序列或序列号7所示的碱基序列设计的探针DNA的对微生物的染色体DNA文库的Southern杂交、或者使用可基于该碱基序列设计的引物DNA的以微生物的染色体DNA为模板的PCR[PCR Protocols,Academic Press(1990)]获得。上述操作中使用的微生物的染色体DNA的来源没有特别限定，可列举例如乳杆菌属的乳酸菌、厌氧球菌属、链球菌属、梭杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、颗粒链菌属、梭菌属的细菌。这些中，优选乳杆菌属的乳酸菌、厌氧球菌属的细菌，更优选唾液乳杆菌。唾液乳杆菌ATCC11741株可以由美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得。

[0103] 编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA中，上述(b1)或(c1)中记载的DNA例如可以通过使用可基于序列号14所示的氨基酸序列或序列号11所示的碱基序列设计的探针DNA的对微生物的染色体DNA文库的Southern杂交、或者使用可基于该碱基序列设计的引物DNA的以微生物的染色体DNA为模板的PCR获得。上述操作中使用的微生物的染色体DNA的来源没有特别限定，可列举例如乳杆菌属的乳酸菌、厌氧球菌属、链球菌属、梭杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、颗粒链菌属、梭菌属的细菌。这些中，优选乳杆菌属的乳酸菌、厌氧球菌属的细菌，更优选产氢厌氧球菌。产氢厌氧球菌ATCC49630株可以由美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得。

[0104] 编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA中，上述(a2)、(b2)或(c2)中记载的DNA例如可以如下获得:对各种蛋白质序列数据库检索与序列号10或14所示的氨基酸序列具有60％以上、依次优选70％以上、80％以上、90％以上、95％以上、更优选98％以上、最优选99％以上的一致性的氨基酸序列，或者对各种基因序列数据库检索与序列号7或11所示的碱基序列具有95％以上、优选97％以上、更优选98％以上、最优选99％以上的一致性的碱基序列，使用可基于通过该检索得到的氨基酸序列或碱基序列设计的探针DNA或引物DNA和具有该DNA的微生物，通过与上述获得DNA的方法同样的使用Southern杂交或PCR的方法等来获得。

[0105] 编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA中，上述(a3)、(b3)或(c3)中记载的DNA例如可以通过将编码序列号10或14所示的氨基酸序列的碱基序列或由序列号7或11所示的碱基序列构成的DNA作为模板供于易错PCR等而获得。

[0106] 另外，也可以利用使用在各自的5’端具有以可导入目标突变(缺失、置换、插入或添加)的方式设计的碱基序列的1组PCR引物的PCR[Gene,77,51(1989)]来获得上述(a3)、(b3)或(c3)中记载的DNA。即，首先利用对应于编码序列号10或14所示的氨基酸序列的碱基序列或由序列号7或11所示的碱基序列构成的DNA的5’端的有义引物和在5’端具有与突变序列互补的序列的对应于紧靠突变导入位点之前(5’侧)的序列的反义引物以该DNA为模板

进行PCR,扩增该DNA的5'端至突变导入位点的片段A(在3'侧导入了突变)。接着,利用在5'端具有突变序列的对应于紧靠突变导入位点之后(3'侧)的序列的有义引物和对应于该DNA的3'端的反义引物以该DNA为模板进行PCR,扩增在5'端导入了突变的该DNA的突变导入位点至3'端的片段B。将这些扩增片段彼此纯化后混合,在不添加模板、引物的情况下进行PCR,则扩增片段A的有义链和扩增片段B的反义链由于突变导入位点共通而进行杂交,兼做引物和模板而进行PCR反应,导入了突变的DNA得到扩增。

[0107] 获得的上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中记载的DNA在直接导入到宿主细胞中后、或者用适当的限制酶等切割、利用常规方法整合于载体并将得到的重组DNA导入到宿主细胞中后,使用通常使用的碱基序列分析方法、例如双脱氧法[Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,74,5463(1977)]或Applied Biosystems3500基因分析仪、Applied Biosystems3730DNA分析仪(均为赛默飞世尔科技公司制)等碱基序列分析装置进行分析,由此可以确定该DNA的碱基序列。

[0108] 作为确定DNA的碱基序列时可以使用的宿主细胞,可列举例如大肠杆菌DH5α、大肠杆菌HST08 Premium、大肠杆菌HST02、大肠杆菌HST04 dam-/dcm-、大肠杆菌JM109、大肠杆菌HB101、Escherichia coli CJ236、大肠杆菌BMH71-18 mutS、大肠杆菌MV1184、大肠杆菌TH2(均为宝生物公司制)、大肠杆菌XL1-Blue、大肠杆菌XL2-Blue(均为安捷伦科技公司制)、大肠杆菌DH1、大肠杆菌MC1000、大肠杆菌W1485、大肠杆菌W3110、大肠杆菌MP347、大肠杆菌NM522等。

[0109] 作为上述载体,可列举例如pBluescriptII KS(+)、pPCR-Script Amp SK(+)(均为安捷伦科技公司制)、pT7Blue(默克密理博公司制)、pCRII(赛默飞世尔科技公司制)、pCR-TRAP(ジーンハンター公司制)和pDIRECT[Nucleic Acids Res.,18,6069(1990)]等。

[0110] 作为整合本发明的DNA而得到的重组DNA向宿主细胞导入的方法,只要是向宿主细胞导入DNA的方法则均可以使用。可列举例如使用钙离子的方法(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,69,2110,1972)、原生质体法(日本特开昭63-248394号公报)、电穿孔法(Nucleic Acids Res.,16,6127,1988)等。

[0111] 确定碱基序列的结果是,所获得的DNA为部分长度时,可以通过使用该部分长度DNA作为探针的针对染色体DNA文库的Southern杂交法等获得全长DNA。

[0112] 进而,通过基于所确定的DNA的碱基序列或序列号7或11所示的碱基序列使用日本テクノサービス公司制造的NTS M系列DNA合成装置等进行化学合成,也可以制备目标DNA。

[0113] 具有上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中记载的DNA的重组DNA例如为该DNA能够在母株中自主复制的DNA,并且是指在能够转录上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中的任一者以上所记载的DNA的位置含有启动子的表达载体中整合有上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中的任一者以上所记载的DNA的DNA。

[0114] 在母株中能够整合到染色体中的上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中的任一者以上所记载的DNA也为具有上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中记载的DNA的重组DNA。重组DNA为能够整合到母株染色体DNA的DNA时,可以不含启动子。

[0115] 使用细菌等原核生物作为母株时,能够在母株中自主复制的重组DNA优选为由启动子、核糖体结合序列、上述(a1)~(a3)、(b1)~(b3)和(c1)~(c3)中的任一者以上所记载的DNA和转录终止序列构成的重组DNA。可以含有控制启动子的基因。优选使用将作为核糖

体结合序列的夏因-达尔加诺(Shine-Dalgarno)序列与起始密码子之间调节为适当的距离(例如6～18个碱基)的重组DNA。

[0116] 能够在母株中自主复制的重组DNA中,该DNA的表达中转录终止序列并非必须,优选在结构基因的紧下游配置转录终止序列。

[0117] 作为表达载体,只要为用于将目标DNA导入宿主中并使其增殖、表达的适当的核酸分子则没有特别限定,不仅可以使用质粒,还可以使用例如人工染色体、使用转座子的载体、柯斯质粒。

[0118] 使用属于埃希氏菌属的微生物作为母株时,作为表达载体,可列举例如pColdI、pSTV28、pSTV29、pUC118(均为宝生物公司制)、pMW119(ニッポンジーン公司制)、pET21a、pCOLADuet-1、pCDFDuet-1、pCDF-1b、pRSF-1b(均为默克密理博公司制)、pMAL-c5x(ニューイングランドバイオラブス公司制)、pGEX-4T-1、pTrc99A(均为ジーイーヘルスケアバイオサイエンス公司制)、pTrcHis、pSE280(均为赛默飞世尔科技公司制)、pGEMEX-1(普洛麦格公司制)、pQE-30、pQE80L(均为キアゲン公司制)、pET-3、pBluescriptII SK(+)、pBluescriptII KS(-)(均为安捷伦科技公司制)、pKYP10(日本特开昭58-110600号公报)、pKYP200[Agric.Biol.Chem.,48,669(1984)]、pLSA1[Agric.Biol.Chem.,53,277(1989)]、pGEL1[Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,82,4306(1985)]、pTrS30[由大肠杆菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)制备]、pTrS32[由大肠杆菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)制备]、pTK31[APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,2007,Vol.73,No.20,p6378-6385]、pPAC31(国际公开第98/12343号)、pUC19[Gene,33,103(1985)]、pPA1(日本特开昭63-233798号公报)等。

[0119] 作为使用上述表达载体时的启动子,只要在属于埃希氏菌属的微生物的细胞中起作用则可以为任何启动子,可列举例如trp启动子、ilv启动子等参与氨基酸生物合成的基因的启动子、uspA启动子、lac启动子、PL启动子、PR启动子、PSE启动子等来自大肠杆菌、噬菌体等的启动子。另外,也可以使用将2个trp启动子串联而成的启动子、tac启动子、trc启动子、lacT7启动子、letI启动子之类的经人工设计改造的启动子。

[0120] 在使用棒杆菌型细菌作为母株时,作为表达载体,可列举例如pCG1(日本特开昭57-134500号公报)、pCG2(日本特开昭58-35197号公报)、pCG4(日本特开昭57-183799号公报)、pCG11(日本特开昭57-134500号公报)、pCG116、pCE54、pCB101(均为日本特开昭58-105999号公报)、pCE51、pCE52、pCE53[均参见Molecular and General Genetics,196,175(1984)]等。

[0121] 作为使用上述表达载体时的启动子,只要在棒杆菌型细菌的细胞中起作用则可以为任何启动子,可列举例如P54-6启动子[Appl.Microbiol.Biotechnol.,53,p674-679(2000)]。

[0122] 在使用酵母菌株作为母株时,作为表达载体,可列举例如YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等。

[0123] 作为使用上述表达载体时的启动子,只要在酵母菌株的细胞中起作用则可以为任何启动子,可列举例如PHO5启动子、PGK启动子、GAP启动子、ADH启动子、gal1启动子、gal10启动子、热休克多肽启动子、MFα1启动子、CUP1启动子等启动子。

[0124] 本发明的重组DNA例如可以通过将利用上述方法制备的DNA片段进行限制酶处理

等后插入到上述适当的表达载体的启动子下游来制作。

[0125] 在此,也可以通过以成为最适于在宿主中表达的密码子的方式对该DNA的碱基序列置换碱基来提高该DNA所编码的蛋白质的表达量。本发明的制造方法中使用的母株中的密码子使用频率的信息可以通过公共数据库获得。

[0126] 作为以能够在宿主细胞中自主复制的质粒形式来导入具有编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA的重组DNA的方法,可列举例如上述使用钙离子的方法、原生质体法、电穿孔法以及原生质球法[Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,81,4889(1984)]、醋酸锂法[J.Bacteriol.,153,163(1983)]等方法。

[0127] 另外,将具有编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA的重组DNA插入母株的基因组时,例如可以使用基于同源重组的方法。即,使结合有可引起目标DNA导入的染色体区域的一部分的DNA进入微生物细胞内,引起该染色体区域的一部分区域的同源重组,由此可以整合于基因组。例如,作为利用大肠杆菌中频繁使用的同源重组的方法,可列举例如利用λ噬菌体的同源重组系统导入重组DNA的方法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97,6641-6645(2000)]。在此,作为引起导入的染色体区域,没有特别限制,优选并非必需的基因区域、或并非必需的基因区域上游的非基因区域。作为使该DNA进入微生物细胞内的方法,只要是将DNA导入宿主细胞的方法则均可使用,可列举例如上述的使用钙离子的方法、原生质体法、电穿孔法等。

[0128] 为通过将具有编码CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的DNA的重组DNA以能够表达的方式导入母株而得到的微生物这一点,例如可以通过与母株通过Northern印迹比较该微生物的该DNA的转录量或通过蛋白质印迹比较该微生物的该蛋白质的生产量来确认。

[0129] 通过上述方法制作的微生物为具有生产CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物这一点例如可以通过以下方法确认。首先,分别在培养基中培养母株和所制作的微生物,从得到的培养物中制备包含CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的细胞提取液。接着,使该细胞提取液与作为底物的CTP和P-胆碱接触而生成CDP-胆碱。最后,通过使用高效液相色谱或气相色谱等的常规分析方法来检测反应液中的CDP-胆碱,由此可以确认所制作的微生物为具有生产CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物。

[0130] 作为具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物,具体而言,可列举例如后述实施例中记载的BL21/pET21a-LslicC和BL21/pET21a-AhlicC。

[0131] 本发明中的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶优选底物特异性高、与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高。具体而言,例如在将对CTP的反应性设为1时,对dCTP的反应性优选为0.75以下,依次更优选为0.60以下、0.50以下、0.40以下,进一步优选为0.30以下,特别优选为0.20以下,最优选为0.15以下。将对CTP的反应性设为1时的对dCTP的反应性例如可以由[使CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶与P-胆碱和dCTP共存时的dCDP-胆碱的生成量(mM)]/[使CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶与P-胆碱和CTP共存时的CDP-胆碱的生成量(mM)]来计算。

[0132] 可见,通过利用具有生产显示出与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的底物特异性的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物,能够在抑制dCDP-胆碱的附带产生的同时高效地制造CDP-胆碱。

[0133] 2.CDP-胆碱的制造方法

[0134] 本发明的CDP-胆碱的制造方法包括利用上述具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷

酰转移酶的能力的重组微生物制造CDP-胆碱的步骤。

[0135] 作为CDP-胆碱的制造方法,此前已知发酵法或使用生物催化剂的方法(例如,日本专利第3369236号公报;Y.Liu et al.Appl.Microbiol.Biotechnol.,101,1409,2017.)。本发明的CDP-胆碱的制造方法通过利用具有生产与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物,能够有效抑制dCDP-胆碱的附带产生,与现有方法相比能够高效制造CDP-胆碱。具体而言,例如在日本专利第3369236号公报和Y.Liu et al.Appl.Microbiol.Biotechnol.,101,1409,2017.记载的CDP-胆碱的制造方法中,通过使用本发明中的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶代替CCT(choline phosphate cytidylyltransferase,磷酸胆碱胞苷酰转移酶),可获得本发明的效果。

[0136] 作为本发明的制造CDP-胆碱的方法,可列举(I)通过发酵法制造CDP-胆碱的方法、(II)使用重组微生物的培养物和该培养物的处理物制造CDP-胆碱的方法。以下对各制造方法进行说明。

[0137] (I)通过发酵法制造CDP-胆碱的方法

[0138] 作为通过发酵法制造CDP-胆碱的方法,可列举特征在于在培养基中培养具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物、从而在培养物中生成CDP-胆碱的CDP-胆碱的制造方法。该制造方法例如可以包括在培养物中生成CDP-胆碱后使其蓄积、从该培养物中采集CDP-胆碱的步骤。

[0139] 作为利用发酵法的CDP-胆碱的制造方法中使用的重组微生物,优选使用上述1的本发明的重组微生物,另外,优选为具有生成成为CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的底物的CTP和P-胆碱的能力的微生物、和/或人工地使CTP、P-胆碱或CDP-胆碱的分解活性弱化的微生物。

[0140] 微生物的培养可以按照常规方法实施。作为培养该微生物的培养基,只要为含有CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的底物或该底物的起始原料、该微生物可同化的碳源、氮源和无机盐类等、能高效进行该微生物的培养的培养基,则可使用天然培养基、合成培养基中的任一种。

[0141] 作为CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的底物,可列举例如CTP和P-胆碱。作为底物的起始原料,可列举例如乳清酸、CMP、氯化胆碱、葡萄糖等。作为碳源,只要为该微生物可同化的碳源即可,可列举例如葡萄糖、果糖、蔗糖、含有这些的糖蜜、淀粉和淀粉水解物等碳水化合物、乙酸和丙酸等有机酸、以及乙醇和丙醇等醇类等。

[0142] 作为氮源,可列举例如氨、氯化铵、硫酸铵、乙酸铵和磷酸铵等无机酸或有机酸的铵盐、其他含氮化合物以及蛋白胨、肉提取物、酵母提取物、玉米浆、酪蛋白水解物、大豆粕和大豆粕水解物、各种发酵菌体和其消化物等。

[0143] 作为无机盐,可列举例如磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸镁、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸铜和碳酸钙等。

[0144] 在利用发酵法的CDP-胆碱的制造方法中,所使用的微生物不具有生成成为CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的底物的CTP和P-胆碱的能力时,向培养基中添加CTP和P-胆碱。

[0145] 另外,在利用发酵法的CDP-胆碱的制造方法中,所使用的微生物不具有生成成为CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的底物的CTP和P-胆碱的能力时,代替向培养基中添加CTP和P-胆碱,也可以通过与本发明的重组微生物一起培养具有生成CTP和/或P-胆碱的能力的微生

物,从而向本发明的重组微生物供给CTP和P-胆碱。

[0146] 培养通常优选在振荡培养或深部通气搅拌培养等需氧条件下进行。培养温度优选为15～40℃,培养时间通常为5小时～7天。培养中的pH优选保持在3.0～9.0。pH的调节使用无机或有机的酸、碱溶液、尿素、碳酸钙、氨等进行。

[0147] 另外,培养中可以根据需要向培养基中添加氨苄青霉素、四环素等抗生素。在培养利用使用诱导性启动子作为启动子的表达载体转化的微生物时,可以根据需要向培养基中添加诱导剂。

[0148] 例如,在培养利用使用lac启动子的表达载体转化的微生物时,可以向培养基中添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷等,在培养利用使用trp启动子的表达载体转化的微生物时,可以向培养基中添加吲哚丙烯酸等。

[0149] 通过上述培养,在培养物中生成CDP-胆碱,由此可以制造CDP-胆碱。CDP-胆碱的定量可以使用HPLC(例如岛津制作所公司制造的分析装置SPD-M20A)来实施。

[0150] 从该培养物中采集CDP-胆碱的操作通常可以通过将离子交换树脂法、沉淀法等公知方法组合来实施。需要说明的是,在菌体内蓄积CDP-胆碱的情况下,例如可以利用超声波等将菌体破碎,通过离心分离除去菌体,从得到的上清中通过离子交换树脂法等采集CDP-胆碱.

[0151] (II)使用重组微生物的培养物和该培养物的处理物制造CDP-胆碱的方法

[0152] 使用重组微生物的培养物和该培养物的处理物制造CDP-胆碱的方法的特征在于,使作为酶源的、具有生产异源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的能力的重组微生物的培养物或该培养物的处理物和底物存在于水性介质中,在该水性介质中生成CDP-胆碱。该制造方法例如可以包括在水性介质中生成CDP-胆碱后使其蓄积、从该水性介质中采集CDP-胆碱的步骤。

[0153] 作为培养微生物的方法和培养基,与(I)中所述相同。

[0154] 本说明书中,作为培养物的处理物,可列举例如上述培养物的浓缩物、该培养物的干燥物、对该培养物进行离心分离或过滤等而得到的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冷冻干燥物、该菌体的表面活性剂处理物、该菌体的溶剂处理物、该菌体的酶处理物、和该菌体的固定化物等含有与该培养物保持同样功能的活菌体作为酶源的物质以及该菌体的超声波处理物、该菌体的机械磨碎处理物、从经过该处理的菌体得到的粗酶提取物、和从经过该处理的菌体得到的纯化酶。

[0155] 这些中,优选上述培养物的浓缩物、该培养物的干燥物、对该培养物进行离心分离或过滤等而得到的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冷冻干燥物、该菌体的表面活性剂处理物、该菌体的溶剂处理物、该菌体的酶处理物和该菌体的固定化物等含有与该培养物保持同样功能的活菌体作为酶源的物质以及该菌体的超声波处理物、该菌体的机械磨碎处理物,最优选上述培养物的浓缩物、该培养物的干燥物、对该培养物进行离心分离或过滤等而得到的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冷冻干燥物、该菌体的表面活性剂处理物、该菌体的溶剂处理物、该菌体的酶处理物和该菌体的固定化物等含有与该培养物保持同样功能的活菌体作为酶源的物质。

[0156] 作为酶源的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶的量优选为1～500g/l,更优选为1～300g/l。

[0157] 底物的浓度优选为0.1mM～10M,更优选为1mM～1M。作为底物,可列举例如CTP和P-胆碱。

[0158] 作为水性介质,可列举例如水、磷酸盐、碳酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐和Tris等缓冲液、甲醇和乙醇等醇类、乙酸乙酯等酯类、丙酮等酮类以及乙酰胺等酰胺类等。另外,也可以使用作为酶源使用的微生物的培养液来作为水性介质。

[0159] CDP-胆碱的生成反应中,可以根据需要添加植酸等螯合剂、表面活性剂或有机溶剂。作为表面活性剂,可以为聚氧乙烯十八烷基胺(例如NYMEEN S-215、日本油脂公司制)等非离子表面活性剂、鲸蜡基三甲基溴化铵、烷基二甲基・苄基氯化铵(例如カチオンF2-40E、日本油脂公司制)等阳离子型表面活性剂、月桂酰肌氨酸盐等阴离子型表面活性剂、烷基二甲基胺(例如叔胺FB、日本油脂公司制)等叔胺类等促进CDP-胆碱的生成的物质中任一者,可以将1种或多种混合使用。表面活性剂通常以0.1～50g/l的浓度来使用。

[0160] 作为有机溶剂,可列举二甲苯、甲苯、脂肪族醇、丙酮、乙酸乙酯等,通常以0.1～50ml/l的浓度使用。CDP-胆碱的生成反应在水性介质中在pH5～10、优选pH6～8且20～50℃的条件下进行1～96小时。为了促进该生成反应,可以添加腺嘌呤、腺苷-5'-一磷酸(AMP)、腺苷-5'-三磷酸(ATP)、硫酸镁、氯化镁等。腺嘌呤、AMP、ATP通常以0.01～100mM的浓度使用。

[0161] 在水性介质中生成的CDP-胆碱可以通过(I)中所述的方法来定量和采集。

[0162] 实施例

[0163] 以下示出本发明的实施例,但是本发明不受这些实施例限定。

[0164] [分析例]

[0165] 基于HPLC法的CDP-胆碱和dCDP-胆碱的分析使用岛津制作所公司制的分析装置SPD-M20A按照以下条件来进行。

[0166] 柱:Shodex Asahipak

[0167] 分析温度:50℃

[0168] 流速:0.5ml/分钟

[0169] 洗脱液组成:30mM磷酸二氢钾/10％乙腈(pH3.5)

[0170] 检测器:SPD-M20A

[0171] 将分别以0、0.005、0.01、0.02g/L的浓度含有作为标品的CDP-胆碱(协和发酵生化株式会社制)的溶液供于分析,由保留时间为10.56分钟的峰的面积值制作标准曲线。样品以成为0.005～0.02g/L的浓度的方式进行稀释,并供于分析,由保留时间为10.56分钟的峰的面积值,使用标准曲线进行样品中所含的CDP-胆碱的定量。dCDP-胆碱的标品难以获得,因此由保留时间为9.37分钟的峰的面积值使用CDP-胆碱的标准曲线进行dCDP-胆碱的定量。

[0172] [实施例1]利用编码来自肺炎链球菌的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶(SplicC)的DNA转化母株而得到的微生物的制作

[0173] 以具有序列号1所示的碱基序列的染色体DNA(GenBank:CP053210.1)为模板,将由序列号2和3所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR。纯化出含有由序列号1所示的碱基序列构成的DNA的约700bp的DNA片段。

[0174] 以作为表达载体的pET21a(Novagen公司制)为模板,将由序列号4和5所示的碱基

序列构成的DNA作为引物组,进行PCR,纯化出约5.2kbp的DNA片段(以下称为pET21a Inverse片段)。

[0175] 将上述两种DNA片段用In-Fusion HD克隆试剂盒(宝生物公司制)连接,使用该连接反应液转化大肠杆菌BL21株,由此制作BL21/pET21a-SplicC(将插入物的氨基酸序列记载于序列号6)。

[0176] [实施例2]利用编码来自唾液乳杆菌的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶(LslicC)的DNA转化母株而得到的微生物的制作

[0177] 以具有序列号7所示的碱基序列的染色体DNA(GenBank:CP011403.1)为模板,将由序列号8和9所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR。纯化出包含由序列号7所示的碱基序列构成的DNA的约700bp的DNA片段。

[0178] 将该DNA片段和pET21a Inverse片段使用In-Fusion HD克隆试剂盒连接,使用该连接反应液转化大肠杆菌BL21株,由此制作BL21/pET21a-LslicC(将插入物的氨基酸序列记载于序列号10)。

[0179] [实施例3]利用编码来自产氢厌氧球菌的CTP:磷酸胆碱胞苷酰转移酶(AhlicC)的DNA转化母株而得到的微生物的制作

[0180] 以具有序列号11所示的碱基序列的染色体DNA(GenBank:NZ__ABXA01000041.1)为模板,将由序列号12和13所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR。纯化出包含由序列号11所示的碱基序列构成的DNA的约700bp的DNA片段。

[0181] 将该DNA片段和pET21a Inverse片段用In-Fusion HD克隆试剂盒连接,使用该连接反应液转化大肠杆菌BL21株,由此制作BL21/pET21a-AhlicC(将插入物的氨基酸序列记载于序列号14)。

[0182] 通过Lipman-Pearson法分析编码SplicC、LslicC和AhlicC的氨基酸序列的一致性,将结果示于表1。

[0183] [表1]

[0184]

一致性(%)	SplicC	LslicC	AhlicC
SplicC		33	31
LslicC	33		62
AhlicC	31	62	

[0185] 如表1所示,LslicC和AhlicC显示出60％以上的一致性。另一方面,SplicC与LslicC和AhlicC的一致性低至30％左右,低于60％。

[0186] [实施例4]使用CTP或dCTP以及P-胆碱作为底物的CDP-胆碱或dCDP-胆碱的制造

[0187] 将BL21/pET21a-SplicC以及BL21/pET21a-LslicC和BL21/pET21a-AhlicC接种到装有5ml的含有100mg/ml氨苄青霉素的LB培养基[Bacto胰蛋白胨(ディフコ公司制)10g/l、酵母提取物(ディフコ公司制)5g/l、氯化钠10g/l]的粗试管中,在30℃下培养16小时。向装有50ml的含有100mg/ml氨苄青霉素的LB培养基的带挡板的锥形瓶中,接种1％该培养液,在30℃、220rpm下培养24小时。培养开始起第2小时时添加IPTG 0.1mM。将该培养液50ml的量进行离心分离,得到湿菌体。

[0188] 将各菌株的培养液各50ml的量悬浮于悬浮缓冲液[50mM磷酸缓冲液(pH7.0)]5ml,

进行超声波破碎。破碎后以5800×g离心10分钟,使未破碎菌体沉淀后采集上清。上清使用考马斯亮蓝法(Bradford法)定量蛋白量并用于反应中。

[0189] 反应如下进行:向含有150mM的磷酸氢二钾-HCl(pH7.0)(富士胶片和光纯药公司制)、25mM的氯化镁六水合物(关东化学公司制)、5mM的CTP或dCTP(均为西格玛奥德里奇公司制)、5mM的P-胆碱(东京化成工业公司制)的反应液中,以终浓度0.1mg/ml的方式添加上述上清蛋白质液,在30℃下以1000rpm振荡,从而进行。在反应开始后经过10分钟的时刻,添加1/5量的0.6N乙酸(富士胶片和光纯药公司制)而使反应结束。

[0190] 试验独立进行三次,通过HPLC法进行CDP-胆碱和dCDP-胆碱的定量,求出平均±标准偏差的值。将结果示于表2和图1。

[0191] [表2]

[0192]

	SplicC	LslicC	AhlicC
CDP-胆碱(mM)	0.950±0.101	1.717±0.026	1.666±0.149
dCDP-胆碱(mM)	0.749±0.057	0.036±0.010	0.252±0.067
dCDP-胆碱/CDP-胆碱	0.790±0.035	0.021±0.006	0.149±0.030

[0193] 如表2和图1所示,与晶体结构已阐明的SplicC相比,LslicC、AhlicC的dCDP-胆碱/CDP-胆碱的值更低,在将对CTP的反应性设为1时,对dCTP的反应性为0.15以下。由该结果表明,LslicC和AhlicC显示出与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的优良的底物特异性。进而,考虑到表1所示的氨基酸序列的一致性,相对于LslicC的氨基酸序列(序列号10)或AhlicC的氨基酸序列(序列号14)具有60%以上的一致性的多肽显示出与对dCTP的反应性相比对CTP的反应性更高的优良的底物特异性。

[0194] 参照特定方式详细地说明了本发明,但可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行各种变更和修正,这对于本领域技术人员而言是显而易见的。需要说明的是,本申请基于2021年9月10日提出的日本专利申请(日本特愿2021-147985),通过引用而援引其整体。另外,本申请所引用的全部参照作为整体被并入。

[0195] 序列表自由文本

[0196] 序列号1:SplicC的碱基序列

[0197] 序列号2:SplicC克隆用引物__Fw的碱基序列

[0198] 序列号3:SplicC克隆用引物__Rv的碱基序列

[0199] 序列号4:pET21a Inverse用引物__Fw的碱基序列

[0200] 序列号5:pET21a Inverse用引物__Rv的碱基序列

[0201] 序列号6:pET21a-SplicC的插入物的氨基酸序列

[0202] 序列号7:LslicC的碱基序列

[0203] 序列号8:LslicC克隆用引物__Fw的碱基序列

[0204] 序列号9:LslicC克隆用引物__Rv的碱基序列

[0205] 序列号10:pET21a-LslicC的插入物的氨基酸序列

[0206] 序列号11:AhlicC的碱基序列

[0207] 序列号12:AhlicC克隆用引物__Fw的碱基序列

[0208] 序列号13:AhlicC克隆用引物__Rv的碱基序列

[0209] 序列号14:pET21a-AhlicC的插入物的氨基酸序列

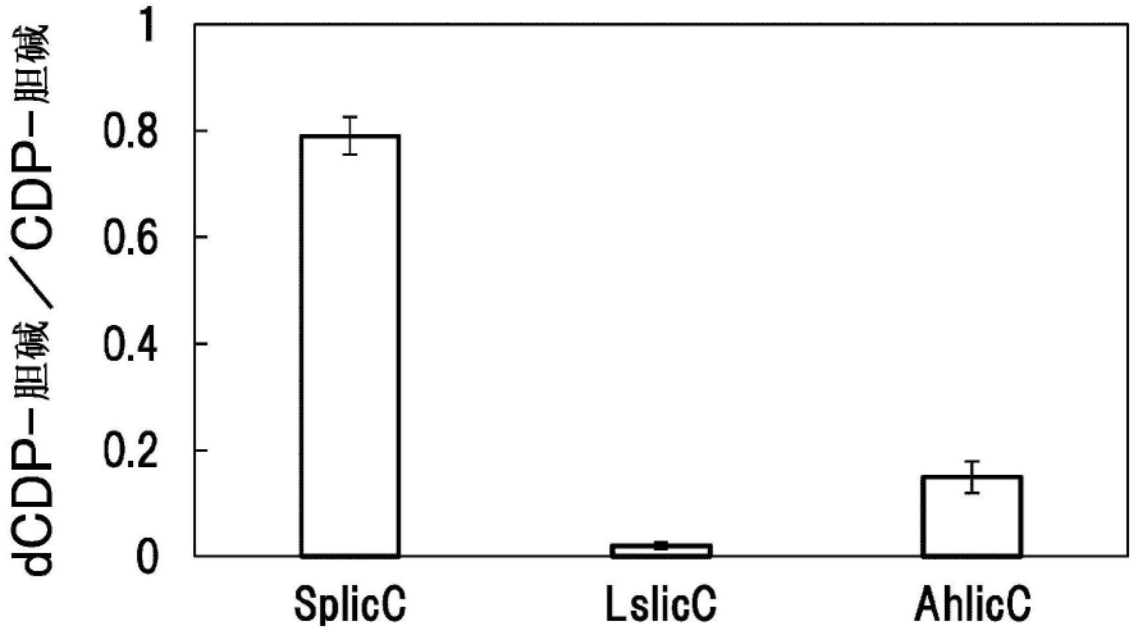


图1