

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4548864号
(P4548864)

(45) 発行日 平成22年9月22日(2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日(2010.7.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 P	13/04	(2006.01)	C 12 P	13/04	

請求項の数 37 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-516650
(86) (22) 出願日	平成9年9月25日(1997.9.25)
(65) 公表番号	特表2001-505048(P2001-505048A)
(43) 公表日	平成13年4月17日(2001.4.17)
(86) 國際出願番号	PCT/US1997/017133
(87) 國際公開番号	W01998/014602
(87) 國際公開日	平成10年4月9日(1998.4.9)
審査請求日	平成16年4月26日(2004.4.26)
(31) 優先権主張番号	08/723,896
(32) 優先日	平成8年9月30日(1996.9.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	ピー・シー・ビー・ユー・サービシーズ、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国、デラウエア・19801 、ウイルミントン、スウイート・1269 、デラウエア・アベニュー・300
(74) 代理人	弁理士 川口 義雄
(74) 代理人	弁理士 小野 誠
(74) 代理人	弁理士 井上 满
(74) 代理人	弁理士 一入 章夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】直接発酵手段によるD-アミノ酸の調製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) D-アミノ基転移酵素遺伝子およびL-アミノ脱アミノ酵素遺伝子を細胞中に組み込む工程、

(b) L-アミノ酸またはそのラセミ混合物を含む細胞培地中で細胞を培養する工程、および

(c) 細胞培地からD-アミノ酸を単離する工程

を含んでなる、細胞中でD-アミノ酸を生成する方法であつて、

細胞が、Bacillus subtilis、Bacillus sphaericus、Bacillus stearothermophilus、Pseudomonas、Klebsiella、Salmonella、Brevibacterium、Micrococcus、CorynebacteriumおよびEscherichia coliからなる群より選択される前記方法。

【請求項2】

D-アミノ脱アミノ酵素遺伝子が非機能的になるように細胞中にD-アミノ脱アミノ酵素遺伝子突然変異を導入する工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

細胞が、Escherichia coliである請求項1に記載の方法。

【請求項4】

dadA遺伝子が非機能的になるようにEscherichia coli細胞にdad

A遺伝子突然変異を導入する工程をさらに含む請求項3に記載の方法。

【請求項5】

D-アミノ基転移酵素遺伝子がBacillus sphacelatus D-アミノ基転移酵素遺伝子である請求項1に記載の方法。

【請求項6】

L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子がProteus myxofaciens L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子またはProteus mirabilis L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子である請求項1に記載の方法。

【請求項7】

細胞中にラセミ化酵素遺伝子を組み込む工程をさらに含む請求項1に記載の方法。

10

【請求項8】

ラセミ化酵素遺伝子が、アラニンラセミ化酵素、グルタメートラセミ化酵素、アスパルテートラセミ化酵素およびフェニルアラニンラセミ化酵素からなる群より選択される請求項7に記載の方法。

【請求項9】

ラセミ化酵素遺伝子が、アラニンラセミ化酵素である請求項8に記載の方法。

【請求項10】

D-アミノ酸が天然または非天然D-アミノ酸である請求項1に記載の方法。

【請求項11】

天然または非天然D-アミノ酸が、イソロイシン、ロイシン、トリプトファン、チロシン、バリン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、オルニチン、セリン、ノルロイシン、ノルバリン、フェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、シトルリン、システイン、ヒスチジンおよびリシンからなる群より選択される請求項10に記載の方法。

20

【請求項12】

天然D-アミノ酸がフェニルアラニンである請求項11に記載の方法。

【請求項13】

L-アミノ酸が、L-アラニン、L-グルタメート、L-フェニルアラニン、L-アルパルテートおよび前記L-アミノ酸のラセミ混合物からなる群から選択される請求項1に記載の方法。

30

【請求項14】

L-アミノ酸がアセパルテートである請求項13に記載の方法。

【請求項15】

L-アミノ酸が、イソロイシン、ロイシン、トリプトファン、チロシン、バリン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、オルニチン、セリン、ノルロイシン、ノルバリン、フェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、シトルリン、システイン、ヒスチジンおよびリシンからなる群より選択される請求項1に記載の方法。

【請求項16】

D-アミノ酸のエナンチオマー過剰率が94%より高い収量でD-アミノ酸を生成することを特徴とする請求項1の細胞の培養を用いてD-アミノ酸を調製する方法。

40

【請求項17】

エナンチオマー的に純粋なD-アミノ酸を調製する請求項16に記載の方法。

【請求項18】

D-アミノ基転移酵素遺伝子およびL-アミノ脱アミノ酵素遺伝子がプラスミドを用いて細胞中に組み込まれる請求項1に記載の方法。

【請求項19】

(a) D-アミノ基転移酵素遺伝子、L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子および、フェニルビルビン酸の生成を増加させるためのpheA遺伝子、aroH遺伝子またはそれらの混合物を細胞中に組み込む工程、

(b) L-アミノ酸またはそのラセミ混合物を含む細胞培地中で細胞を培養する工程、お

50

より

(c) 細胞培地からD-フェニルアラニンを単離する工程

を含んでなる、細胞中でD-フェニルアラニンを生成する方法であって、

細胞が、Bacillus subtilis、Bacillus sphaericus、Bacillus stearothermophilus、Pseudomonas、Klebsiella、Salmonella、Brevibacterium、Micrococcus, CorynebacteriumおよびEscherichia coliからなる群より選択される前記方法。

【請求項20】

D-アミノ脱アミノ酵素遺伝子が非機能的になるように細胞中にD-アミノ脱アミノ酵素遺伝子突然変異を導入する工程をさらに含む請求項19に記載の方法。 10

【請求項21】

細胞が、Escherichia coliである請求項19に記載の方法。

【請求項22】

dadA遺伝子が非機能的になるようにEscherichia coli細胞にdadA遺伝子突然変異を導入する工程をさらに含む請求項21に記載の方法。

【請求項23】

D-アミノ基転移酵素遺伝子がBacillus sphaericus D-アミノ転移酵素遺伝子である請求項19に記載の方法。 20

【請求項24】

L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子がProteus myxofaciens L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子またはProteus mirabilis L-アミノ脱アミノ酵素遺伝子である請求項19に記載の方法。

【請求項25】

細胞中にラセミ化酵素遺伝子を組み込む工程をさらに含む請求項19に記載の方法。

【請求項26】

ラセミ化酵素遺伝子が、アラニンラセミ化酵素、グルタメートラセミ化酵素、アスパルテートラセミ化酵素およびフェニルアラニンラセミ化酵素からなる群より選択される請求項25に記載の方法。 30

【請求項27】

ラセミ化酵素遺伝子が、アラニンラセミ化酵素である請求項26に記載の方法。

【請求項28】

L-アミノ酸が、L-アラニン、L-グルタメート、L-フェニルアラニン、L-アルパルテートおよび前記L-アミノ酸のラセミ混合物からなる群から選択される請求項19に記載の方法。

【請求項29】

L-アミノ酸がアセパルテートである請求項28に記載の方法。

【請求項30】

培地が基質としてL-フェニルアラニンを含む請求項19に記載の方法。

【請求項31】

D-フェニルアラニンのエナンチオマー過剰率が94%より高い収量でD-フェニルアラニンを生成することを特徴とする請求項19の細胞の培養を用いてD-フェニルアラニン酸を調製する方法。 40

【請求項32】

エナンチオマー的に純粋なD-フェニルアラニンを調製する請求項30に記載の方法。

【請求項33】

D-アミノ基転移酵素遺伝子およびL-アミノ脱アミノ酵素遺伝子がプラスミドを用いて細胞中に組み込まれる請求項31に記載の方法。

【請求項34】

Bacillus sphaericus D-アミノ基転移酵素遺伝子およびProt 50

e u s m y x o f a c i e n s L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子または P r o t e u s mirabilis L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子を含んでなる組換え細胞であつて、
細胞が、B a c i l l u s s u b t i l i s 、B a c i l l u s s p h a e r i c u s 、B a c i l l u s s t e a r o t h e r m o p h i l u s 、P s e u d o m o n a s 、K l e b s i e l l a 、S a l m o n e l l a 、B r e v i b a c t e r i u m 、M i c r o c o c c u s 、C o r y n e b a c t e r i u m および E s c h e r i c h i a c o l i からなる群より選択される前記方法である前記組換え細胞。

【請求項 35】

D - アミノ脱アミノ酵素遺伝子が非機能的になるように細胞中に D - アミノ脱アミノ酵素遺伝子突然変異を更に含む請求項 34に記載の組換え細胞。 10

【請求項 36】

S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m ラセミ化酵素遺伝子をさらに含む請求項 34 に記載の組換え細胞。

【請求項 37】

S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m 遺伝子がアラニンラセミ化酵素である請求項 36 に記載の組換え細胞。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、D - アミノ酸を製造するための材料および方法に関する。特に、本発明は、組換え宿主細胞を用いる天然および非天然の両方のD - アミノ酸の調製に関する。具体的には、本発明は、エナンチオマー的に純粋なD - アミノ酸を製造するために組換え細胞を用いる発酵プロセスに関する。 20

発明の背景

グリシン、トレオニンおよびイソロイシンを除いて、共通の天然産アミノ酸の各々は、偏光面を回転させる方向により左旋性または右旋性と呼ばれる2つの光学異性体の1つとして存在する。不斉炭素を有さないグリシンは光学異性体を有さない。各々2つの不斉炭素を有するトレオニンおよびイソロイシンは、各々4つの光学異性体を有する。アラニンおよびグルタミンのような一部のアミノ酸は右旋性であり、正(右回り)回転を発生させる。フェニルアラニンやトリプトファンのような他のものは、左旋性であり、負(左回り)回転を発生させる。すなわち、アミノ酸は、単離時に光学異性を反映するようにL - またはd - アミノ酸と呼ぶことができる。所定のアミノ酸により生じる特定の回転は、温度およびpHにより変化する。 30

従来法により、アミノ酸の - 炭素の回りの立体配置がグリセルアルデヒドのD立体異性体(エナンチオマー)に相当するかL立体異性体に相当するかに基づき、アミノ酸は(前記dまたはLの表示に対して)DまたはLとも呼ばれるが、これは独断的な基準である。一部のアミノ酸は中性pHで水溶液中に入れたときに右旋性であることにも拘わらず、その基準によれば大部分の天然産アミノ酸はLアミノ酸となる。アミノ酸に作用する大部分の酵素は、アミノ酸のL - 型のみを認識する非対称結合領域を有する。従って、大部分の天然産タンパクはL - アミノ酸を含む。 40

しかしながら、D - アミノ酸が生成され細胞により利用される例外がある。これらの中でも主用なものは、特定の微生物によるD - グルタメートおよびD - アラニンの生成である。D - グルタメートおよびD - アラニンは、主に細菌細胞中で生成され、ムレインの合成において利用される。D - グルタメートおよびD - アラニンの不存在下では、不完全な細菌細胞壁が形成され、細胞溶解につながる。大部分の細菌は、直接合成ではなく、アミノ酸特異的ラセミ体によって対応するL - アミノ酸を転化させることによりD - アミノ酸を生成する。例えば、多くの細菌細胞は、L - アラニンとD - アラニンとの間の双方向転化を触媒してL - アラニンとD - アラニンとのラセミ(50 : 50)混合物を発生させるアラニンラセミ体を有する。同様に、グルタメートラセミ化酵素はD - グルタメートとL - グ 50

ルタメートとのラセミ混合物を生成し、前者は細胞壁中に取りこまれ、後者は特にタンパクの生成に利用される。これらの2つの酵素の特異性は、いずれか一方が欠けると不完全な細胞壁形成により細胞が溶解することにより示される。

Bacillus 属の一員のような特定の細菌は、D - アミノトランスフェラーゼとして知られている酵素の状態で D - アミノ酸を形成するためにラセミ化酵素の代替物を有する。そのような酵素は、種々の D - アミノ酸および対応する - ケト酸のアミノ交換を可逆的に触媒する。PCT公開WO91/05870においてマンニング (Mannning) は、アミノ転移酵素 (アミノトランスフェラーゼ : aminotransferase) で触媒することにより D - アラニンおよび D - グルタメートを微生物的に合成する方法を報告している。マンニングは、2頁において、Bacillus sphaericus D - アミノ転移酵素の使用を報告しているが、該公報は、実際には、痕跡量以上の D - アミノ酸の合成を効果的に触媒することができない D - アミノ転移酵素の好熱性種のクローニング、単離および使用のみを報告している。さらに、マンニングは、エナンチオマー的に純粋な D - アミノ酸を触媒する Bacillus sphaericus D - アミノ転移酵素または他の任意の D - アミノ転移酵素を単離または使用するいかなる手段も報告していない。

マンニングの Bacillus sphaericus D - アミノ転移酵素への言及は誤りであるという証拠が、マンニングの公報の2頁に見られ、ここでマンニングは D - アミノ転移酵素DNAをプラスミド pICT113 上にクローニングしたと述べている。Stoddardらの J. Mol. Biol., 第196巻: 441頁および442頁(1987年)に報告されているように、プラスミド pICT113 は、Bacillus sphaericus 属ではなく D - アミノ転移酵素の好熱性種を担持する。この事実の重要性は、好熱性種が D - フェニルアラニンの多量の生成を効果的に触媒することができず、従って、D - フェニルアラニン酸の生成のための組換え法において役に立たないということである。

本出願の前ににおいて、Bacillus sphaericus D - アミノ転移酵素の唯一の報告は Transaminases, Christenら(編)、464頁(1985年)において見られる部分的 C - 末端配列である。しかしながら、本発明から明らかであるように、その部分的配列は誤りであり、Bacillus sphaericus

D - アミノ転移酵素の単離において有用ではない。従って、組換え手段または他の手段による D - アミノ酸の製造において Bacillus sphaericus D - アミノ転移酵素を報告している先行文献はない。他の D - アミノ転移酵素は単離されているが、Bacillus sphaericus 種により生成されるものとは違って、D - フェニルアラニンがこれらの酵素にとって比較的乏しい基質である。Tanizawaら, J. Biol. Chem., 第264巻: 2445および2449頁(1989年)。

本発明は、エナンチオマー的に純粋な天然および非天然 D - アミノ酸を生成する組換え材料および方法を提供する。

発明の概要

本発明は、天然および非天然 D - アミノ酸の生成のための材料および方法に関する。特に、本発明は、組換え宿主細胞を用いて D - アミノ酸を生成するための発酵法に関する。

特に、本発明は、

(a) D - アミノ転移酵素遺伝子および L - アミノ脱アミノ酵素 (デアミナーゼ : deaminase) 遺伝子を細胞中に組み込む工程、

(b) 細胞培地中で細胞を培養する工程、および

(c) 細胞培地から D - アミノ酸を単離する工程

を含んでなる、細胞中で D - アミノ酸を生成する方法に関する。

本発明は、また、

(a) D - アミノ転移酵素遺伝子、L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子および、フェニルピルベートの生成を増加させるための手段を細胞中に組み込む工程、

(b) 細胞培地中で細胞を培養する工程、および

(c) 細胞培地から D - フェニルアラニンを単離する工程

10

20

30

40

50

を含んでなる、細胞中でD - フェニルアラニンを生成する方法にも関する。

本発明の方法は、さらに、D - アミノ脱アミノ酵素遺伝子が非機能的になるようにD - アミノ脱アミノ酵素遺伝子突然変異種を細胞中に導入する工程を含んでよい。

本発明は、また、エネンチオマー的に純粋なD - アミノ酸の生成において用いるための組換え細胞の調製にも関する。

【図面の簡単な説明】

図1は、D - アミノ酸を生成するための本発明の方法を説明する一般的概略図である。

図2は、本発明の方法を用いるD - フェニルアラニンの生成を説明するスキームである。

図2において、以下の略語を用いる：E 4 Pはエリスロース - 4 - ホスフェート、P E Pはホスホエノールビルベート、およびD A H Pは3 - デオキシ - D - アラビノヘプツロソネート - 7 - ホスフェートである。 10

図3は、プラスミドp I F 1 0 0 2の構築を示す概略図である。

図4は、プラスミドp I F 1 0 0 3の構築を示す概略図である。

図5は、プラスミドp I F 3 1 8の構築を示す概略図である。

図6は、プラスミドp J N 3 2 6の構築を示す概略図である。

図7は、プラスミドp I F 3 1 9の構築を示す概略図である。

図8は、プラスミドp I F 3 2 0の構築を示す概略図である。

図9は、プラスミドp I F 3 2 1の構築を示す概略図である。

図10は、プラスミドp I F 3 3 3の構築を示す概略図である。

図11は、プラスミドp A L R 1 8の構築を示す概略図である。 20

図12は、プラスミドp P T 3 6 2の構築を示す概略図である。

図13は、プラスミドp P T 3 6 3の構築を示す概略図である。

図面の簡単な説明

本発明は、D - アミノ酸を生成するための材料および方法に関する。本発明の一般的な方法を図1に示す。本発明は、細菌細胞中に、D - アミノ転移酵素遺伝子(d a t)およびL - アミノ脱アミノ酵素遺伝子(l a d)が導入される方法に関する。D - アミノ転移酵素遺伝子産物、すなわち、D - アミノ転移酵素(D a t)が、D - アミノ酸基質とケト酸前駆体との間のアミノ基転移反応を触媒する。アミノ基転移反応において、ケト酸前駆体をその対応するD - アミノ酸に転化し、D - アミノ酸基質をそのケト酸型に転化する。すなわち、D - アミノ酸基質は、アミノ基転移反応においてアミノ供与体として機能する。 30

L - アミノ転移酵素遺伝子産物、すなわち、L - アミノ転移酵素(L a t)は細胞中に天然に存在する。D - アミノ転移酵素遺伝子産物は、細胞中において基質としてのケト酸前駆体に関してL - アミノ転移酵素遺伝子産物と競合する。L - アミノ転移酵素は、ケト酸前駆体の状態のL - アミノ酸を形成するようなL - アミノ酸基質とケト酸前駆体との間のアミノ基転移反応を触媒する。しかしながら、L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子を細胞中に導入されると、その遺伝子産物は、細胞中に存在する任意のL - アミノ酸のその対応するケト酸状態への脱アミノ反応を触媒する。L - アミノ酸の脱アミノ反応によりに形成されるケト酸は、D - アミノ転移酵素遺伝子により、基質として用いられるさらなるケト酸前駆体を提供する。D - アミノ転移酵素によりケト酸前駆体をその対応するD - アミノ酸型に転化することは、D - アミノ酸産物を脱アミノ化するD - アミノ脱アミノ酵素を生成するように細胞中に存在するD - アミノ脱アミノ酵素遺伝子が存在しないので、不可逆的である。 40

本発明の好ましい態様において、D - アミノ転移酵素およびL - アミノ転移酵素に利用できる望ましい基質を過剰に生成するために、アミノ酸基質およびケト酸前駆体の生成のための酵素をコードする遺伝子を細胞中に組み込むことができる。組み込まれる遺伝子は、ラセミ化酵素遺伝子または、アミノ酸基質またはケト酸前駆体の生合成に関与する律速酵素をコードする遺伝子であることができる。あるいは、アミノ酸基質及び/又はケト酸前駆体を、D - アミノ酸の生成中に細胞のための培地の一部として提供することができる。基質としてL - アミノ酸またはラセミ体アミノ酸を含む細胞培地の場合、細胞培地の一部として添加されたL - アミノ酸をD - アミノ酸に転化するためのラセミ化酵素を過剰に製 50

造するように、ラセミ化酵素遺伝子が好ましく細胞中に導入される。さらに、L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子産物の存在は、細胞中に存在するL - アミノ酸を脱アミノ化してD - アミノ転移酵素が基質として用いるための対応するケト酸前駆体を生成させる。

本発明の方法で用いるのに好適な細胞は、限定はされないが、以下の細菌細胞を含む：*Bacillus subtilis*、*Bacillus sphaericus*、*Bacillus stearothermophilus*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Salmonella*、*Brevibacterium*、*Micrococcus*、*Corynebacterium*および*Escherichia coli*。本発明のもう一つ的好ましい態様において、細胞は*Escherichia coli*である。10

本発明のもう一つ的好ましい態様において、*Bacillus stearothermophilus*細胞の使用は、穏やかな好熱性であり、それにより、反応速度が速い高温においてD - アミノ酸の調製を行うことができるというさらなる利点を有する。従って、D - アミノ酸を調製するための製造時間が短縮される。

一つの好ましい態様において、*Proteus myxofaciens*からのL - アミノ脱アミノ酵素遺伝子、および*Bacillus sphaericus*からのD - アミノ転移酵素遺伝子が細胞に導入される。これらの遺伝子の両方が、以下の表1に示すような非常に広い基質範囲を有する酵素をコードする。基質は、天然と非天然の両方のD - およびL - アミノ酸を含む。さらに、これらの酵素の基質範囲は、標準的突然変異手段を用いてそれぞれの遺伝子を突然変異させることにより増える。20

表 1 . L ad および D at 酵素のための天然および非天然アミノ酸基質

L ad 基質	D at 基質	
アラニン	ピルビン酸	
フェニルアラニン	フェニルピルビン酸	
イソロイシン	α -ケトイソカプロエート	
ロイシン	α -ケトイソ吉草酸	
トリプトファン	インドール-3-ピルビン酸	10
チロシン	ヒドロキシフェニルピルビン酸	
バリン	α -ケトイソ吉草酸	
アルギニン	5-グアニジノ-2-オキソ吉草酸	
アスパラギン	2-オキソスクシンアミド酸	
グルタミン	試験せず	
メチオニン	2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸	
オルニチン	5-アミノ-2-オキソペンタン酸	20
セリン	3-ヒドロキシピルビン酸	
ノルロイシン	2-オキソヘキサン酸	
ノルバリン	2-オキソペンタン酸	
ジヒドロキシフェニルアラニン	ジヒドロキシフェニルピルビン酸	
シトルリン	α -オキソ- γ -ウレイドノ吉草酸	
システイン	試験せず	30
ヒスチジン	2-オキソ-4-イミダゾールプロピオン酸	
リシン	6-アミノ-2-オキソヘキサン酸	

もう一つの好ましい態様において、*Proteus mirabilis*からのL-アミノ脱アミノ酵素および*Bacillus sphaericus*からのD-アミノ転移酵素遺伝子を細胞中に導入する。

本発明の一つの好ましい態様において、好ましい宿主細胞は*Escherichia coli*菌株pIF3である。*Escherichia coli*菌株pIF3は、American Type Culture Collection, 12301 Park lawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A.から得ることのできるRY347菌株(ACCT受託番号69766)である。pIF3菌株は、Millerら著、ここで参考として取り入れる、A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1992年)に記載のように、バクテリオファージP1での形質導入によりL-アミノ転移酵素遺伝子typB+およびilvEの野生型複製が細胞中の染色体に導入されている点において、RY347と異なる。typB+およびilvE遺伝子は、ケト酸前駆体をその対応するL-アミノ酸型に転化するL-アミノ転移酵素をコードする。

野生型アミノ転移酵素遺伝子typB+およびilvEをpIF3細胞に再度導入することは、RY347よりも細胞成長が向上するというさらなる利益を有するが、これは、お 40 50

そらく L - アミノ転移酵素遺伝子産物のなんらかの定義されていないさらなる機能によるものである。特に、好ましい L - アミノ転移酵素遺伝子は、限定はされないが、*aspC*、*tyrB* および *ilvE* を含む。

本発明の D - アミノ酸の生成において用いられる細胞の染色体は、Miller ら著、ここで参考として取り入れる、A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992年) に記載のような標準的技術を用いて突然変異させることができ。一つの特別の態様において、*dadA* 遺伝子が非機能的になるように *Escherichia coli* 細胞に *dadA* 遺伝子突然変異種が導入される。*Escherichia coli* 細胞は、遺伝子 *dadA* および *dadX* を含む *dad* オペロンを有する。*dadX* 遺伝子は、D型とL型の間でのアミノ酸のラセミ化に関するアラニン性ラセミ化酵素をコードする。*dadA* 遺伝子は、ある範囲の D - アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を行う D - アミノ脱アミノ酵素をコードする。*dad* オペロンは D - アラニンの存在下に誘発され、D - アミノ脱アミノ酵素および D - アラニンラセミ化酵素を生成する。*DadX* および *DadA* 酵素は、D - アラニンの取り込みおよびピルベートへの異化に関する膜複合体を形成する。*DadA* 酵素は、D - フェニルアラニンのような他の D - アミノ酸を脱アミノ化することもできる。従って、D - アミノ酸の過剰生成に関する *Escherichia coli* 細胞において、*DadA* 酵素の生成を防止するように *dadA* 遺伝子を突然変異させることが有利である。

さらに、L - アミノ転移酵素遺伝子 *aspC*、*ilvE*、*tyrB* または D - アミノ脱アミノ酵素 *dadA* 遺伝子中に突然変異を含む *Escherichia coli* 菌株を、*Coli Genetic Stock Center* (エール大学、New Haven、CT) から得ることができる。例えば、L - アミノ転移酵素遺伝子 *aspC*、*ilvE*、および *tyrB* 中に突然変異を有する *Escherichia coli* 菌株 DG 30、DG 31、DG 34 および DG、および D - アミノ脱アミノ酵素 *dadA* 遺伝子中に突然変異を有する *Escherichia coli* 菌株 EB 105 を、*Coli Genetic Stock Center* から得ることができる。

標的遺伝子の生体外発生フラグメントを宿主細胞染色体に運び込む温度感受性組換えプラスミドを用いて部位特異的に、欠失を含む突然変異種を細胞の染色体に導入することができる。例えば、プラスミドと宿主細胞との間の組換えを認識するためにプラスミド複製制御領域の温度感受性性質を用いることができるプラスミド p HSG 415 が米国特許第 5,354,672 号に開示されている。プラスミド上の標的遺伝子の欠失複製を、p HSG 415 を用いて細胞の染色体上の同じ遺伝子の野生型複製に交換することができる。その後の宿主細胞からのプラスミドの損失により、標的遺伝子において細胞が突然変異される。従って、p HSG 415 は、宿主細胞染色体を突然変異させる、または突然変異された宿主細胞染色体中に野生型遺伝子を再導入して戻す効果的手段を提供する。

本発明の一つ的好ましい態様において、細胞中に D - フェニルアラニンを生成する方法は、細胞中に D - アミノ転移酵素遺伝子および L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子を組み込むことを含む。D - アミノ転移酵素遺伝子産物は、D - アラニン基質とケト酸前駆体、フェニルピルベートの間のアミノ基転移反応を触媒して、D - フェニルアラニンおよびピルベートが生成される。基質 D - アラニンおよびフェニルピルベートは、通常、細胞中に存在し、前者は細胞壁中への組み込まれるものであり、後者は、L - フェニルアラニン合成の反応経路の最後の前駆体である。さらに、天然に存在する L - アミノ転移酵素遺伝子産物が、L - フェニルアラニンとピルベートを生成するような L - アラニンとフェニルピルベートとの間のアミノ基転移反応を触媒する。しかしながら、細胞中に L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子を導入すると、合成された L - フェニルアラニンの大部分を脱アミンしてフェニルピルベートに戻す L - アミノ脱アミノ酵素が生成され、一方、存在する L - フェニルアラニンの残りはタンパクの生成に用いられる。脱アミノ反応の結果として生成されるフェニルピルベートは、基質として D - アミノ転移酵素により利用されてさらに D - フェニルアラニンを生成することができる。細胞中での D - フェニルアラニンの生成は、D - フ

10

20

30

40

50

エニルアラニンを脱アミノするようなD - アミノ脱アミノ酵素遺伝子が細胞中に存在しないので、不可逆である。

本発明の方法を用いるD - アミノ酸の製造において、アミノ基転移反応においてアミノ供与体として用いるためのD - アミノ酸基質を高水準で有することが望ましい。例えば、D - フェニルアラニンの調製において、細胞へのD - アラニンの添加により、アミノ基転移反応のためのD - アラニン基質の高水準が保証される。

本発明の好ましい態様において、アラニンのラセミ混合物が、発酵中に、細胞培養の一部として細胞に添加される。さらに、アラニンラセミ化酵素をコードする細胞質アラニンラセミ化酵素遺伝子(a1r)が細胞中に導入される。アラニンラセミ化酵素が、細胞中ににおいて、50 / 50 のD - 、L - アラニン平衡を維持する。D - アミノ転移酵素の作用により細胞中でD - アラニンが消費されるので、アラニンラセミ化酵素はL - アラニンをD - アラニンに転化させる。このようにして、細胞壁中に導入される少量は別として、アミノ基転移反応においてアミノ供与体として用いるためのD - アラニン基質として、D - 、L - アラニン混合物の全てがD - アミノ転移酵素遺伝子に利用される。一つの好ましい態様において、細胞中に組み込まれたa1r遺伝子は、*Salmonella typhimurium*からクローニングされる。10

D - アミノ酸の生成中に細胞培養に添加することができる他の適当なアミノ供与体は、L - アラニン、L - グルタメート、L - フェニルアラニン、L - アスパルテート、または前記L - アミノ酸のラセミ混合物である。好ましくは、存在するアミノ供与体に依存して、グルタメートラセミ化酵素、アスパルテートラセミ化酵素またはフェニルアラニンラセミ化酵素のようなラセミ化酵素遺伝子も細胞中に組み込まれる。従って、D - アミノ転移酵素は、アミノ基転移反応に用いるのに有用なD - アミノ供与体基質を多量に有する。20

細胞中でのD - フェニルアラニンの生成を増加させるために、フェニルピルベートを生成する律速酵素をコードする遺伝子を導入することにより、細胞中でケト酸前駆体、すなわちフェニルピルベートの量を増加させることができる。細胞性芳香族アミノ酸生合成経路からのフェニルピルベート生成が、二つの律速酵素、PheAおよびAroHにより制御される。PheAおよびAroHをコードする遺伝子を細胞中に導入すると、フェニルピルベートが過剰に生成される。従って、フェニルピルベートの量の増加は、D - フェニルピルベートに転化するための、D - アミノ転移酵素遺伝子産物のより多くの基質を提供する。30

細胞中でのケト酸前駆体の量は、対応するL - アミノ酸を細胞に添加することにより増加させることもできる。L - アミノ酸の添加の場合、L - アミノ脱アミノ酵素がL - アミノ酸を脱アミノして対応するケト酸前駆体を形成させる。次に、ケト酸前駆体を、D - アミノ転移酵素が対応するD - アミノ酸に転化する基質として用いることができる。

本発明は、外因性D - アミノ転移酵素遺伝子および外因性L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子を含む組換え細胞にも関する。本発明の組換え細胞は、さらに、細胞中にD - アミノ脱アミノ酵素遺伝子突然変異を含むことができ、それによりD - アミノ脱アミノ酵素遺伝子が非機能的になる。本発明の組換え細胞は、さらに、外因性アラニンラセミ化酵素遺伝子、外因性aroH遺伝子および外因性pheA遺伝子を含むことができる。外因性D - アミノ転移酵素遺伝子は、*Bacillus sphaericus* D - アミノ転移酵素遺伝子であってよく、外因性L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子は*Proteus myxofaciens* L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子または*Proteus mirabilis* L - アミノ脱アミノ酵素遺伝子であってよく、外因性ラセミ化酵素遺伝子は、*Salmonella typhimurium*ラセミ化酵素遺伝子であってよい。40

本発明の組換え細胞の培養は、エナンチオマー的に純粋なD - アミノ酸を生成するために用いられる。開示された方法を用いて生成されるL - アミノ酸に対するD - アミノ酸のエナンチオマー過剰率(ee)は、存在するD - アミノ酸の量からL - アミノ酸の量を引き、D - とL - の両方のアミノ酸の合計量で割り、100をかけることにより決められる。好ましい態様において、D - フェニルアラニンは実質的に純粋な状態で高収率で得られる。D - フェニルアラニンを生成する方法は図2に示す。50

本発明の組換え細胞の培養を用い、D - アミノ転移酵素遺伝子産物のためのフェニルビルペート基質およびD - アラニンのさらなる原料としてD - 、L - アラニンおよびL - フェニルアラニンを添加すると、D - フェニルアラニン13.66 g / l およびL - フェニルアラニン0.47 g / l が得られ、エナンチオマー過剰率は94%であった。発酵プロセス中にD - 、L - アラニンのみを培養に添加すると、D - フェニルアラニン4.15 g / l が得られL - フェニルアラニンは得られず、エナンチオマー過剰率は100%であった。対照的に、発酵プロセス中にD - 、L - アラニンまたはL - フェニルアラニンを細胞培養に添加しない場合、D - フェニルアラニン1.12 g / l およびL - フェニルアラニン0.47 g / l が得られ、エナンチオマー過剰率は41%であった。

本発明の方法により生成したD - アミノ酸は、当業者に良く知られている手順を用いて単離することができる。例えば、開示された方法を用いて調製されたD - アミノ酸を単離する一つの方法を以下に示す。発酵完了時に、発酵プロセスを細胞から傾瀉する。D - アミノ酸産物の濃度を上げるためにプロセスの体積を減らすことができる。プロセスの減少は、典型的には、減圧下にプロセスを30 ~ 100 の温度に加熱することにより行われる。次に、D - アミノ酸を、プロセスのpHをアミノ酸産物の等電点から±1 の範囲に調節することにより沈澱させる。pH調整中、D - アミノ酸産物は沈澱する。沈澱に続いて、D - アミノ酸を、濾過、遠心分離または傾瀉を含む標準的方法によりプロセスから分離する。単離したD - アミノ酸産物を次に洗浄し、乾燥する。

Escherichia coli 中において、アミノ酸アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンが、それらのケト酸前駆体から直接合成される。発酵中に組換え細胞にL - アミノ酸またはラセミ混合物を添加することに加えて、特定のケト酸のための律速酵素を生成する遺伝子を導入することにより、所望のアミノ酸のケト酸前駆体を過剰に生成することができる。

以下の実施例は、本発明を実施する態様をより具体的にかつ詳細に説明するものである。それらは単なる例示であり、出発材料及び/又はプロセスパラメーターに小さな変化および修正を加え得ることが理解される。そのような変化がプロセスを実質的に変えない程度まで、以下の請求の範囲に記載の本発明の精神および範囲に入るものと考えられる。

実施例 1

D - アミノ転移酵素DNAの単離

Bacillus sphaericus の培養物を、D - アミノ転移酵素DNAの源としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(ATCC受託番号10208号)から得た。培養物を、未補足LB培地上にすじを付け、そして37で一晩増殖させた。染色体DNAを製造するために、單一コロニーを、使用して、1 L フラスコで50 mL ルリアプロセスに接種し、それを300 rpm、37で一晩振盪させた。その後、細胞を5分間、10,000 Gで遠心分離することによって回収し、0.85%生理食塩水で洗浄し、そして5分間再度、10,000 Gで遠心分離した。生じたペレットを、5 mL の10 mM グルコース、25 mM トリスHCl、pH 8.0、および10 mM エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)に再懸濁させた。アリコート量の50 μl RNAse Aを添加し、そして溶液を、穏やかに混合した。続いて、10 mL の0.4%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および100 μg / mL プロテアーゼKを混合溶液に添加し、それをその後、透明になるまで37でインキュベートした。その後、酢酸ナトリウム(pH 5.2)を、300 mMの最終濃度まで添加した。穏やかなフェノール抽出を、相の界面に見ることができる白色沈澱がなくなるまで水相にほとんど等しい量のフェノールを用いて行った。その後、水相を取り出し、そして染色体のDNAを2.5容積のエタノールを用いて沈澱させた。DNAペレットを、取り出し、300 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.2)に再溶解させた。エタノール沈澱を行い、そしてDNAペレットを取り出し、乾燥させ、2 mL 蒸留水に溶解させた。DNA濃度は、150 μg / mL であると測定した。上に記述される方法に加えて、細菌のDNAの単離のための標準的方法が知られ、そして例えば、分子生物学における最新のプロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)、2.4.1 - 2.4.5(Ausube

10

20

30

40

50

1 編、 1994 年) で報告されており、ここに参照して組込まれる。

その後、上に記載されるとおりに得られた染色体のDNAを、Mbo Iで部分的に消化させた。2-10 kbの範囲でフラグメントを生じる理想的な消化を、13 μgの染色体のDNAを用い、そして2.5 Mbo I (ニューイングランド・バイオラボズ (New England Biolabs) マサチューセッツ州ビバリー (Beverly, MA)) で40分間消化させて得た。上で示されるとおりおよそ13 μgの染色体のDNAを、バイオラボズ (Biolabs) のMbo I緩衝液中、37で100 μlの総量で2.5 UのMbo Iを用いて部分的に消化させた。17 μlのサンプルを、5、10、20、30、40分に取り、そして15 μlのサンプルを、50分に取った。氷上に載せたサンプルに存在するあらゆる制限酵素を破壊するため、全サンプルを65に加熱した。5 μlアリコート量の各サンプルを、ここで参照して組込まれるSambrookら (編集)、分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーズ・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) : 6.3-6.32 (1989年)) で記述されるとおりのTBE緩衝液を使用して、0.8%アガロースゲル上で電気泳動させた。電気泳動のデータから、40分で取られたサンプルは、2-10 kbサイズ範囲で大部分のDNAを含有すること、およびそれが、D-アミノ転移酵素の発現のためのプラスミドpIF306でライブラリーを構築するのに使用されるそれらのフラグメントであることが決定された。

プラスミド pIF306 を、 pBR322 (ニューイングランド・バイオラボズ (New England Biolabs) マサチューセッツ州ビバリー (Beverly , MA)) から誘導した。 pIF306 を構築するために、修飾 pheA プロモーターを、 pBR322 の単一の HindIII および SphI 部位の間に挿入した。 HindIII ~ SphI 挿入部内に、単一の BamHI および BglII 部位が存在する。修飾 pheA プロモーターを、その配列が以下の：

HindIII 35

BamHI Start
AAAGTCACAAGGGAGGATCCACTATGACATCGGAAAACCGTTACT

HaeII
GGCGCT

Haeeli
한국어
한국어판
한국어판

(配列番号 : 1)

のとおりであるもののような、共同所有の F o t h e r i n g h a m らにより、参照してここに組込まれる米国特許第 5 , 1 2 0 , 8 3 7 号で特徴づけられるものから誘導した。その各々が M b o I によって製造されたものに適合しうる末端を生じる B a m H I と B g I I I で、 p I F 3 0 6 を完全に消化することによって、ベクター D N A を製造した。消化を、2 時間、0 . 5 μ g のプラスミド D N A および 2 単位の各酵素を用いて、2 0 μ l の総量で、3 7 で行った。4 . 2 5 k b および 1 . 2 5 k b のフラグメントを生成し、1 % アガロース T B E ゲル上での電気泳動によって分離した。所望の 4 . 2 5 k b のフラグメントを、ゲルから切り取り、そしてゲル抽出キット(キアゲン社(Q i a g e n I n c .)、カリフォルニア州チャッツワース(C h a t s w o r t h))を用いて回収した。その後、そのフラグメントを、D N A の末端を脱リン酸化して、再環化を防ぐために、3 7 で 1 時間、製造業者の指示にしたがってバイオラボズの緩衝液番号 2 番中の 1 単位の酵素と一緒に、2 0 μ l の容積で子牛腸のフォスファターゼ(ニューイングランド・バイオラボズ(N e w E n g l a n d B i o l a b s) マサチューセッツ州ビバリー(B e v e r l y , M A))で処理した。その後、酵素を含まない D N A フラグメントを単離するために、混合物を P C R 精製キット(キアゲン)で処理した。

10

pIF306ベクターフラグメントを、およそ20ngのベクターフラグメントを、残りのおよそ12μlの40分の部分的消化物と合わせることによって、ATCCC第10208号の染色体のDNAの40分の部分的消化物（上を参照）から得たフラグメントにライゲートした。ライゲーションは、製造業者の指示にしたがってタカラ・ライゲーションキット（タカラ・バイオケミカルズ、パンベラ・コーポレーション（Takara Biochemicals, PanVera Corporation）、ウィスコンシン州マディソン（Madison, WI））を用いて達成された。ライゲーションを、17で2時間行い、その時に、DNAを、PCR精製キット（キアゲン）を用いて50μlの最終容量で回収した。生じたプラスミドを、25μF電気容量で2.5kVに設定したバイオ-ラッド・ジーンパルサーTMおよび200オームの抵抗に設定したバイオ-ラッドのパルス・コントローラーを使用して電気泳動にかけることによって、Escherichia coli、XL1-Blue（ストラタゲン（Stratagene）、カリフォルニア州ラホーラ（La Jolla, CA））に導入した。
10

形質転換体を、50μg/mlアンピシリンで補足したLB培地の上に載せた。およそ20,000の形質転換体を、生成しそして貯蔵した。その後、プラスミドDNAを、ここで参照して組込まれる分子クローニング：実験室マニアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）（Sambrookら編、2版、1989年）で報告されたとおり単離した。生じるプラスミドDNAを、25μF電気容量で2.5kVに設定したバイオ-ラッド・ジーン・パルサーTMおよび200オーム抵抗に設定したバイオ-ラッドのパルス・コントローラーを用いた電気泳動によって、Escherichia coli株WM335に組込んだ。株WM335を、オランダ国（The Netherlands）、スティト・ユニバーシティー・オブ・ユトレヒト（State University of Utrecht）、デパートメント・オブ・モレキュラー・セル・バイオロジー（Department of Molecular Cell Biology）のファバゲン・コレクション（Phabagen Collection）から得ることができ、そしてLugtenbergら、J. Bacteriol. 114巻：499-506頁（1973年）で報告され、ここに参照して組込まれた。細胞を、0.2cmのギャップでバイオラッド・ジーン・パルサーTMのキューベットでパルスにかけた。形質転換されるEscherichia coli細胞を、600nmで0.7の光学密度まで育成（50ml培養物）した。その後、細胞を、5分間10,000Gで遠心分離することによって回収し、そして30mlの脱イオン化蒸留水で洗浄した。細胞を、再回転させ、そして200μl脱イオン化蒸留水で再懸濁させ、そして40μlの細胞を、10μlの回収ライゲーションミックスと混合し、そして電気穿刺キューベット上に載せた。単一パルスを、そのキューベットにかけ、500μlSOC培地（GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD）を添加し、そして細胞懸濁液と混合した。その後、キューベットの内容物を、20mlのPVC管に移し、そして37度30分間インキュベートした。その後、細胞を、適切な培地に載せ、そして以下に示すとおり選択した。DNAを微生物に形質転換／トランスフェクションさせる多数の培地が知られており、そして本発明による方法で使用できる。例えば、Changら（編集）、電気泳動および電気融合についての指針（Guide to Electroporation and Electrofusion）（アカデミック・プレス（Academic Press）、1992年）参照。
20
30
40

形質転換体を、50μg/mlチミンおよび60μg/mlアンピシリンを補足されるが、D-グルタメートを欠く、LB培地に載せた。D-グルタメートを作ることのできる形質転換体のもののみが、その培地で生存できる。文献中の報告により、Bacillus sphaericusが、グルタメートのラセミ体を欠くと考えられるので、そのような細胞の全ては、Bacillus sphaericusのdat遺伝子を担持する形質転換体であることが必要とされる。しかし、2つの異なるクラスの形質転換体は、上で記述された手段によって単離し、一方は、dat遺伝子を担持し、そして他方は、グルタメートのラセミ体を担持した。ラセミ体含有クローンを、pIF1001と表し、そして50

dat 含有クローンを pIF1002 として表した。図3は、pIF1002の構築を示す概要図である。

各々の場合に、クローンを、制限エンドヌクレアーゼ消化によってマッピングし、そして遺伝子を、配列した。コードしたタンパク質の *dat* 遺伝子の配列および推定アミノ酸配列は、配列番号：2番および3番に示される。*dat* 遺伝子が、他の公知 *dat* 遺伝子配列のみと高度の配列相同性を示すことが分かった。Tanizawaら、J. Biol. Chem.、264巻：2450-2454頁(1989年)参照。しかし、pIF1002中の *Bacillus sphaericus* の *dat* 遺伝子によってコードされたD-アミノ転移酵素のC-末端アミノ酸配列は、C-末端配列のみが公表されている *Bacillus sphaericus* のD-アミノ転移酵素の他の公表された報告のみのものと一致しなかった。Christenら(編集)、464頁(1995年)のTransaminasesで報告されたその配列は、Val-Ile-(Phe-Tyr)-Leu-Ala-Leu(配列番号：4)であった。反対に、本発明に提供されるとおりの修正C-末端配列は、Leu-Pro-Ile-Ser-Ile-Asn-Ala(配列番号：5)である。*Bacillus sphaericus* のD-アミノ転移酵素コード遺伝子を単離するために、Christenで報告される配列を使用することが、試みられたが、結果が得られなかった。

その後、両方のクローンを、*dat* 遺伝子の存在についての生物学的アッセイにかけた。そのアッセイは、Methods in Enzymology、113巻：108-113頁(19)で報告され、ここで参照して組込まれた。簡便には、WM335細胞中のpIF1001またはpIF1002の培養を、50μl/m1のチミンおよび200μl/m1アンピシリンで補足された50m1のLB培地に設定した。培養物を、37で振盪インキュベーター内の500m1フラスコで一晩育成した。5分間、10,000Gで遠心分離することによって、細胞を収穫し、そしてpH8.5で50mMリン酸カリウムで洗浄した。細胞を、再度遠心し、そしてpH8.5で1m1の50mMリン酸カリウムに取った。その後、細胞を、1000lbs/インチ²でフレンチ・プレッシャー・セル(French Pressure Cell)を用いて溶解させ、そして溶解物を、30分間、マイクロフュージ内で14,000Cで遠心分離し、その時、上清を、マイクロピペットで抽出した。生じた細胞抽出物を、ここで参照して組込まれた、Methods in Enzymology、113巻：108-113頁(19)で報告されたとおり乳酸デヒドロゲナーゼ結合アッセイを用いて分析にかけた。アッセイ混合物は、0.3Mリン酸カリウム、pH8.5、25mMのD-アラニン、25mM-ケトグルタレート、0.1mM NADH、70μg/m1乳酸デヒドロゲナーゼおよび50μlの細胞抽出物を含有した。反応は、25で、1m1キューベット中のNADHおよび乳酸デヒドロゲナーゼを、他の成分に添加することによって開始させた。反応は、NADHの酸化の証拠として338nmでの吸収での変化を生じた。非特異的酸化について修正するために、細胞抽出物を欠くアッセイ混合物を使用する対照アッセイを行った。追加の対照として、D-アラニンを欠くアッセイ混合物を用いてアッセイを行った。未形質転換WM335細胞の抽出物および対照は、吸収で基本的に同一の変化を生じた、一方で、pTF1002を担持するWM335細胞は、対照より30倍多く過剰で吸収における変化を示した。*dat* 含有クローンは、高いコピー数のプラスミド pIF306での過剰発現の結果である *Bacillus sphaericus* の抽出物より約100倍大きい活性のレベルを示した。プラスミド pIF1001は、対照のものと同一の活性を示した。

実施例 2

プラスミド pIF1003 の構築

プラスミド pIF1003 は、プラスミド pLG338 (Stokerら、Gene 18巻：355-341頁(1982年)) の分配(Par)遺伝子座を担持する pIF1002 の誘導体である。プラスミド pLG338 の分配遺伝子座 (Stokerら、Gene 18巻：355-341頁(1982年))。分配遺伝子座は、細胞分裂の間にプラスミド分配を制御し、そうすることで、プラスミドベクターで分離安定性が増加するこ

とに寄与する。それはプラスミド維持において抗生物質の選択の必要性を減少または排除させる上で有用である。分配遺伝子座は、オリゴヌクレオチドプライマー：
5'GCCATCTCCTTGCATGCACCATTCC 3'

(配列番号：6)

5'CCCTCGCAAGCTCGTCCGGAGGCAAATCGCTGAATATTCC 3'

10

(配列番号：7)

とのPCRを使用してpLG338から単離できる。

その後、生じる992bpフラグメントを、制限酵素SphIおよびBspEI(ニュイングランド・バイオラボズ(New England Biolabs)、マサチューセッツ州ビバリー(Beverly, MA))で消化させ、そして生じた965bpのSphIからBspEIのフラグメントを、キアクイック・ゲル抽出キット(QIAquick gel extraction kit)(キアゲン)を用いて単離し、続いて1%アガロースTBEゲルで電気泳動を行った。その後、このフラグメントを、pIF1002のBspEI開裂および部分的SphI開裂によって生じた5.8kBのDNAフラグメントにライゲートして、pIF1003を生じた。図4は、pIF1003の構築物を示す概要図である。
 20

実施例3

プラスミドpIF321の構築

宿主細胞でD-フェニルアラニンの生成を可能にするベクターを構築するために、dat遺伝子を、PCRを用いてpIF1002から単離した。dat-コーディング領域の増幅を、0.2mlの商標マイクロアンプ(MicorAmpTM)反応試験管(パーキン-エルマー(Perkin-Elmer)、コネチカット州ノーウォーク(Norwalk, CT))中の商標アンプリタック(AmplitacTM)PCRキット(パーキン-エルマー(Perkin-Elmer)、コネチカット州ノーウォーク(Norwalk, CT))を用いて達成し、それに100ngのpIF1002DNA(1μl)、10ナノモル/mlの濃度でプラスミド：
 30

MB1809 5' CGCAGATCTACTATGGCATACTCATTATGG 3'

(配列番号：8) および

MB1810 5' CATGCCATGGATCCTCCTTTAGGTAGCTTTTAATC 3'

40

(配列番号：9)

の各々5μl；dATP、dCTP、dTTP、およびdGTP(各10mM)の各々2μl；15mMのMgCl₂、500mM KCl₂、100mMトリス(pH8.3)、および0.01%ゼラチンを含有する10μlの緩衝液；TaqDNAポリメラーゼ(5u/μlで0.5μl、アンプリタック(AmplitacTM))；および蒸留水を加えて、100μlの総量とした。各々、試験管に栓をし、そしてパーキンエルマーの96
 50

00 サーマル・サイクラーに入れた。增幅を、94で3分間予備加熱し、続いて94で30秒間変性させ、50で30秒間アニーリングし、そして72で、90秒間伸長させることを25サイクル行った。反応混合液を、4で保存した。

生じたおよそ914 bp PCR産物を、Bgl IIおよびNco Iで消化させ、そしてその後産物を、製造業者の指示に従ってライゲーション・キット(Ligation Kit)(タカラ・バイオケミカルズ(Takara Biochemicals))を用いてpIF306の4.5 kb BamHIからNco Iのフラグメントにライゲートさせた。生じるプラスミドは、pIF318と示された。pIF318の構築物は、図5に示される。

pIF319プラスミドは、ここに参照して組込まれた共同所有の米国特許第5,354,672号に開示されたpLG338プラスミドに基づき、カナマイシン耐性遺伝子を担持する強力な宿主株Escherichia coli HW857と争うことを避けるために、カナマイシン耐性マーカーをクロラムフェニコール耐性マーカーに置換された。プラスミドpIF319は、ここに参照して組込まれる共同所有の米国特許第5,120,837号に開示されるとおりのpheA34遺伝子、およびpLC338中の特徴的なEcoRIおよびSalI部位の間の合成オペロンでのaroH遺伝子を含む。pheA34対立遺伝子は、酵素のフェニルアラニン媒介フィードバック阻害を実質的に減少させるpheAコーディング配列中の変更を含む。それは、アテニュエーター配列を欠き、そして結合遺伝子の発現を増大させるpheAプロモーター領域の解除向性をも含む。

pheA34およびaroHの存在は、Escherichia coli W3110、およびあらゆるEscherichia coli K12株でのフェニルピルベートへの経路を効果的に解除する。プラスミドpIF319も、pJN307で特徴的なBamHIおよびSalI部位の間にEscherichia coliのaroH遺伝子を導入し、続いてBamHI部位にEscherichia coliのaspCプロモーターを導入することによって、米国特許第5,120,837号に開示されるpJN307から誘導できる。aroH遺伝子を、プライマー

5' CGCGGATCCTCGTCATGAACAGAACTGACGAACTCCG 3'

(配列番号: 10) および

30

5' ACGCGTCGACTCAGAACGGGTATCTACCGCAGAGG 3'

(配列番号: 11)

を用いたPCRによって、Escherichia coli W3110から単離した。生じたPCRフラグメントを、BamHIおよびSalIで開裂し、そしてpJN307の同様の開裂によって生成された8 kbのフラグメントにライゲートした。その後、aspCプロモーター領域を、生じた中間体プラスミド中の特徴的なBamHI部位に挿入した。aspCプロモーター領域を、プライマー

40

5' GGAAGATCTTACATCATCAACCAGATCGATTCTG 3'

(配列番号：12) および

5' CGCGGATCCATTATGGTTACAGAAGGGAAAGTCC 3'

(配列番号：13)

10

を用いたPCRによってEscherichia coli W3110から単離した。その後、生じたおよそ278bpのフラグメントを、BglIIおよびBamHIで開裂し、そして特徴的なBamHI部位で開裂したベクターにライゲートした。生じたライゲーションは、BIIIで、そしてBamHIで単独にのみ開裂されなかつDNA配列を生じ、そしてしたがって、aspCプロモーターの配向を確認するための簡単な手段を提供する。生じた構築物は、pJN326である。pJN326の構築物は、図6に示される。HindIIIおよびXhoIで開裂させてほとんど(520bp)のカナマイシン耐性遺伝子を欠失させ、そしてpHSG415のクロラムフェニコール耐性遺伝子をコードするDNAフラグメントを挿入することによって、プラスミドpJN319をpJN326から生成した。pHSG415のクロラムフェニコール耐性遺伝子を、プライマ

20

ー
5' CCGCTCGAGCCCCGACGCACTTGCGCCGA 3' (配列番号：14) および

5' CCCAAGCTTATCAGGCTCTGGGAGGCAG 3' (配列番号：15)

を用いたPCRによって単離した。生じたおよそ1191bpのフラグメントを、HindIIIおよびXhoIで開裂し、そしてpJN326の類似の開裂により生成された8.87kbのフラグメントにライゲートした。生じたプラスミドは、pIF319である。pJN319の構築物を、図7に示す。

pIF320プラスミドを構築するために、pIF318プラスミドを、dadX遺伝子を挿入するためのBamHIおよびSphIで開裂した。上に示されたMB1810プライマーは、そのプライマーにNcoI部位を重ねさせるBamHI部位(GGATCC)を含む。それは、dadXを導入して、datおよびdadXを含む合成オペロンを形成するのに使用されるBamHI部位(および下流SphI部位)である。dadX遺伝子配列は、ジーンバンク・データベース(Genbank database)、参考コードECODADAXから得た。その配列から、PCRプライマー
MB1811, 5' CGCGGATCCACTATGACCCGTCCGATACAGGCC 3'

30

(配列番号：16) および

40

MB1816, 5' TGCCATGCATGCCTACAGTTGCTGACCAGCCGG 3'

(配列番号：17)

を設計し、そしてEscherichia coli、株W3110(ATCC受託番号第27325号)からdadX遺伝子を単離するのに使用された。增幅条件は、まさに上述のとおりであった。その遺伝子は、その生来のプロモーターなしで単離し、そしてdat遺伝子挿入のすぐ下流にライゲートされる。増幅すると、BamHIおよびSphIで

50

開裂されたおよび 1171 bp のフラグメントになり、そして、同様に消化させた pIF318 にライゲートさせておよそ 4.8 kb のフラグメントを形成した。生じたプラスミドは、pIF320 と示され、そして合成オペロン中に dat および dadX 遺伝子を担持する。pIF320 の構築物は、図 8 に示される。

その後、pIF321 と示されるさらなるプラスミドを構築した。プラスミド pIF321 は、HindIII および SphI で pIF320 を開裂し、そして dat および dadX 遺伝子を担持する 2.1 kb のフラグメントを単離することによって生成され、その後、それは pIF319 の同様の開裂によって產生された 9.2 kb フラグメントにライゲートされた。pIF321 の構築物は、図 9 に示される。pIF321 プラスミドは、HindIII - から - SphI のフラグメント (HindIII - プロモーター - dat - dadX - SphI) で単離され、そして Escherichia coli のトリプトファン - 依存性 DHP シンターゼをコードする aroH 遺伝子と一緒に、上述の phxA34 対立遺伝子を含む pIF319 にライゲートされた pIF320 の dat および dadX 遺伝子を含んだ。

実施例 4

プラスミド pIF333 の構築

プラスミド pIF333 を生成するために、プラスミド pIF321 を、最初に、酵素 SphI および SalI を用いて開裂して、6.9 kB および 4.5 kB のフラグメントを得た。6.9 kB のフラグメントは、キアクイック (Quick) のゲル抽出キット (キアゲン) を用いて単離し、続いて 1% アガロース TBE ゲルで電気泳動にかけた。その後、このフラグメントを、pBR322 (ニューイングランド・バイオラボズ (New England Biolabs) マサチューセッツ州ビバリー (Beverly, MA)) の SphI および SalI 開裂から生成された 89 bp のフラグメントにライゲートし、そして同様に 2% アガロース TBE ゲルから単離した。生じたプラスミドは、pIF333 である。pIF333 の構築物は、図 10 に示される。

実施例 5

pALR18 の構築

アラニン・ラセミ体をコードする alr 遺伝子を、ATCC から得た Salmonella typhimurium 株 ATCC 受託番号第 19585 号から単離した。alr 遺伝子を、オリゴヌクレオチドプライマー :

5' CGCGGATCCACTATGCAAGCGGCAACAGTCGTC 3' (配列番号 : 18)

5' GGAGCATGCTTATTCAATACTTCATGCCAC 3' (配列番号 : 19)

を用いた PCR によって単離された。

1098 bp の PCR 産物を、BamHI および SphI で開裂し、キアクイック (Quick) のゲル抽出キット (キアゲン) を用いて単離し、続いて 1% アガロース TBE ゲルで電気泳動にかけた 1082 BamHI から SphI のフラグメントを生じた。その後、このフラグメントを、pIF333 の 5.7 kB のフラグメントにライゲートして、pALR18 を生成した。pALR18 の構築物は、図 11 に示される。

実施例 6

L-アミノデアミナーゼ遺伝子の単離および pPT363 プラスミドの構築

L-アミノデアミナーゼ遺伝子 (lad) を、2 分の延長時間および以下のオリゴヌクレオチド :

MB 2198:

5' TTTAGCGCATGCAAGGAGGATCAACTATGAACATTTCAAGGAGAAAG 3'

(配列番号 : 20)

MB2201:

5' AGCTTTGTCGACGGGCCCTTACTTAAAACGATCCAAAC 3'

(配列番号 : 21)

10
を用いた標準条件下で行われるPCR反応を用いて、*Proteus myxofaciens* 株 ATCC受託番号第19692号の染色体から単離した。

フラグメントを、酵素 *Sph*I および *Sal*I によって開裂し、そして同様の開裂から產生された pALR18 の 6.84kb フラグメントにライゲートした。生じたプラスミドは、pPT362 と名づけられた。pPT362 の構築物は、図12に示される。

pPT363 を、pPT362 およびプラスミド pIF321 から生成した。pPT362 および pIF321 の両方は、*Xba*I および *Apa*I で開裂した。pPT362 の 4.67kb フラグメントおよび pIF321 の 7.49kb フラグメントを単離し、そしてライゲートして pPT363 を生成した。pPT363 の構築物は、図13に示される。

実施例 7

株 IF3 の構築

Escherichia coli 株 pIF3 は、RY347 (ATCC受託番号第69766号) から誘導された。RY347 は、ここに参照して組込まれる、Millerら、「細菌遺伝学での短いコース」(A Short Course in Bacterial Genetics) で記述されるとおりの標準 P1 形質導入方法論を用いて *tyrB*+ に形質導入した。*tyrB*+ 形質導入体を選択することは、チロシンの栄養要求性突然変異の損失であり、同様にその株は、イソロイシンの栄養要求性突然変異の損失のために選択する *ileE*+ に形質導入された。生じた単離物は、pIF3 と示された。

実施例 8

外部アミノ供与体の添加なしの D - フェニルアラニンの製造の発酵プロセス

株 IF3 を、プラスミド pPT363 および pIF1003 で形質転換させた。形質転換 IF3 株を、1L の以下の育成培地 :

リン酸カリウム (二塩基性)	1 3 g
リン酸カリウム (一塩基性)	2 g
リン酸アンモニウム	4 g
クエン酸第二鉄アンモニウム	0. 24 g
酵母抽出物	2 g
硫酸マグネシウム (7*H ₂ O)	1 g
水	9 3 0 m l

を含む 2800m l フエルバッハ・フラスコに接種するのに使用した。

その株を、800 - 900 クレット単位に育成し、そして発酵槽に接種するのに使用した。発酵槽は、バイオラフィット 78 - 100 (セント・ゲルメイン・エン・ライ、フランス国 (St Germain-en Laye, France)) 20L であった。以下

10

20

30

40

50

は、発酵槽が操作される条件である。

攪拌	500 rpm
温度	32°C
背圧	0.7 バール
pH	50% KOH で 7.2
通気	1 vvm
設定容積	10 L
接種	1 L
運転時間	67 時間

10

使用された発酵培地は、以下の表に列記される。

硫酸マグネシウム ($7 * H_2O$)	5.35 g/l
クエン酸第二鉄アンモニウム	0.3 g/l
リン酸カリウム (二塩基性)	4.6 g/l
硫酸マンガン	0.023 g/l
消泡剤 (Mazur Mazu) DF 204	0.4 ml
$(NH_4)_2HPO_4$	21 g/l
酵母抽出物	5 g/l
L-アラニン	1 g/l

20

発酵プロセスの間、グルコースを、可変速度で供給して、最初の12時間で10 - 15 g / l、その後残りの時間1 g / l未満の濃度に、48時間で総量1204 gに達した。発酵により、產生されるべき1.12 g / lのD-フェニルアラニンおよび0.47 g / lのL-フェニルアラニンになる。

実施例 9

アミノ供与体として供給されたD-、L-アラニンの添加を伴うD-フェニルアラニンの产生のための発酵

40

実施例9の発酵プロセスは、以下の局面以外は実施例8の発酵プロセスと同じであった。総グルコース供給は、48時間で1976 gであった。酵母抽出物を、2 g / lで使用した。発酵培地は、D-、L-アラニン供給を含み、それにより総量1400 mlの167 g / lのD-、L-アラニンが、発酵の最初から12時間を初めとして1.9 ml / 分の速度で供給された。発酵により、产生されるべき4.15 g / lのD-フェニルアラニンおよび0 g / lのL-フェニルアラニンを生じた。

実施例 10

アミノ供与体としてD-、L-アラニンの、そしてケト酸前駆体としてL-フェニルアラニンの添加を伴うD-フェニルアラニンの产生のためのプロセス

50

実施例 10 の発酵プロセスは、以下の局面以外は、実施例 8 と同じであった。発酵に使用される育成培地は、以下の表に列記される。

硫酸マグネシウム (7 * H ₂ O)	8.03 g/l
クエン酸第二鉄アンモニウム	0.195 g/l
リン酸カリウム (二塩基性)	6.9 g/l
硫酸マンガン	0.0345 g/l
消泡剤 (Mazur Mazu) DF 204	0.6 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	31.5 g/l
酵母抽出物	7.5 g/l
L-アラニン	1.5 g/l

供給されるグルコースの量は、52時間で2021gだった。発酵培地としては、D-、L-アラニン供給が挙げられ、それにより、総量1400mlの167g/lのD-、L-アラニンが、発酵の最初から12時間を初めとして1.9ml/分の速度で供給された。さらに、L-フェニルアラニンを、D-、L-アラニンのときと同じ濃度と速度で供給した。発酵により、產生されるべき13.66g/lのD-フェニルアラニンおよび0.87g/lのL-フェニルアラニンを生じた

実施例 11

プラスミド pPT361 の構築

プラスミド pPT361 を、以下のとおり pIF306 から誘導した。pIF306 を、酵素 BamHI および SphI で開裂した。3.9kb フラグメントを、単離し、そして以下のオリゴヌクレオチドプライマー :

5' CGC GGA TCC ACT ATG ACC ACG AAG AAA GCT GAT TAC ATT

TGG 3'

(配列番号 : 22)

5' CAG CGT GCA TGC TTA TTG ATT AAC TTG ATC TAA CCA GC 3'

(配列番号 : 23)

を用いて、W3110 染色体からの PCR によって生成された Escherichia coli K12 ilvE 遺伝子を含む同様に開裂したフラグメントにライゲートした。

生じたベクターは、pIF307 と名づけられた。プラスミド pIF307 を、酵素 EcoRI および PstI で開裂し、そして 4.1kb フラグメントを単離した。これを、pLG338 から得たカナマイシン耐性遺伝子を含有する、同様に開裂および精製された 9.82bp の DNA フラグメントにライゲートした。これは、以下のオリゴヌクレオチドプライマー :

5' CCG GAA TTC ACG TTG TGT CTC AAA ATC TCT GAT 3'

(配列番号：24)

5' CCG CTG CAG GCC GTC CCG TCA AGT CAG CGT AAT G 3'

(配列番号：25)

でPCRを用いて生成された。

生じる開裂プラスミドは、pIF312と名づけられた。プラスミドpIF12を、EcoRIおよびBamHIで開裂し、そしてファージ・ラムダ・C1857遺伝子にライゲートし、それは、同様に開裂され、続いてテンプレートとしてラムダ・ZappIベクター（ストラジエン（Stragene）、カリフォルニア州ラホーラ（La Jolla, CA））、および以下のオリゴヌクレオチドプライマー：

5' TTTGGATCCTCTTAGTACATGCAACC 3' (配列番号：26)

5' TTTGAATTCCGGATGAAGATTCTTGCTCGATTGT 3' (配列番号：27)

を用いたPCRによって単離した。

生じたプラスミドをpPT353と名づけた。その後、このプラスミドを、PstIおよびEagIで開裂し、そして3.17kbのフラグメントを単離した。これを、pIF1003の同様の開裂によって生成された同様に開裂した2.5kbフラグメントにライゲートした。生じたベクターを、単離された4.7kbフラグメントと名づけた。これを、以下のオリゴヌクレオチドリンクター

5'
GATCCTAGGTACCGGTGCGGCCGCATGCTGACTGAAGATCCGGCGATTG
TACGCCGGTTTTATG 3'

(配列番号：28)

5'
TCGACATAAAAACCCGGCGTAGAATCGCCCAGGATCTTCAGTCAGTCAGCATG
CGGCCGCACCGGTACCTAG 3'

(配列番号：29)

にライゲートされた。

生じたプラスミドは、pPOT2と名づけられた。このプラスミドを、XbaIおよびPstIで開裂し、そして3.9kbフラグメントを単離した。これを、テンプレートとしてpIF319プラスミドDNAを、そして以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRによって単離されたクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むフラグメントにライゲートした。

5' GAC CTC GAG GCA CTT TGC GCC GAA TAA ATA CCT GTG 3'

(配列番号：30)

5' GAC CTG CAG CAC CAG GCG TTT AAG GGC ACC AAT AAC 3'

(配列番号：31)

10

20

30

40

50

生じたプラスミドは、p P O T 3と名づけられた。これは、B a m H T およびS p h Iで開裂した。4 . 8 b pのフラグメントを単離し、そしてP r o t e u s m y x o f a c i e n t s L a d 遺伝子を含む同様に開裂したフラグメントにライゲートした。これを、A T C C 第 1 9 6 9 2 号由来の染色体から、以下のオリゴヌクレオチドプライマー：
5' TTTGGATCCAAGATGAACATTCAAGGAGAAAG 3' (配列番号：32)

5' AGCTTGTCGACGCATGCTTACTTCTTAAACGATCCAAAC 3'

(配列番号：33)

を用いたP C Rで単離した。

10

実施例 1 2

L a d アミノ酸基質の測定

表1に列記された各々のアミノ酸基質を、以下の薄層クロマトグラフィー(T L C) L a d アッセイを用いたL a d 酵素に適切な基質であることが測定された。使用される全ての化合物は、ミズーリー州セントルイス(S t . L ou i s , M O)のシグマ・ケミカル社(S i g m a C h e m i c a l C o m p a n y)から得た。

アッセイミックスは、表1に列記される10 mg / m lのアミノ酸基質内の1つ、および7 . 5のp Hを示す100 mMトリスH C lを含む。アッセイミックス(2 m l)を、L a d 遺伝子を含有するプラスミドp P T 3 6 1を含む株W 3 1 1 0から得た100 mgの細胞ペレットに添加した。

20

細胞を、1 L 振盪フラスコ内で、37 度200 m lのL B 培地(ディフコ(D i f c o)、ミシガン州デトロイト(D e t r o i t , M i c h i g a n))の一晩培養から製造した。細胞を、100 mMトリスH C l(p H 7 . 5)で一度洗浄し、そして遠心分離でペレットにした。37 度16時間、0 . 0 0 5 m lの反応ミックスをシリカT L C プレート番号60番F - 254(イーエム・サイエンス(E M S c i e n c e)、オハイオ州シンシナティ(C i n c i n n a t i , O H))上にスポットを付けて、反応を行った。

以下の溶媒：水(4 0 %)；メタノール(4 0 %)；およびアセトニトリル(2 0 %)を用いて、クロマトグラフィーを行った。T L C プレートを、空気乾燥し、そしてエタノール中の2 % ニンヒドリンを噴霧し、そしてその後10分間焼いた。

30

表1に列記されたアミノ酸の各々をそれらの対応のケト酸に転化することを、同時クロマトグラフィーの公知水準に対するアミノ酸誘導スポットの不在によって測定した。表1に列記されたアミノ酸基質の各々が、L a d 酵素に適切な基質であることが分かった。

実施例 1 3

D a t ケト酸基質の測定

D a t 酵素を、以下の条件下の結合酵素アッセイで表1に列記した各ケト酸基質で分析した。使用される化合物の全てを、ミズーリー州セントルイス(S t . L ou i s , M O)のシグマ・ケミカル社(S i g m a C h e m i c a l C o m p a n y)から得た。

アッセイミックスは、500 u / m lのD a t ; 30 mM D - アラニン ; 30 mMケト酸基質 ; 0 . 2 mM N A D H ; および100 mMトリスH C lを含んだ。アッセイ混合物のp Hは、8 . 3であった。0 . 8 5 m lのアッセイミックス、0 . 0 5 m lのD - ラクテート、および0 . 5 - 1 . 0 のO . D .₆₅₀でプラスミドp I F 1 0 0 3を含む0 . 1 m lのW 3 1 1 0 細胞(A T C C 第 2 7 3 2 5 号)を含む1 m lの溶液を用いて、アッセイを行った。

40

細胞を、1 L 振盪フラスコ内で、37 度200 m lのL B 培地(ディフコ(D i f c o)、ミシガン州デトロイト(D e t r o i t , M i c h i g a n))の一晩培養から製造した。細胞を、100 mMトリスH C l(p H 7 . 5)で一度洗浄し、そして遠心分離し、そして水に取った。表1中のケト酸基質の各々の反応を、37 度 A₃₄₀を測定することによって観察した。表1中のケト酸基質アッセイの各々は、D a t 酵素に適切な基質であることが分かった。

50

【配列表】

配列番号： 1

配列の長さ： 9 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： genomic DNA

配列

AAGCTTTTTT GTTGACAGCG TGAAAACAGT ACGGGTATAA TACTAAAGTC ACAAGGAGGA

60

TCCACTATGA CATCGGAAAA CCCGTTACTG GCGCT

10

95

配列番号： 2

配列の長さ： 1 4 2 4

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号： CDS

存在位置： 4 2 7 . . 1 2 7 5

20

配列

ACAAGGAGGA TCCGTTAAC CAAACGTTAG CTGGTGTGTTA TCGCCGACAA ACGGGCGATA	60
ACGAAACACC TTTACTTTCA ACAGGCGGTG GAACGTATGC ACGCGTCTTG AAAAAAGGTG	120
TGGCATTCCG CATGCTTTTC CCTGGTGATC CAGATGTCAT GCATCGTGCG GATGAATATG	180
TAATTGTTGA TAAATTAGTA CAAGCTGCTG CTATTTATGC AGAAGCCATT GCAGAACTGG	240
CTGGGAAGTA AGTGTCACTTA AGAGCGTAAT GTTTCTTGC CAAAGAGATC ACGAAGCTTC	300
ACACGCCAAG CACTTCACTG AAAAATCTAC TTTGATTTAC TGCATCTGGT CTTACTTGAT	360
CGTCTAGTGG GAATCATTGT ACTTAAAAAT GTGAAAATAA CTTAAAAATG AAAAGGATGT	420
ATAAAC ATG GCA TAC TCA TTA TGG AAT GAC CAA ATC GTT GAA GAA GGA Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Glu Glu Gly	10 468
1 5 10	
TCT ATT ACA ATT TCA CCA GAA GAC CGT GGT TAT CAA TTT GGT GAT GGT Ser Ile Thr Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly	516
15 20 25 30	
ATT TAC GAA GTA ATC AAA GTA TAT AAC GGG CAT ATG TTT ACA GCA CAA Ile Tyr Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly His Met Phe Thr Ala Gln	564
35 40 45	
GAG CAC ATC GAT GCT TTC TAT GCT AGT GCC GAA AAA ATT CGC CTT GTT Glu His Ile Asp Ala Phe Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Leu Val	612
50 55 60	
ATT CCT TAT ACA AAA GAT GTA TTA CAC AAA TTA TTG CAT GAT TTA ATC Ile Pro Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys Leu Leu His Asp Leu Ile	660
65 70 75	
GAA AAA AAT AAT TTA AAT ACA GGT CAT GTT TAC TTC CAA ATT ACA CGT Glu Lys Asn Asn Leu Asn Thr Gly His Val Tyr Phe Gln Ile Thr Arg	708
80 85 90	
GGA ACA ACT TCT CGT AAC CAC ATT TTC CCG GAT GCA AGC GTA CCA GCA Gly Thr Thr Ser Arg Asn His Ile Phe Pro Asp Ala Ser Val Pro Ala	756
95 100 105 110	
G TG CTA ACA GGT AAT GTT AAA ACT GGT GAA CGT TCA ATT GAA AAT TTC Val Leu Thr Gly Asn Val Lys Thr Gly Glu Arg Ser Ile Glu Asn Phe	804
115 120 125	
GAA AAA GGC GTA AAA GCG ACA TTG GTT GAA GAT GTT CGT TGG TTA CGT Glu Lys Gly Val Lys Ala Thr Leu Val Glu Asp Val Arg Trp Leu Arg	852
130 135 140	
TGT GAT ATT AAA TCT TTA AAT TTA CTT GGC GCG GTA CTT GCG AAA CAA Cys Asp Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln	900
145 150 155	
GAA GCA TCT GAA AAA GGT TGT TAC GAA GCC ATT TTA CAC CGT GGA GAT Glu Ala Ser Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Asp	948
160 165 170	

ATT ATC ACA GAA TGT TCT TCT GCT AAT GTC TAT GGT ATT AAA GAT GGT Ile Ile Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val Tyr Gly Ile Lys Asp Gly 175 180 185 190	996
AAA CTT TAT ACG CAC CCA GCA AAT AAC TAC ATC TTA AAT GGT ATT ACA Lys Leu Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Tyr Ile Leu Asn Gly Ile Thr 195 200 205	1044
CGC CAA GTT ATA TTA AAA TGT GCC GCT GAA ATA AAT TTA CCA GTG ATT Arg Gln Val Ile Leu Lys Cys Ala Ala Glu Ile Asn Leu Pro Val Ile 210 215 220	1092
GAA GAG CCG ATG ACA AAA GGC GAT TTA TTA ACA ATG GAT GAA ATT ATT Glu Glu Pro Met Thr Lys Gly Asp Leu Leu Thr Met Asp Glu Ile Ile 225 230 235	1140
GTG TCT TCT GTT TCA TCT GAA GTG ACA CCG GTT ATC GAT GTG GAT GGT Val Ser Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro Val Ile Asp Val Asp Gly 240 245 250	1188
CAG CAA ATT GGT GCA GGT GTT CCT GGT GAA TGG ACT CGT AAA TTG CAA Gln Gln Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu Trp Thr Arg Lys Leu Gln 255 260 265 270	1236
AAA GCA TTT GAG GCA AAA TTA CCA ATT TCA ATT AAT GCC TAATCTGTAT Lys Ala Phe Glu Ala Lys Leu Pro Ile Ser Ile Asn Ala 275 280	1285
AAATGATTAA AAAGAGCTAC CTAAAACCTTG GTTATTGCC AAGTTAGGAG GGTAGCTCTT TTTTATAGAA TAAAATATGC ATGTATTCTC CTGAAACGTC ATGTAAAATA AAAAAGATAG CGCCTTTAGT CGATATCAC	1345
	20
配列番号 : 3	1405
配列の長さ : 283	1424
配列の型 : アミノ酸	
トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : タンパク質	
配列	

Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Glu Glu Gly Ser Ile
 1 5 10 15
 Thr Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Ile Tyr
 20 25 30
 Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly His Met Phe Thr Ala Gln Glu His
 35 40 45
 Ile Asp Ala Phe Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Leu Val Ile Pro
 50 55 60
 Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys Leu Leu His Asp Leu Ile Glu Lys
 65 70 75 80 10
 Asn Asn Leu Asn Thr Gly His Val Tyr Phe Gln Ile Thr Arg Gly Thr
 85 90 95
 Thr Ser Arg Asn His Ile Phe Pro Asp Ala Ser Val Pro Ala Val Leu
 100 105 110
 Thr Gly Asn Val Lys Thr Gly Glu Arg Ser Ile Glu Asn Phe Glu Lys
 115 120 125
 Gly Val Lys Ala Thr Leu Val Glu Asp Val Arg Trp Leu Arg Cys Asp
 130 135 140 20
 Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala
 145 150 155 160
 Ser Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Asp Ile Ile
 165 170 175
 Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Lys Leu
 180 185 190
 Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Tyr Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Gln
 195 200 205
 Val Ile Leu Lys Cys Ala Ala Glu Ile Asn Leu Pro Val Ile Glu Glu
 210 215 220 30
 Pro Met Thr Lys Gly Asp Leu Leu Thr Met Asp Glu Ile Ile Val Ser
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro Val Ile Asp Val Asp Gly Gln Gln
 245 250 255
 Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu Trp Thr Arg Lys Leu Gln Lys Ala
 260 265 270
 Phe Glu Ala Lys Leu Pro Ile Ser Ile Asn Ala
 275 280

配列番号 : 4

配列の長さ : 7 40

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Val Ile Phe Tyr Leu Ala Leu
1 5

配列番号 : 5

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸 50

鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：タンパク質
 配列
Leu Pro Ile Ser Ile Asn Ala
 1 5

配列番号：6
 配列の長さ：25
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 配列
GCCATCTCCT TGCATGCACC ATTCC

配列番号：7
 配列の長さ：40
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 配列
CCCTCGCAAG CTCGTCCGGA GGCAAATCGC TGAATATTCC

配列番号：8
 配列の長さ：30
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 配列
CGCAGATCTA CTATGGCATA CTCATTATGG

配列番号：9
 配列の長さ：39
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 配列
CATGCCATGG ATCCTCCTTT TAGGTAGCTC TTTTTAAC

配列番号：10
 配列の長さ：37 塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 配列
CGCGGATCCT CGTCATGAAC AGAACTGACG AACTCCG

配列番号：11
 配列の長さ：36
 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：g e n o m i c D N A
 配列
~~ACGCCTCGAC TCAGAACGG GTATCTACCG CAGAGG~~ 36
 配列番号：1 2
 配列の長さ：3 4
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状 10
 配列の種類：g e n o m i c D N A
 配列
~~GGAAGATCTT ACATCATCAA CCAGATCGAT TCTG~~ 34
 配列番号：1 3
 配列の長さ：3 3
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：g e n o m i c D N A
 配列
~~CGCGGATCCA TTATGGTTAC AGAAGGGAAAG TCC~~ 20
 配列番号：1 4
 配列の長さ：2 9
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：g e n o m i c D N A
 配列
~~CCGCTCGAGC CCGACGCCT TTGCGCCGA~~ 29
 配列番号：1 5
 配列の長さ：2 8
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：g e n o m i c D N A
 配列
~~CCCAAGCTTA TCAGGCTCTG GGAGGCAG~~ 30
 配列番号：1 6
 配列の長さ：3 3
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖 40
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：g e n o m i c D N A
 配列
~~CGCGGATCCA CTATGACCCG TCCGATAACAG GCC~~ 33
 配列番号：1 7
 配列の長さ：3 3 塩基対
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状 50

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

TGCCATGCAT GCCTACAGTT GCTGACCAGC CGG

33

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

10

CGCGGATCCA CTATGCAAGC GGCAACAGTC GTC

33

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

GGAGCATGCT TATTCAATAT ACTTCATCGC CAC

33

20

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 4 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

TTTAGCGCAT GCAAGGAGGA TCAACTATGA ACATTTCAAG GAGAAAG

47

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 3 8

配列の型 : 核酸

30

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

AGCTTGTGCG ACGGGCCCTT ACTTAAAACG ATCCAAAC

38

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 4 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

40

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

CGCGGATCCA CTATGACCAC GAAGAAAGCT GATTACATTT GG

42

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 3 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

50

CAGCGTGCAT GCTTATTGAT TAACTTGATC TAACCAGC

38

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

配列

CCGGAATTCA CGTTGTGTCT CAAAATCTCT GAT

33

配列番号 : 2 5

10

配列の長さ : 3 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

配列

CCGCTGCAGG CCGTCCCGTC AAGTCAGCGT AATG

34

配列番号 : 2 6

20

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

配列

TITGGATCCT CCTTAGTACA TGCAACC

27

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

30

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

配列

TTTGAATTG GATGAAGATT CTTGCTCGAT TGT

33

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 7 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

40

配列

GATCCTAGGT ACCGGTGC GG CCGCATGCTG ACTGACTGAA GATCCGGGC GATTCTACGC

60

CCGGGTTTTT TATG

74

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 7 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

配列

50

TCGACATAAA AAACCCGGGC GTAGAACATCGC CCGGGATCTT CAGTCAGTCA GCATGCGGCC 60
 GCACCGGTAC CTAG 74

配列番号 : 3 0

配列の長さ : 3 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

GACCTCGAGG CACTTTGCGC CGAATAAATA CCTGTG

10

36

配列番号 : 3 1

配列の長さ : 3 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

GACCTGCAGC ACCAGGCGTT TAAGGGCACC AATAAC

36

配列番号 : 3 2

20

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

TTTGGATCCA AGATGAACAT TTCAAGGAGA AAG

33

配列番号 : 3 3

30

配列の長さ : 4 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : g e n o m i c D N A

配列

AGCTTTGTCG ACGCATGCTT ACTTCTTAAA ACGATCCAAA C

41

【図1】

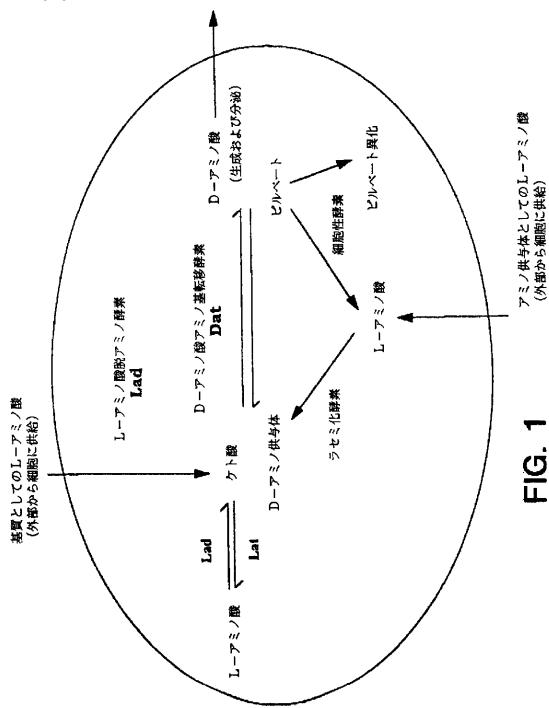


FIG. 1

【図2】

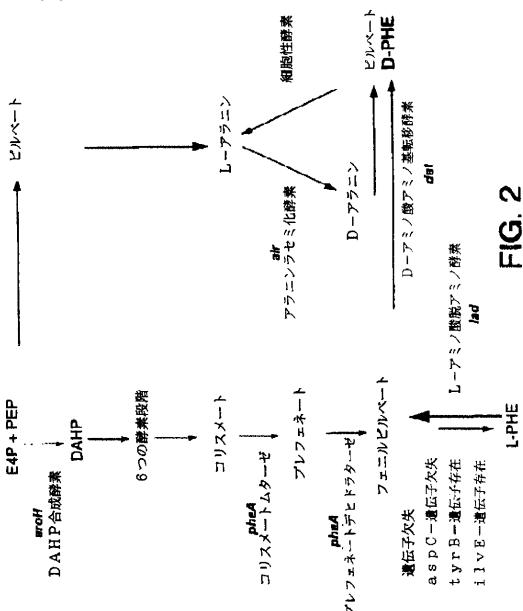


FIG. 2

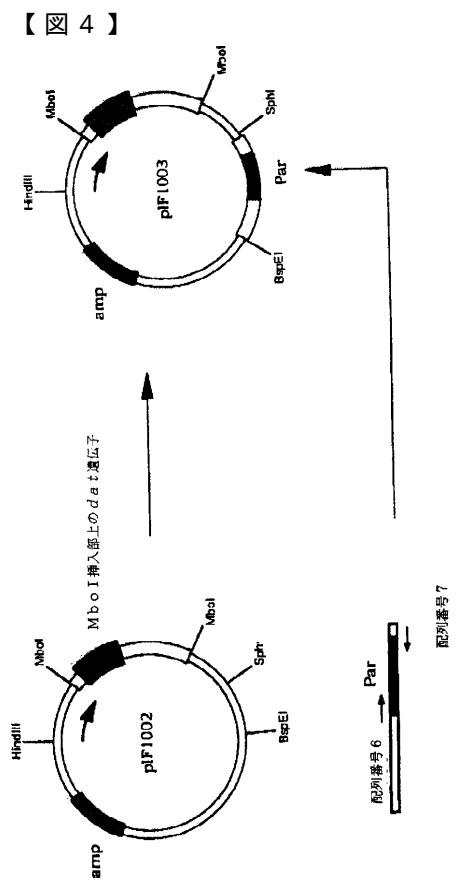
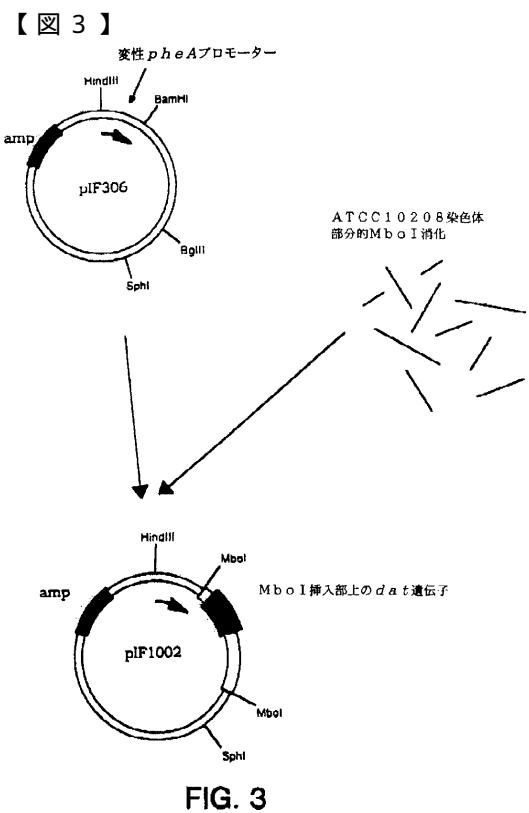


FIG. 3

FIG. 4

【図5】

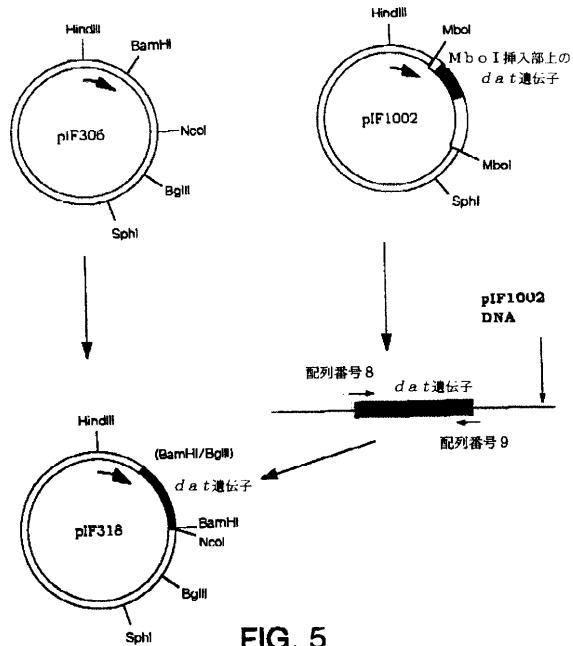


FIG. 5

【図6】

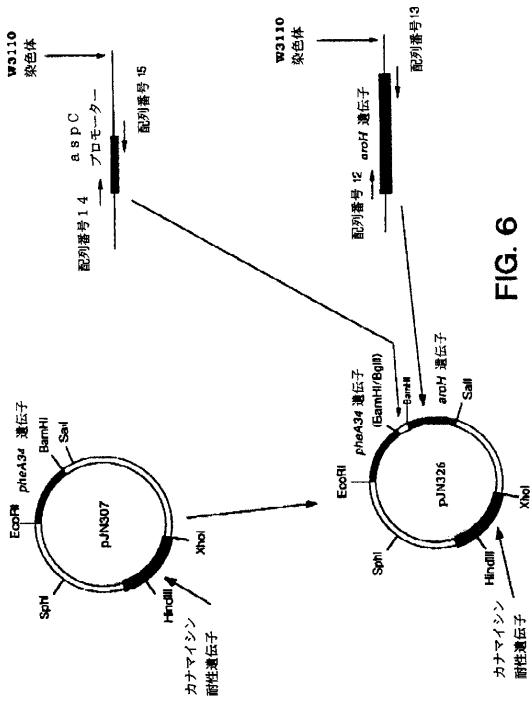


FIG. 6

【図7】

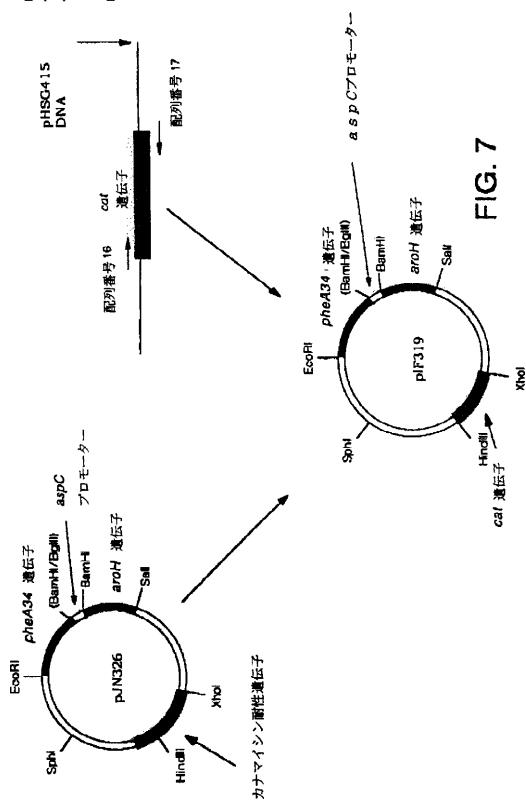


FIG. 7

【図8】

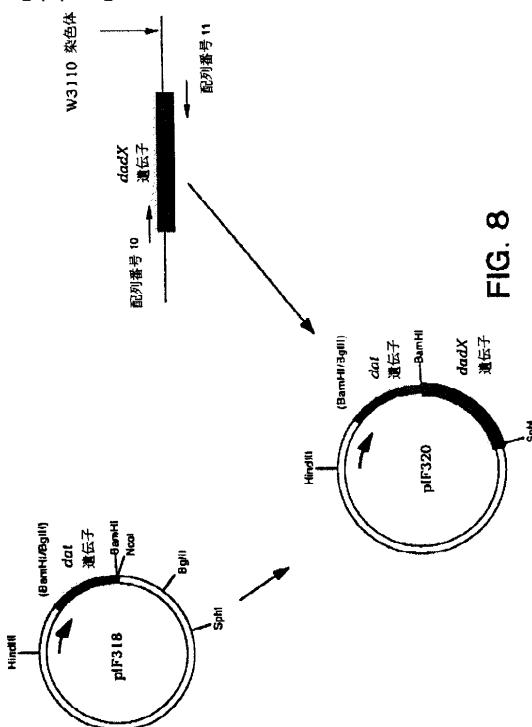


FIG. 8

【図 9】

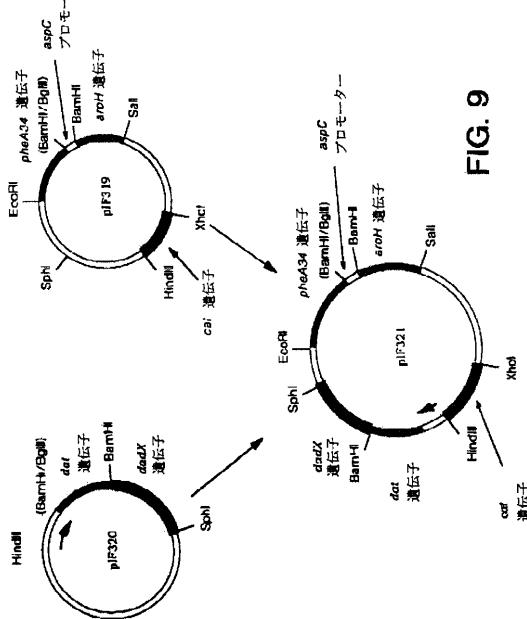


FIG. 9

【図 10】

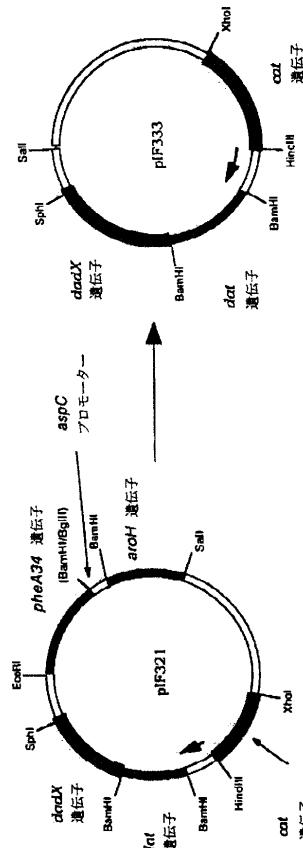


FIG. 10

【図 11】

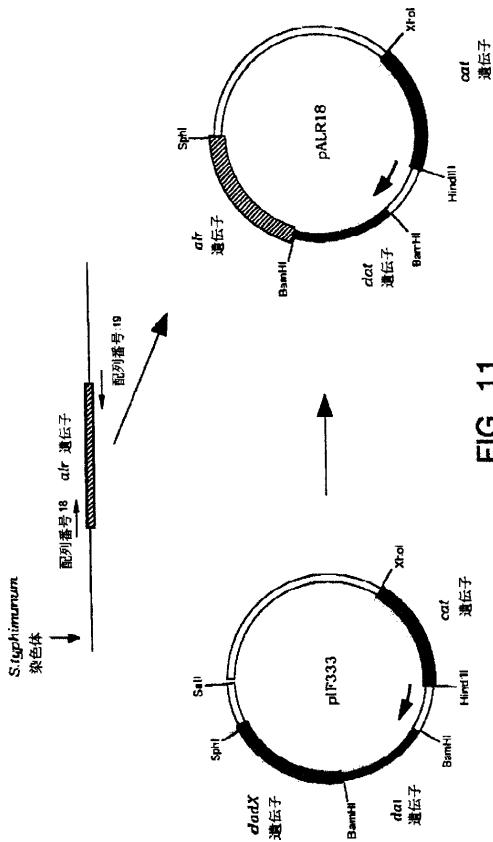


FIG. 11

【図 12】

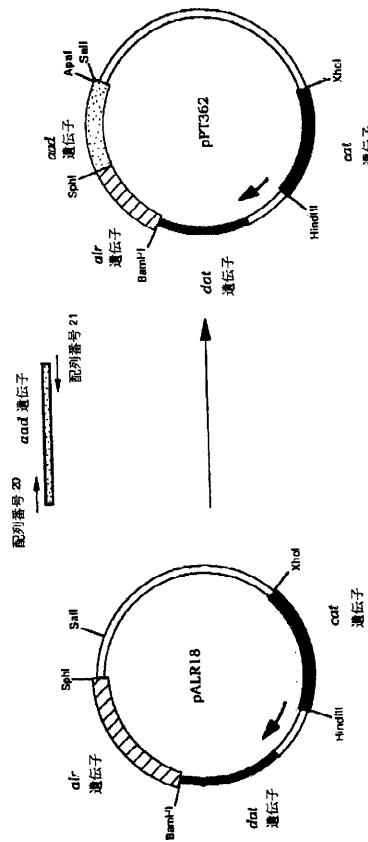


FIG. 12

【図 13】

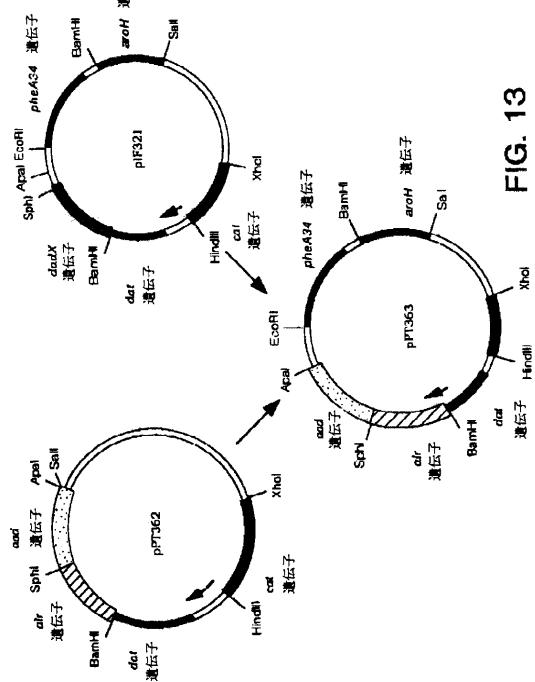


FIG. 13

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 P 21/02 (2006.01)	C 12 P 21/02 C
C 12 N 9/10 (2006.01)	C 12 N 9/10
C 12 R 1/07 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 R 1/37 (2006.01)	C 12 R 1:07
C 12 R 1/42 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 R 1/19 (2006.01)	C 12 R 1:37
	C 12 N 15/00 Z N A A
	C 12 R 1:42
	C 12 P 13/04
	C 12 R 1:19
	C 12 P 21/02 C
	C 12 R 1:19

(74)代理人

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人

弁理士 相馬 貴昌

(72)発明者 フオザリンガム, イアン・ジー

アメリカ合衆国、イリノイ・60061、バーノン・ヒルズ、サウスフィールド・ドライブ・10

(72)発明者 ティラー・ポール・ピー

アメリカ合衆国、イリノイ・60004、アーリントン・ハイツ、フラワー・サークル・2032

(72)発明者 トン, ジエニファー・エル

アメリカ合衆国、イリノイ・60067、パラタイン、イースト・プラット・ドライブ・927

審査官 植原 克典

(56)参考文献 國際公開第91/005870 (WO, A1)

特開昭62-205790 (JP, A)

特開平01-285193 (JP, A)

特開昭63-112978 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12P 13/04 - 13/14

C12N 1/15, 1/19, 1/21

CA/BIOSIS(STN)