



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114761554 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 15

(21) 申请号 202080070926.1

(22) 申请日 2020.10.09

(30) 优先权数据

2019131887 2019.10.10 RU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/038340 2020.10.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/070942 JA 2021.04.15

(71) 申请人 味之素株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 永田秀美 田上宇乃 野崎博之

肥沼景子 D·斯特雷尔特索瓦

A·赫鲁谢瓦 J·卡塔什基纳

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张涛

(51) Int.Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 13/02 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

权利要求书5页 说明书55页

序列表47页 附图4页

(54) 发明名称

具有N-酰化活性的修饰酶

(57) 摘要

本发明提供对优异的含N-酰基-氨基的化合物生产系的确立有用的酶等。更具体而言,本发明提供包含下述(A)、(B)或(C),具有N-酰化活性,并且相对于野生型酶,针对L-谷氨酸或L-天冬氨酸的N-酰化活性、或针对L-谷氨酸的基质特异性得到提高了的修饰酶等:(A)一种修饰氨基酸序列,其包含在具有N-酰化活性的野生型酶的氨基酸序列中包含1种以上的给定的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;(B)一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;(C)一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

1. 一种具有N-酰化活性的修饰酶,其包含下述(A)、(B)或(C),且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高:

(A) 一种修饰氨基酸序列,其包含:在序列编号1的氨基酸序列中含有选自N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576中的1种以上的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;

(B) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

(C) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

(i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

(ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性;

(iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性,以及针对L-谷氨酸的基质特异性。

2. 根据权利要求1所述的修饰酶,其中,

所述变异包含选自N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R和C576A中的1种以上的氨基酸残基的变异。

3. 根据权利要求1或2所述的修饰酶,其中,

所述N-酰化活性为针对氨基酸的N-酰化活性。

4. 根据权利要求3所述的修饰酶,其中,

所述针对氨基酸的N-酰化活性为针对L-谷氨酸或L-天冬氨酸的N-酰化活性。

5. 一种多聚核苷酸,其编码权利要求1~4中任一项所述的修饰酶。

6. 一种表达载体,其包含权利要求5所述的多聚核苷酸。

7. 一种宿主细胞,其包含编码权利要求1~4中任一项所述的修饰酶的多聚核苷酸的表达单元。

8. 根据权利要求7所述的宿主细胞,其中,

前期宿主细胞为进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰的微生物:

(1) 脂肪酸供给能力强化;

(2) 氨基酸供给能力强化;

(3) ATP供给能力强化;

(4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

9. 根据权利要求8所述的宿主细胞,其中,

所述脂肪酸供给能力强化的基因修饰为下述(a)和(b)中的任一种或下述(a)和(b)这两种:

(a) 酰基CoA合成酶缺损或弱化;

(b) 酰基-ACP硫酯酶增强。

10. 根据权利要求7~9中任一项所述的宿主细胞,其中,

所述宿主细胞为属于肠杆菌科的细菌。

11. 根据权利要求10所述的宿主细胞, 其中,
属于肠杆菌科的细菌为埃希氏菌属细菌或泛菌属细菌。

12. 根据权利要求11所述的宿主细胞, 其中,
埃希氏菌属细菌为大肠杆菌, 泛菌属细菌为菠萝泛菌。

13. 一种含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造方法, 其包含:

在具有N-酰化活性的修饰酶的存在下, 使含氨基化合物和含羧基化合物反应, 生成含N-酰基-氨基的化合物或其盐的步骤, 其中, 所述修饰酶包含下述(A)、(B)或(C), 具有N-酰化活性, 并且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶, 下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高,

(A) 一种修饰氨基酸序列, 其包含: 在序列编号1的氨基酸序列中含有选自N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576中的1种以上的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;

(B) 一种氨基酸序列, 其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

(C) 一种氨基酸序列, 其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异, 并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

(i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

(ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性;

(iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性, 以及针对L-谷氨酸的基质特异性。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中,
所述修饰酶为纯化酶。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中,
所述在修饰酶存在下进行的反应是使用产生所述修饰酶的转化微生物或其处理物而进行的反应。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中,
所述转化微生物为进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰的微生物:

(1) 脂肪酸供给能力强化;

(2) 氨基酸供给能力强化;

(3) ATP供给能力强化;

(4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

17. 根据权利要求15或16所述的方法, 其中,
含氨基化合物和含羧基化合物是通过在碳源的存在下培养所述转化微生物而在所述转化微生物内生成的。

18. 一种含氨基化合物和含羧基化合物通过酰胺键键合而得到的含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造方法, 其包含:

在碳源的存在下培养下述微生物的步骤,

所述微生物进行了选自下述(1)～(4)中的至少1种以上的基因修饰,并且包含编码下述酶的多聚核苷酸的表达单元,所述酶具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力,

- (1) 脂肪酸供给能力强化;
- (2) 氨基酸供给能力强化;
- (3) ATP供给能力强化;
- (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,

所述酶为GH3蛋白质或PaaK蛋白质。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中,

所述GH3蛋白质是选自(I)或(II)中的酶:

(I) 包含下述(A)、(B)或(C),具有N-酰化活性,并且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)～(iii)中的任一项特性得到了提高的具有N-酰化活性的修饰酶:

(A) 一种修饰氨基酸序列,其包含:在序列编号1的氨基酸序列中含有选自N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576中的1种以上的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;

(B) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

(C) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

(i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

(ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性;

(iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性,以及针对L-谷氨酸的基质特异性,

(II) 下述(D)、(E)或(F):

(D) 一种蛋白质,所述蛋白质包含序列编号1的氨基酸序列;

(E) 一种蛋白质,所述蛋白质包含在序列编号1的氨基酸序列中含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性;

(F) 一种蛋白质,所述蛋白质包含相对于序列编号1的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性。

21. 根据权利要求18～20中任一项所述的方法,其中,

脂肪酸供给能力强化的基因修饰为下述(a)和(b)中的任一种或下述(a)和(b)这两种:

(a) 酰基CoA合成酶缺损或弱化;

(b) 酰基-ACP硫酯酶增强。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,

酰基-ACP硫酯酶具有针对月桂酰基-ACP的硫酯酶活性。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中,

酰基-ACP硫酯酶选自下述(i)～(iii):

(i) 一种蛋白质,所述蛋白质包含:(i-1) 序列编号3的氨基酸序列或(i-2) 包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列;

(ii) 一种蛋白质,所述蛋白质具有酰基-ACP硫酯酶活性,并且包含:在(ii-1) 序列编号3的氨基酸序列或(ii-2) 包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列中,含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

(iii) 一种蛋白质,所述蛋白质具有酰基-ACP硫酯酶活性,并且包含:相对于(iii-1) 序列编号3的氨基酸序列或(iii-2) 包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

24. 根据权利要求18~23中任一项所述的方法,其中,
碳源为糖类。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中,
糖类为葡萄糖。

26. 根据权利要求18~25中任一项所述的方法,其中,
所述微生物为属于肠杆菌科的细菌。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,
属于肠杆菌科的细菌为埃希氏菌属细菌或泛菌属细菌。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中,
埃希氏菌属细菌为大肠杆菌,泛菌属细菌为菠萝泛菌。

29. 根据权利要求13~28中任一项所述的方法,其中,
含羧基化合物为脂肪酸。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中,
脂肪酸为碳原子数为8~18的脂肪酸。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中,
脂肪酸为碳原子数为12的脂肪酸。

32. 根据权利要求29~31中任一项所述的方法,其中,
脂肪酸为饱和脂肪酸。

33. 根据权利要求13~32中任一项所述的方法,其中,
含氨基化合物为氨基酸,所述酶具有针对所述氨基酸的N-酰化活性。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中,
氨基酸为L-谷氨酸或L-天冬氨酸。

35. 根据权利要求13~34中任一项所述的方法,其中,
含羧基化合物为月桂酸,含N-酰基-氨基的化合物为Na-月桂酰基-L-谷氨酸或Na-月桂酰基-L-天冬氨酸。

36. 一种微生物,其进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰,并且,包含编码下述酶的多聚核苷酸的表达单元,所述酶具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力,所述微生物通过在碳源的存在下进行培养而具有含N-酰基-氨基的化合物或其盐的生产能力,

(1) 脂肪酸供给能力强化;

(2) 氨基酸供给能力强化;

(3) ATP供给能力强化;

(4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

37. 一种表面活性剂,其包含:

以权利要求13~35中任一项所述的方法所制造的含N-酰基-氨基的化合物或其盐。

38. 根据权利要求37所述的表面活性剂,其中,

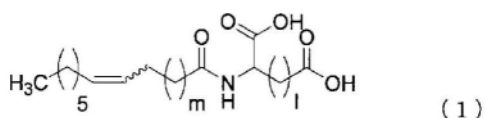
含N-酰基-氨基的化合物或其盐包含:具有碳原子数为10~16的单不饱和酰基的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐。

39. 一种表面活性剂,其包含:具有碳原子数为10~16的单不饱和酰基的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐。

40. 根据权利要求37~39中任一项所述的表面活性剂,其中,

含N-单不饱和酰基-氨基的化合物为下述通式(1)表示的化合物,

[化学式1]



所述通式(1)中,1为1或2的整数,m为0~6的整数。

41. 根据权利要求37~40中任一项所述的表面活性剂,其中,

所述含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的立体化学为顺式。

42. 根据权利要求37~41中任一项所述的表面活性剂,其中,

所述含N-酰基-氨基的化合物或其盐为N-单不饱和酰基谷氨酸或其盐。

43. 一种组合物,其包含:

成分(A):N-单不饱和酰基酸性氨基酸或其盐,其中,不饱和酰基为碳原子数为10~16个的酰基;以及

成分(B):N-饱和酰基酸性氨基酸或其盐。

具有N-酰化活性的修饰酶

技术领域

[0001] 本发明涉及具有N-酰化活性的修饰酶等。

背景技术

[0002] 含N-酰基-氨基的化合物(例如,Na-酰基氨基酸)作为化妆品原材料(例如,表面活性剂)等而使用。含N-酰基-氨基的化合物的化学合成(例如,Schotten-Baumann反应)存在合成反应的副产物所引起的环境负担的问题。因此,需要含N-酰基-氨基的化合物的酶合成。关于含N-酰基-氨基的化合物的酶合成的现有技术有数个已被报道。

[0003] 在专利文献1中,报道了利用Bacillus subtilis的表面活性素生物合成酶而从糖开始的Na-酰基氨基酸发酵。但是,Na-酰基谷氨酸的生成量为116.8mg/L,极为微量,因此该发酵不适于工业规模的制造。

[0004] 在专利文献2中,报告了关于利用人类来源的氨基酸N-酰基转移酶、E.coli来源的酰基CoA合成酶,从氨基酸和脂肪酸出发合成Na-酰基甘氨酸的方法。但是,该方法无法直接在脂肪酸上键合氨基酸,需要2阶段的酶反应,因此与利用单一酶的反应相比,存在控制较为复杂的问题。

[0005] 在非专利文献1中,报道了使用猪肾来源的氨基酰化酶(Aminoacylase),在包含甘油的溶液中,从氨基酸和脂肪酸出发合成Na-酰基氨基酸的方法。本方法利用了包含甘油的溶液中,基于氨基酰化酶的Na-酰基氨基酸的水解反应难以进行这一点。但是,鉴于需要大量使用甘油这一点和在不含甘油的水性溶剂中的Na-酰基氨基酸合成的收率低这一点,该方法在工业制造中的效率较低。

[0006] 在非专利文献2中,报道了使用Streptomyces mobaraensis来源的氨基酰化酶,在含有甘油的溶液中,从氨基酸和脂肪酸出发合成Na-酰基氨基酸方法。但是,未报告在不含甘油的水性溶剂中的Na-酰基氨基酸合成,因此未显示该方法在工业制造中的效率性。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2008/131002号

[0010] 专利文献2:国际公开第2015/028423号

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Wada et al.,Journal of the American Oil Chemists' Society,2002,79(1),pp 41-46

[0013] 非专利文献2:Koreishi et al.,Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(1),pp 72-78

发明内容

[0014] 本发明所解决的技术问题

[0015] 本发明的目的在于:提供一种对于确立优异的含N-酰基-氨基的化合物生产系有

用的酶、和含N-酰基-氨基的化合物的制造方法等。

[0016] 解决问题的技术手段

[0017] 本发明者们进行锐意研究的结果,通过使拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 来源的吲哚-3-乙酸-酰胺合成酶(indole-3-acetic acid-amido synthetase) GH3.6 (AtGH3-6) 的氨基酸残基变异,成功地制备了含N-酰基-氨基的化合物的生产能力优异的修饰酶,并成功做出了对含N-酰基-氨基的化合物的生产有用的其它发明,从而完成了本申请发明。

[0018] 即,本发明如下。

[0019] [1]

[0020] 一种具有N-酰化活性的修饰酶,其包含下述(A)、(B)或(C),且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高:

[0021] (A) 一种修饰氨基酸序列,其包含:在序列编号1的氨基酸序列中含有选自N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576中的1种以上的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;

[0022] (B) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0023] (C) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

[0024] (i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

[0025] (ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性;

[0026] (iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性,以及针对L-谷氨酸的基质特异性。

[0027] [2]

[0028] 根据项[1]所述的修饰酶,其中,

[0029] 所述变异包含选自N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R和C576A中的1种以上的氨基酸残基的变异。

[0030] [3]

[0031] 根据项[1]或[2]所述的修饰酶,其中,

[0032] 所述N-酰化活性为针对氨基酸的N-酰化活性。

[0033] [4]

[0034] 根据项[3]所述的修饰酶,其中,

[0035] 所述针对氨基酸的N-酰化活性为针对L-谷氨酸或L-天冬氨酸的N-酰化活性。

[0036] [5]

[0037] 一种多聚核苷酸,其编码项[1]~[4]中任一项所述的修饰酶。

[0038] [6]

[0039] 一种表达载体,其包含项[5]所述的多聚核苷酸。

[0040] [7]

[0041] 一种宿主细胞,其包含编码项[1]~[4]中任一项所述的修饰酶的多聚核苷酸的表达单元。

[0042] [8]

[0043] 根据项[7]所述的宿主细胞,其中,

[0044] 前期宿主细胞为进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰的微生物:

[0045] (1) 脂肪酸供给能力强化;

[0046] (2) 氨基酸供给能力强化;

[0047] (3) ATP供给能力强化;

[0048] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

[0049] [9]

[0050] 根据项[8]所述的宿主细胞,其中,

[0051] 所述脂肪酸供给能力强化的基因修饰为下述(a)和(b)中的任一种或下述(a)和(b)这两种:

[0052] (a) 酰基CoA合成酶缺损或弱化;

[0053] (b) 酰基-ACP硫酯酶增强。

[0054] [10]

[0055] 根据项[7]~[9]中任一项所述的宿主细胞,其中,

[0056] 所述宿主细胞为属于肠杆菌科的细菌。

[0057] [11]

[0058] 根据项[10]所述的宿主细胞,其中,

[0059] 属于肠杆菌科的细菌为埃希氏菌属细菌或泛菌属细菌。

[0060] [12]

[0061] 根据项[11]所述的宿主细胞,其中,

[0062] 埃希氏菌属细菌为大肠杆菌,泛菌属细菌为菠萝泛菌。

[0063] [13]

[0064] 一种含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造方法,其包含:

[0065] 在具有N-酰化活性的修饰酶的存在下,使含氨基化合物和含羧基化合物反应,生成含N-酰基-氨基的化合物或其盐的步骤,其中,所述修饰酶包含下述(A)、(B)或(C),具有N-酰化活性,并且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高,

[0066] (A) 一种修饰氨基酸序列,其包含:在序列编号1的氨基酸序列中含有选自N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576中的1种以上的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;

[0067] (B) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0068] (C) 一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

- [0069] (i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性；
- [0070] (ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性；
- [0071] (iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性，以及针对L-谷氨酸的基质特异性。
- [0072] [14]
- [0073] 根据项[13]所述的方法，其中，
- [0074] 所述修饰酶为纯化酶。
- [0075] [15]
- [0076] 根据项[13]所述的方法，其中，
- [0077] 所述在修饰酶存在下进行的反应是使用产生所述修饰酶的转化微生物或其处理物而进行的反应。
- [0078] [16]
- [0079] 根据项[15]所述的方法，其中，
- [0080] 所述转化微生物为进行了选自下述(1)～(4)中的至少1种以上的基因修饰的微生物：
- [0081] (1) 脂肪酸供给能力强化；
- [0082] (2) 氨基酸供给能力强化；
- [0083] (3) ATP供给能力强化；
- [0084] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。
- [0085] [17]
- [0086] 根据项[15]或[16]所述的方法，其中，
- [0087] 含氨基化合物和含羧基化合物是通过在碳源的存在下培养所述转化微生物而在所述转化微生物内生成的。
- [0088] [18]
- [0089] 一种含氨基化合物和含羧基化合物通过酰胺键键合而得到的含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造方法，其包含：
- [0090] 在碳源的存在下培养下述微生物的步骤，
- [0091] 所述微生物进行了选自下述(1)～(4)中的至少1种以上的基因修饰，并且包含编码下述酶的多聚核苷酸的表达单元，所述酶具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力，
- [0092] (1) 脂肪酸供给能力强化；
- [0093] (2) 氨基酸供给能力强化；
- [0094] (3) ATP供给能力强化；
- [0095] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。
- [0096] [19]
- [0097] 根据项[18]所述的方法，其中，
- [0098] 所述酶为GH3蛋白质或PaaK蛋白质。
- [0099] [20]
- [0100] 根据项[19]所述的方法，其中，

[0101] 所述GH3蛋白质是选自(I)或(II)中的酶:

[0102] (I)包含下述(A)、(B)或(C),具有N-酰化活性,并且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高的具有N-酰化活性的修饰酶:

[0103] (A)一种修饰氨基酸序列,其包含:在序列编号1的氨基酸序列中含有选自N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576中的1种以上的氨基酸残基的变异的氨基酸序列;

[0104] (B)一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0105] (C)一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

[0106] (i)针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

[0107] (ii)针对L-谷氨酸的基质特异性;

[0108] (iii)针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性,以及针对L-谷氨酸的基质特异性,

[0109] (II)下述(D)、(E)或(F):

[0110] (D)一种蛋白质,所述蛋白质包含序列编号1的氨基酸序列;

[0111] (E)一种蛋白质,所述蛋白质包含在序列编号1的氨基酸序列中含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性;

[0112] (F)一种蛋白质,所述蛋白质包含相对于序列编号1的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性。

[0113] [21]

[0114] 根据项[18]~[20]中任一项所述的方法,其中,

[0115] 脂肪酸供给能力强化的基因修饰为下述(a)和(b)中的任一种或下述(a)和(b)这两种:

[0116] (a)酰基CoA合成酶缺损或弱化;

[0117] (b)酰基-ACP硫酯酶增强。

[0118] [22]

[0119] 根据项[21]所述的方法,其中,

[0120] 酰基-ACP硫酯酶具有针对月桂酰基-ACP的硫酯酶活性。

[0121] [23]

[0122] 根据项[21]所述的方法,其中,

[0123] 酰基-ACP硫酯酶选自下述(i)~(iii):

[0124] (i)一种蛋白质,所述蛋白质包含:(i-1)序列编号3的氨基酸序列或(i-2)包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列;

[0125] (ii)一种蛋白质,所述蛋白质具有酰基-ACP硫酯酶活性,并且包含:在(ii-1)序列编号3的氨基酸序列或(ii-2)包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列中,含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0126] (iii)一种蛋白质,所述蛋白质具有酰基-ACP硫酯酶活性,并且包含:相对于(iii-

1) 序列编号3的氨基酸序列或(iii-2)包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0127] [24]

[0128] 根据项[18]～[23]中任一项所述的方法,其中,

[0129] 碳源为糖类。

[0130] [25]

[0131] 根据项[24]所述的方法,其中,

[0132] 糖类为葡萄糖。

[0133] [26]

[0134] 根据项[18]～[25]中任一项所述的方法,其中,

[0135] 所述微生物为属于肠杆菌科的细菌。

[0136] [27]

[0137] 根据项[26]所述的方法,其中,

[0138] 属于肠杆菌科的细菌为埃希氏菌属细菌或泛菌属细菌。

[0139] [28]

[0140] 根据项[27]所述的方法,其中,

[0141] 埃希氏菌属细菌为大肠杆菌,泛菌属细菌为菠萝泛菌。

[0142] [29]

[0143] 根据项[13]～[28]中任一项所述的方法,其中,

[0144] 含羧基化合物为脂肪酸。

[0145] [30]

[0146] 根据项[29]所述的方法,其中,

[0147] 脂肪酸为碳原子数为8～18的脂肪酸。

[0148] [31]

[0149] 根据项[29]所述的方法,其中,

[0150] 脂肪酸为碳原子数为12的脂肪酸。

[0151] [32]

[0152] 根据项[29]～[31]中任一项所述的方法,其中,

[0153] 脂肪酸为饱和脂肪酸。

[0154] [33]

[0155] 根据项[13]～[32]中任一项所述的方法,其中,

[0156] 含氨基化合物为氨基酸,所述酶具有针对所述氨基酸的N-酰化活性。

[0157] [34]

[0158] 根据项[33]所述的方法,其中,

[0159] 氨基酸为L-谷氨酸或L-天冬氨酸。

[0160] [35]

[0161] 根据项[13]～[34]中任一项所述的方法,其中,

[0162] 含羧基化合物为月桂酸,含N-酰基-氨基的化合物为Na-月桂酰基-L-谷氨酸或Na-月桂酰基-L-天冬氨酸。

[0163] [36]

[0164] 一种微生物,其进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰,并且,包含编码下述酶的多聚核苷酸的表达单元,所述酶具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力,所述微生物通过在碳源的存在下进行培养而具有含N-酰基-氨基的化合物或其盐的生产能力,

[0165] (1) 脂肪酸供给能力强化;

[0166] (2) 氨基酸供给能力强化;

[0167] (3) ATP供给能力强化;

[0168] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

[0169] [37]

[0170] 一种表面活性剂,其包含:

[0171] 以项[13]~[35]中任一项所述的方法所制造的含N-酰基-氨基的化合物或其盐。

[0172] [38]

[0173] 根据项[37]所述的表面活性剂,其中,

[0174] 含N-酰基-氨基的化合物或其盐包含:具有碳原子数为10~16的单不饱和酰基的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐。

[0175] [39]

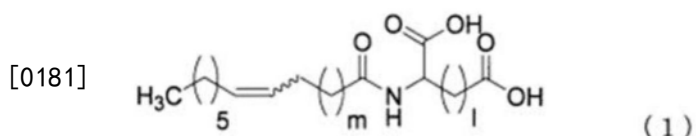
[0176] 一种表面活性剂,其包含:具有碳原子数为10~16的单不饱和酰基的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐。

[0177] [40]

[0178] 根据项[37]~[39]中任一项所述的表面活性剂,其中,

[0179] 含N-单不饱和酰基-氨基的化合物为下述通式(1)表示的化合物,

[0180] [化学式1]



[0182] 所述通式(1)中,1为1或2的整数,m为0~6的整数。

[0183] [41]

[0184] 根据项[37]~[40]中任一项所述的表面活性剂,其中,

[0185] 所述含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的立体化学为顺式。

[0186] [42]

[0187] 根据项[37]~[41]中任一项所述的表面活性剂,其中,

[0188] 所述含N-酰基-氨基的化合物或其盐为N-单不饱和酰基谷氨酸或其盐。

[0189] [43]

[0190] 一种组合物,其包含:

[0191] 成分(A):N-单不饱和酰基酸性氨基酸或其盐,其中,不饱和酰基为碳原子数为10~16个的酰基;以及

[0192] 成分(B):N-饱和酰基酸性氨基酸或其盐。

[0193] 发明的效果

[0194] 根据本发明的方法,能够高效地进行含氨基化合物和含羧基化合物的基于酰胺键的含N-酰基-氨基的化合物的生成反应。

附图说明

[0195] [图1]图1是表示质粒pMW118-Sce-Km的结构图。

[0196] [图2]图2是表示质粒pMW118-Ptac-UcTEopt的结构图。

[0197] [图3]图3是表示质粒pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt的结构图。

[0198] [图4]图4是表示(1)拟南芥来源的吡啶-3-乙酸-酰胺合成酶GH3.6 (AtGH3-6)的氨基酸序列(序列编号1)、和(2)加州月桂(California bay (Umbellularia californica))来源的中链酰基-ACP硫酯酶(medium-chain acyl-ACP thioesterase) (UcTE)的氨基酸序列(序列编号3)的图。

[0199] 本发明的具体实施方式

[0200] (修饰酶)

[0201] 本发明提供一种具有N-酰化活性的修饰酶。

[0202] 本发明的修饰酶是基于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的吡啶-3-乙酸-酰胺合成酶GH3.6 (Q9LSQ4,在下文中,称为“*AtGH3-6*”)而进行了修饰的酶。*AtGH3-6*被发现是使吡啶-3-乙酸的羧基和特定的氨基酸的氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的酶(Plant Cell 17:616-627 (2005)),本发明者们还发现其具有包含形成脂肪酸和氨基酸的酰胺键的能力在内的N-酰化活性。本发明的修饰酶是对*AtGH3-6*进行修饰,提高了含N-酰基-氨基的化合物的生产能力相关的特性的、具有N-酰化活性的酶。

[0203] 本发明的修饰酶是下述修饰酶:

[0204] 包含下述(A)、(B)或(C),且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高的具有N-酰化活性的修饰酶,

[0205] (A)一种修饰氨基酸序列,其包含:在序列编号1(野生型*AtGH3-6*)的氨基酸序列中含有选自给定的氨基酸残基的变异中的1种以上的变异的氨基酸序列;

[0206] (B)一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个或数个追加的氨基酸残基的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0207] (C)一种氨基酸序列,其是在所述修饰氨基酸序列中包含1个以上的氨基酸残基的追加变异,并且相对于所述修饰氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0208] (i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

[0209] (ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性;

[0210] (iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性,以及针对L-谷氨酸的基质特异性。

[0211] 作为其他的表现方式,本发明的修饰酶为下述修饰酶:

[0212] 在下述(A')、(B')、(C')中的任一种氨基酸序列中包含与选自给定的氨基酸残基的变异中的1种以上的氨基酸残基的变异相当的氨基酸残基的变异,且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高的具有N-酰化活性的修饰酶:

[0213] (A') 序列编号1所示的氨基酸序列;

[0214] (B') 序列编号1所示的氨基酸序列中包含1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0215] (C') 相对于序列编号1所示的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,

[0216] (i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性;

[0217] (ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性;

[0218] (iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性, 以及针对L-谷氨酸的基质特异性。

[0219] 在氨基酸序列(B)和(B')中, 可以通过选自氨基酸残基的缺失、置换、添加和插入中的1、2、3或4种变异, 对1个或数个氨基酸残基进行修饰。氨基酸残基的变异可以导入氨基酸序列中的1个区域中, 也可以是导入多个不同的区域。用语“1个或数个”表示不会显著损害修饰酶的活性(例如, N-酰化活性)的个数。用语“1个或数个”所表示的数例如为1~60个或1~50个, 优选为1~40个, 更优选为1~30个, 进一步优选为1~20个, 特别优选为1~10个或1~5个(例如, 1个、2个、3个、4个或5个)。

[0220] 氨基酸序列(C)和(C')中的同一性%为90%以上。同一性可以优选为91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上。多肽(蛋白质)的同一性%的计算, 可以通过blastp算法进行。更具体而言, 多肽的同一性%的计算可以使用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中提供的blastp算法中的、默认设定的Scoring Parameters (Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11 Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment)进行。多聚核苷酸(基因)的同一性%的计算可以通过blastn算法进行。更具体而言, 多聚核苷酸的同一性%的计算可以使用NCBI中提供的blastn算法中的、默认设定的Scoring Parameters (Match/Mismatch Scores=1, -2; Gap Costs=Linear)进行。

[0221] “N-酰化活性”(也称为“N-氨基酰化酶活性”)是指, 使作为基质的含氨基化合物和含羧基化合物通过酰胺键键合而生成含N-酰基-氨基的化合物的活性。N-酰化活性例如可以是氨基酸(例如, 后述的 α -L-氨基酸)和脂肪酸(例如, 后述的饱和脂肪酸)出发生成N-酰基氨基酸的活性, 可以优选地以从L-谷氨酸或L-天冬氨酸和月桂酸出发生成Na-月桂酰基-L-谷氨酸或Na-月桂酰基-L-天冬氨酸的活性为指标。“具有N-酰化活性”可以是指, 在特定的测定条件下测定活性时, 以包含序列编号1的氨基酸序列的酶的活性为基准, 例如具有60%以上, 优选为70%以上, 更优选为80%以上, 进一步优选为85%以上, 特别优选为90%以上、94%以上、96%以上、98%以上或同等(即, 100%)以上的活性。作为这样的特定的测定条件, 可以采用以下的条件。将测定对象的酶以纯化酶的形式进行调制, 将50mM Tris-HCl、5mM氨基酸(例如, L-谷氨酸或L-天冬氨酸)、5mM脂肪酸钠(例如, 月桂酸钠)、10mM ATP、10mM $MgCl_2$ 、1mM DTT、50 μ g/mL纯化酶、pH8.0、0.2mL的反应液在25℃下孵育24小时, 反应结束后, 添加0.8mL的反应停止液(1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇), 将离心后的上清用于UPLC-MS分析, 通过测定与N-酰基氨基酸(例如, Na-月桂酰基-L-谷氨酸或Na-月桂酰基-L-天冬氨酸)一致的分子量的信号来对N-酰化活性进行评价。

[0222] 就氨基酸序列(B)、(B')、(C)和(C')而言, 只要修饰酶可以保持目标特性, 变异就可以导入催化剂域中的部位, 且可以导入催化剂域以外的部位。修饰酶可以保持目标特性

的、可以导入变异的氨基酸残基的位置对本领域技术人员而言是显而易见的。具体而言,本领域技术人员,1) 将具有同种特性的多种蛋白质的氨基酸序列进行比较,2) 明确相对保守区域和相对不保守的区域,接下来,3) 由于能够在相对保守区域和相对不保守的区域中,分别预测可能对功能起到重要作用的区域和不可能对功能起到重要作用的区域,因此能够理解到结构·功能的相关性。因此,本领域技术人员可以在本发明中使用的蛋白质的氨基酸序列中确定出可以导入变异的氨基酸残基的位置。

[0223] 在氨基酸残基因为置换而变异的情况下,氨基酸残基的置换可以是保守性置换。本说明书中使用的用语“保守性置换”是指,以具有类似侧链的氨基酸残基置换给定的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族在该领域中是周知的。例如,作为这样的家族,可以举出具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有非电荷极性侧链的氨基酸(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、具有 β 位支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸,苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)、具有含羟基(例如,醇性、酚性)侧链的氨基酸(例如,丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)、和具有含硫侧链的氨基酸(例如,半胱氨酸,蛋氨酸)。优选为,氨基酸的保守性置换可以是天冬氨酸和谷氨酸之间的置换、精氨酸和赖氨酸和组氨酸之间的置换、色氨酸和苯丙氨酸之间的置换、苯丙氨酸和缬氨酸之间的置换、亮氨酸和异亮氨酸和丙氨酸之间的置换、和甘氨酸和丙氨酸之间的置换。

[0224] 本发明的修饰酶也可以是介由肽键而与异源部分连接的融合蛋白。作为这样的异源部分,例如,可以举出使目标蛋白质的纯化更为容易的肽成分(例如,组氨酸标签、Strep-tag II等标签部分;谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白和它们的变异型等在目标蛋白质的纯化中利用的蛋白质)、使目标蛋白质的可溶性提高的肽成分(例如,Nus-tag)、作为分子伴侣发挥功能的肽成分(例如,触发因子)、被用于切断所述纯化标签的蛋白酶识别的肽成分(例如,凝血酶识别序列、TEV蛋白酶识别序列)、具有其他功能的肽成分(例如,全长蛋白质或其一部分)以及接头。

[0225] 序列编号1所示的氨基酸序列或(A')、(B')、(C')中的任一种氨基酸序列中的“给定的氨基酸残基的变异”是,使修饰酶的和含N-酰基-氨基的化合物的生产能力相关的特性提高的变异。作为“给定的氨基酸残基的变异”,可以举出N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576的氨基酸残基的变异。更具体而言,作为“给定的氨基酸残基的变异”,可以举出N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R和C576A的氨基酸残基的置换。本发明的修饰酶所包含的“给定的氨基酸残基的变异”的数量为1个以上,例如可以为1~26个,优选为1~20个,更优选为1~15个,进一步优选为1~10个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)。

[0226] 作为通过“给定的氨基酸残基的变异”而提高的与含N-酰基-氨基的化合物的生产能力相关的特性,可以举出针对特定的氨基酸基质的N-酰化活性和针对特定的氨基酸基质

的基质特异性。提高的程度通过与包含序列编号1的氨基酸序列的酶的比较而表示,也可以以介由肽键与异源部分连接的融合蛋白彼此之间的比较的形式而测定。

[0227] 作为针对特定的氨基酸基质的N-酰化活性,可以举出针对L-谷氨酸的N-酰化活性和针对L-天冬氨酸的N-酰化活性。作为N-酰化活性的测定中使用的基质的含羧基化合物,例如可以是脂肪酸,优选为饱和脂肪酸,更优选为月桂酸。N-酰化活性的测定例如可以在上述的测定条件下进行。就针对特定的氨基酸基质的N-酰化活性的提高程度而言,只要超过包含序列编号1的氨基酸序列的酶的N-酰化活性就无特别限制,例如为1.1倍以上,优选为1.2倍以上,更优选为1.3倍以上,进一步优选为1.5倍以上,最优选为2倍以上。

[0228] 作为使针对L-谷氨酸或L-天冬氨酸的N-酰化活性提高的变异,可以举出N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576的氨基酸残基的变异。更具体而言,作为使针对L-谷氨酸或L-天冬氨酸的N-酰化活性提高的变异,可以举出N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R和C576A的氨基酸残基的置换。

[0229] 作为针对特定的氨基酸基质的基质特异性,可以举出针对L-谷氨酸的基质特异性。针对L-谷氨酸的基质特异性可以在使用相同的含羧基化合物基质的情况下的针对L-谷氨酸和其他氨基酸(例如,L-天冬氨酸)的N-酰化活性的活性比的形式表示。相同的含羧基化合物基质例如可以是脂肪酸,优选为饱和脂肪酸,更优选为月桂酸。N-酰化活性的测定例如可以在上述的测定条件下进行。就针对特定的氨基酸基质的基质特异性的提高程度而言,只要超过包含序列编号1的氨基酸序列的酶的基质特异性就无特别限制,例如为1.1倍以上,优选为1.2倍以上,更优选为1.3倍以上,进一步优选为1.5倍以上,最优选为2倍以上。

[0230] 作为使针对L-谷氨酸的基质特异性提高的变异,可以举出N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533和C576的氨基酸残基的变异。更具体而言,作为使针对L-谷氨酸的基质特异性提高的变异,可以举出N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R和C576A的氨基酸残基的置换。

[0231] (多聚核苷酸)

[0232] 本发明还提供编码本发明的修饰酶的多聚核苷酸。本发明的多聚核苷酸可以是DNA也可以是RNA,但优选为DNA。

[0233] 可以优选编码本发明中使用的所述酶的多聚核苷酸为编码以下酶的多聚核苷酸:

[0234] 在选自以下(a)~(d)中的多聚核苷酸中包含与和选自所述给定的氨基酸残基的变异中的1种以上的氨基酸残基的变异相当的氨基酸残基的变异相当的碱基序列的变异,且相对于包含序列编号1的氨基酸序列的酶,下述(i)~(iii)中的任一项特性得到了提高的具有N-酰化活性的修饰酶,

[0235] (a) 包含序列编号2(野生型AtGH3-6)所示的碱基序列的多聚核苷酸;

[0236] (b) 和包含与序列编号2所示的碱基序列互补的碱基序列的多聚核苷酸在严格条

件下杂交的多聚核苷酸；

[0237] (c) 包含与序列编号2所示的碱基序列具有90%以上的同一性的碱基序列的多聚核苷酸；

[0238] (d) 选自(a)～(c)中的多聚核苷酸的简并变异体，

[0239] (i) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性；

[0240] (ii) 针对L-谷氨酸的基质特异性；

[0241] (iii) 针对L-谷氨酸和/或L-天冬氨酸的N-酰化活性，以及针对L-谷氨酸的基质特异性。序列编号2的碱基序列编码序列编号1的氨基酸序列。

[0242] 在所述多聚核苷酸(b)中，用语“严格条件”是指，形成所谓的特异性杂交体，而不形成非特异性杂交体的条件。例如，作为严格条件，可以举出在6×SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中，在约45℃下进行杂交，接下来在0.2×SSC、0.1%SDS中，在50～65℃下进行1或2次以上的清洗。

[0243] 就所述多聚核苷酸(c)而言，相对于序列编号2的碱基序列的碱基序列同一性%可以为90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上。

[0244] 所述多聚核苷酸(d)中，用语“简并变异体”是指，编码变异前的多聚核苷酸中的给定氨基酸残基的至少1个密码子变为编码同一氨基酸残基的其他密码子的多聚核苷酸变异体。由于这样的简并变异体是基于沉默变异的变异体，因此简并变异体编码的蛋白质(酶)与变异前的多聚核苷酸编码的蛋白质(酶)相同。

[0245] 优选简并变异体为以适合预定进行导入的宿主细胞的密码子使用频率的方式而改变了密码子的多聚核苷酸变异体。在使某基因在异源宿主细胞(例如，微生物)中表达时，有时会由于密码子使用频率的不同，对应的tRNA分子种类未被充分供给，而发生翻译效率降低和/或不正确的翻译(例如，翻译的停止)的情况。例如，在大肠杆菌中，已知有表1所示的低频率密码子。

[0246] [表1]

[0247] 表1. 大肠杆菌中的低频率密码子

氨基酸残基	密码子	低频率密码子
Arg	AGG/AGA/CGG/CGA/CGU/CGC	AGG/AGA/CGG/CGA
Gly	GGG/GGA/GGU/GGC	GGA
Ile	AUA/AUU/AUC	AUA
Leu	UUG/UUA/CUG/CUA/CUU/CUC	CUA
Pro	CCG/CCA/CCU/CCC	CCC

[0249] 因此，在本发明中，可以利用适合如后所述的宿主细胞的密码子使用频率的简并变异体。例如，简并变异体可以是编码选自精氨酸残基、甘氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基和脯氨酸残基中的1种以上的氨基酸残基的密码子被改变了的变异体。更具体而言，简并变异体可以是选自低频率密码子(例如，AGG、AGA、CGG、CGA、GGA、AUA、CUA和CCC)中的1种以上的密码子被改变了的变异体。优选简并变异体可以包含选自以下i)～v)中的1种以上(例如，1种、2种、3种、4种或5种)的密码子的变更：

[0250] i) 将选自编码Arg的4种密码子(AGG、AGA、CGG和CGA)中的至少1种密码子变更为编

码Arg的其他密码子(CGU或CGC)；

[0251] ii) 将编码Gly的1种密码子(GGA)变更为其其他密码子(GGG、GGU或GGC)；

[0252] iii) 将编码Ile的1种密码子(AUA)变更为其其他密码子(AUU或AUC)；

[0253] iv) 将编码Leu的1种密码子(CUA)变更为其其他密码子(UUG、UUA、CUG、CUU或CUC)；

[0254] v) 将编码Pro的1种密码子(CCC)变更为其其他密码子(CCG、CCA或CCU)。

[0255] 在简并变异体为RNA的情况下,如上所述应使用核苷酸残基“U”,而在简并变异体为DNA的情况下,应使用核苷酸残基“T”代替“U”。就用于使其适合宿主细胞的密码子使用频率的核苷酸残基的变异数而言,只要变异前后编码相同的蛋白质就无特别限定,例如,为1~400个、1~300个、1~200个或1~100个。

[0256] 低频率密码子的鉴定可以通过利用该领域中已知的技术,基于任意的宿主细胞的种类和基因组序列信息而容易地进行。因此,简并变异体也可以包含低频率密码子到非低频率密码子(例如,高频率密码子)的变更。此外,不仅是低频率密码子,还已知有考虑与生产菌株的基因组GC含量的适合性等要素而设计变异体的方法(Alan Villalobos et al., Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments, BMC Bioinformatics. 2006 Jun 6; 7:285.),因此也可以使用这样的方法。这样,上述的变异体可以根据有可能进行导入的任意宿主细胞(例如,如后所述的微生物)的种类而适宜制备。

[0257] (表达载体)

[0258] 本发明提供表达载体。本发明的表达载体包含本发明的多聚核苷酸或编码本发明的修饰酶的多聚核苷酸。

[0259] 本发明中,用语“表达单元”是指,包含应以蛋白质的形式而表达的给定的多聚核苷酸和为使其能够启动而连接的启动子的、能够进行该多聚核苷酸的转录,进而进行该多聚核苷酸编码的蛋白质的产生的最小单元。表达单元可以进一步包含终止子、核糖体结合部位和药剂抗性基因等要素。表达单元可以是DNA也可以是RNA,优选为DNA。此外,表达单元相对于宿主细胞可以为同源(homologous)(即,固有(inherent)),也可以为异源(heterologous)(即,非固有)。此外,表达单元可以是包含应以蛋白质的形式而表达的1个多聚核苷酸和使其能够启动而连接的启动子的表达单元(即,能够进行单顺反子mRNA的表的表达单元),或包含应以蛋白质的形式而表达的多个多聚核苷酸(例如2以上,优选为3以上,更优选为4以上,进一步优选为5以上,特别优选为10以上的多聚核苷酸)和使其能够启动而连接的启动子的表达单元(即,能够进行多顺反子mRNA的表的表达单元)。表达单元在微生物(宿主细胞)中可以包含在基因组区域(例如,作为编码所述蛋白质的多聚核苷酸固有存在的天然基因位点的天然基因组区域或并非该天然基因位点的非天然基因组区域)或非基因组区域(例如,细胞质内)中。表达单元可以在1个或2个以上(例如,1、2、3、4或5)不同的位置处包含在基因组区域中。作为非基因组区域中包含的表达单元的具体的形态,例如,可以举出质粒、病毒载体、噬菌体和人工染色体。

[0260] 就构成表达单元的启动子而言,只要是能使连接在其下游的多聚核苷酸所编码的蛋白质(酶)在宿主细胞中表达的启动子就无特别限定。例如,启动子相对于宿主细胞可以是同源也可以是异源。例如,可以使用在重组蛋白质的产生中通用的构成或诱导启动子。作为这样的启动子,例如,可以举出PhoA启动子、PhoC启动子、T7启动子、T5启动子、T3启动子、

lac启动子、trp启动子、trc启动子、tac启动子、PR启动子、PL启动子、SP6启动子、阿拉伯糖诱导启动子、冷休克启动子、四环素诱导性启动子。可以优选使用在宿主细胞中具有强力的转录活性的启动子。作为在宿主细胞中具有强力的转录活性的启动子,例如,可以举出在宿主细胞中高表达的基因的启动子和病毒来源的启动子。

[0261] 就表达载体而言,作为表达单元,在所述最小单元的基础上,可以进一步包含在宿主细胞中发挥功能的终止子、核糖体结合部位和药剂抗性基因等要素。作为药剂抗性基因,例如,可以举出针对四环素、氨苄青霉素、卡那霉素、潮霉素、膦丝菌素、氯霉素等药剂的抗性基因。

[0262] 此外,表达载体为了与宿主细胞的基因组DNA同源重组,可以进一步包含能够与宿主细胞的基因组同源重组的区域。例如,表达载体可以被设计为其包含的表达单元位于一对同源区域(例如,与宿主细胞的基因组中的特定序列相同的同源臂,loxP,FRT)之间。作为应导入表达单元的宿主细胞的基因组区域(相同区域的标的),无特别限定,可以是宿主细胞中表达量多的基因的位点。

[0263] 表达载体可以是质粒、病毒载体、噬菌体或人工染色体。此外,表达载体可以是整合型(integrative)载体也可以是非整合型载体。整合型载体可以是其整体都被导入宿主细胞的基因组的类型的载体。或,整合型载体可以是其只有一部分(例如,表达单元)被导入宿主细胞的基因组的类型的载体。并且,表达载体也可以是DNA载体或RNA载体(例如,逆转录病毒)。此外,表达载体也可以是通用的表达载体。作为这样的表达载体,例如,可以举出pUC(例如,pUC19、pUC18)、pSTV、pBR(例如,pBR322)、pHSG(例如,pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398)、RSF(例如,RSF1010)、pACYC(例如,pACYC177、pACYC184)、pMW(例如,pMW119、pMW118、pMW219、pMW218)、pQE(例如,pQE30)、pET(例如,pET28a)和其衍生物。

[0264] (宿主细胞)

[0265] 本发明提供宿主细胞。本发明的宿主细胞包含编码本发明的修饰酶的多聚核苷酸的表达单元。本发明的宿主细胞优选包含:包含编码本发明的修饰酶的多聚核苷酸和使其能够启动而连接的启动子的表达单元。本发明的宿主细胞优选为微生物。

[0266] 本发明的宿主细胞优选为转化微生物。作为本发明的宿主细胞,例如,可以举出属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的细菌等细菌和真菌。此外,细菌可以是革兰氏阳性菌,也可以是革兰氏阴性菌。作为革兰氏阳性细菌,例如,可以举出芽孢杆菌(Bacillus)属细菌、棒杆菌(Corynebacterium)属细菌。作为芽孢杆菌(Bacillus)属细菌,优选为枯草杆菌(Bacillus subtilis)。作为棒杆菌(Corynebacterium)属细菌,优选为谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)。作为革兰氏阴性细菌,例如,可以举出埃希氏菌(Escherichia)属细菌、泛菌(Pantoea)属细菌。作为埃希氏菌(Escherichia)属细菌,优选为大肠杆菌(Escherichia coli)。作为泛菌(Pantoea)属细菌,优选为菠萝泛菌(Pantoea ananatis)。作为真菌,优选为酵母(Saccharomyces)属、裂殖酵母(Schizosaccharomyces)属的微生物。作为酵母(Saccharomyces)属的微生物,优选为酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)。作为裂殖酵母(Schizosaccharomyces)属的微生物,优选为粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)。本发明的宿主细胞优选为属于肠杆菌科的细菌,更优选为埃希氏菌属细菌和泛菌属细菌,进一步优选为大肠杆菌(Escherichia coli)和菠萝泛菌(Pantoea ananatis)。

[0267] 在一种实施方式中,就本发明的宿主细胞而言,可以使用宿主细胞本身(例如,宿主细胞培养物)或其处理物(例如,宿主细胞的破碎物、溶菌物、冻结干燥物),以用于通过在宿主细胞中生成的本发明的修饰酶而制造含N-酰基-氨基的化合物或其盐。在另一种实施方式中,本发明的宿主细胞可以用于以未纯化、粗纯化或纯化酶的形式获得本发明的修饰酶。

[0268] 在将本发明的宿主细胞用于含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造时,就本发明的宿主细胞而言,为了提高酶反应的基质的供给效率而提高生成效率,例如,可以是氨基酸和/或脂肪酸的吸收能力被强化了了的宿主。作为所述吸收能力被强化了了的宿主,例如,可以举出使与所述吸收能力相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主。作为使与所述吸收能力相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主,例如,可以举出通过转化而导入了所述蛋白质的表达单元的宿主、在宿主基因组中包含使所述蛋白质的表达量强化的变异的宿主、在宿主基因组中包含使所述蛋白质的活性强化的变异的宿主。就这样的宿主细胞而言,其可以用于在包含含氨基化合物(例如,氨基酸)和/或含羧基化合物(例如,脂肪酸)的培养液中培养宿主细胞而制造含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)或其盐。并且,就这样的宿主细胞而言,其可以用于在包含碳源(例如,葡萄糖等糖类)的培养液中培养宿主细胞,由此制造含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)或其盐(直接发酵法)。

[0269] 就本发明的宿主细胞而言,为了抑制酶反应的基质的损失、和/或为了促进酶反应的基质的供给、或为了抑制生成物的损失,例如,可以是进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰的宿主细胞:

[0270] (1) 脂肪酸供给能力强化;

[0271] (2) 氨基酸供给能力强化;

[0272] (3) ATP供给能力强化;

[0273] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

[0274] 进行了对脂肪酸供给能力强化有效的基因修饰的宿主细胞可以是脂肪酸的分解系被弱化或缺损、和/或脂肪酸的合成系被强化了了的宿主细胞。

[0275] 作为所述脂肪酸的分解系被弱化或缺损了的宿主细胞,例如,可以举出与所述分解系相关的酶等蛋白质被弱化或缺损了的宿主细胞、产生与所述分解系相关的酶等蛋白质的抑制因子的宿主细胞。

[0276] 作为与所述脂肪酸的分解系相关的酶等蛋白质被弱化或缺损了的宿主细胞,例如,可以举出在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的表达量降低或缺失的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的活性降低或缺失的变异的宿主细胞。

[0277] 作为使与所述脂肪酸的分解系相关的酶等蛋白质的抑制因子产生或强化的宿主细胞,例如,可以举出通过转化而导入了所述抑制因子的表达单元的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述抑制因子的表达量强化的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述抑制因子的活性强化的变异的宿主细胞。

[0278] 更具体而言,作为与所述脂肪酸的分解系相关的酶等蛋白质,例如,可以举出酰基CoA合成酶(fadD)、酰基CoA脱氢酶(fadE)、烯酰CoA水合酶(fadB、fadJ)、3-羟基酰基CoA脱氢酶(fadB、fadJ)、3-酮酰基CoA硫解酶(fadA、fadI)。需要说明的是,酶名称后的括号内为其基因名(在以下的记载中也是同样)。在这些酶中,例如,优选酰基CoA合成酶。

[0279] 作为所述脂肪酸的合成系被强化了了的宿主细胞,例如,可以举出使与所述合成系相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主细胞。

[0280] 作为使与所述合成系相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主细胞,例如,可以举出通过转化而导入了所述蛋白质的表达单元的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的表达量强化的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的活性强化的变异的宿主细胞。

[0281] 更具体而言,作为与所述脂肪酸的合成系相关的酶等蛋白质,例如,可以举出酰基-ACP硫酯酶、乙酰基CoA羧化酶(accABCD)、丙二酰CoA-ACP转酰基酶(fabD)、 β -酮酰基ACP合成酶III(fabH)、 β -酮酰基ACP还原酶(fabG)、 β -羟基酰ACP脱水酶(fabZ)、烯酰ACP还原酶(fabI)、 β -酮酰基ACP合成酶I(fabB)、 β -酮酰基ACP合成酶II(fabF)。这些酶中,例如,优选酰基-ACP硫酯酶。

[0282] 可以优选所述脂肪酸供给能力强化的基因修饰为下述(a)和(b)中的任一种或下述(a)和(b)这两种。

[0283] (a) 酰基CoA合成酶缺损或弱化;

[0284] (b) 酰基-ACP硫酯酶增强。

[0285] 作为酰基CoA合成酶的缺损或弱化,例如,可以举出在宿主细胞基因组中导入fadD基因的缺失或变异。

[0286] 作为酰基-ACP硫酯酶的增强,例如,可以举出将酰基-ACP硫酯酶表达单元导入宿主细胞。

[0287] 酰基-ACP硫酯酶,例如,可以是具有针对月桂酰基-ACP的硫酯酶活性的酰基-ACP硫酯酶。此外,酰基-ACP硫酯酶,例如,可以是选自下述(i)~(iii)中的蛋白质:

[0288] (i) 一种蛋白质,所述蛋白质包含:(i-1)序列编号3的氨基酸序列或(i-2)包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列;

[0289] (ii) 一种蛋白质,所述蛋白质具有酰基-ACP硫酯酶活性,并且包含:在(ii-1)序列编号3的氨基酸序列或(ii-2)包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列中,含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列;

[0290] (iii) 一种蛋白质,所述蛋白质具有酰基-ACP硫酯酶活性,并且包含:相对于(iii-1)序列编号3的氨基酸序列或(iii-2)包含序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列。

[0291] 进行了对氨基酸供给能力强化有效的基因修饰的宿主细胞可以是氨基酸的分解系被弱化或缺损了的宿主细胞、和/或氨基酸的合成系被强化了了的宿主细胞。

[0292] 作为所述氨基酸的分解系被弱化或缺损了的宿主细胞,例如,可以举出与所述氨基酸的分解系相关的酶等蛋白质被弱化或缺损了的宿主细胞、产生与所述氨基酸的分解系相关的酶等蛋白质的抑制因子的宿主细胞。

[0293] 作为与所述氨基酸的分解系相关的酶等蛋白质被弱化或缺损了的宿主细胞,例如,可以举出在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的表达量降低或缺失的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的活性降低或缺失的变异的宿主细胞。

[0294] 作为使与所述氨基酸的分解系相关的酶等蛋白质的抑制因子产生或强化的宿主细胞,例如,可以举出通过转化而导入了所述抑制因子的表达单元的宿主细胞、在宿主细胞

基因组中包含使所述抑制因子的表达量强化的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述抑制因子的活性强化的变异的宿主细胞。

[0295] 更具体而言,与氨基酸的分解系相关的酶等蛋白质可以是目标氨基酸(例如,L-谷氨酸)的生物合成通路中分支出来,对生成目标氨基酸(例如,L-谷氨酸)以外的化合物的反应进行催化剂的酶。作为这样的酶,例如,可以举出 α -酮戊二酸脱氢酶(sucA)、异柠檬酸裂解酶(aceA)、琥珀酸脱氢酶(sdhABC D)、磷酸转乙酰酶(pta)、乙酸激酶(ack)、乙酰羟乙酸合酶(ilvG)、乙酰乳酸合酶(ilvI)、甲酸乙酰转移酶(pf1)、乳酸脱氢酶(ldh)、谷氨酸脱羧酶(gadAB)、1-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(putA)等。这些酶中,例如,优选 α -酮戊二酸脱氢酶。

[0296] 作为所述氨基酸的合成系被强化了了的宿主细胞,例如,可以举出使与所述氨基酸的合成系相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主细胞。

[0297] 作为使与所述氨基酸的合成系相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主细胞,例如,可以举出通过转化而导入了所述氨基酸的蛋白质的表达单元的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的表达量强化的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的活性强化的变异的宿主细胞。

[0298] 更具体而言,作为与氨基酸(例如,谷氨酸)的合成系相关的酶等蛋白质,可以举出谷氨酸脱氢酶(gdhA)、谷氨酰胺合成酶(glnA)、谷氨酸合酶(gltBD)、异柠檬酸脱氢酶(icdA)、乌头酸水合酶(acnA、acnB)、柠檬酸合酶(gltA)、甲基柠檬酸合酶(prpC)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(ppc)、丙酮酸羧化酶(pyc)、丙酮酸激酶(pykA、pykF)、丙酮酸脱氢酶(aceEF、lpdA)、磷酸烯醇式丙酮酸合酶(ppsA)、烯醇化酶(eno)、磷酸甘油变位酶(pgmA、pgmI)、磷酸甘油酸激酶(pgk)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gapA)、丙糖磷酸异构酶(tpiA)、果糖双磷酸醛缩酶(fbp)、磷酸果糖激酶(pfkA、pfkB)、葡萄糖磷酸异构酶(pgi)、6-磷酸葡萄糖酸脱水酶(edd)、2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶(eda)、转氢酶等。

[0299] 进行了对ATP供给能力强化有效的基因修饰的宿主细胞可以是ATP的分解系被弱化或缺损了的宿主细胞、和/或ATP的合成系被强化了了的宿主细胞。

[0300] 作为所述ATP的分解系被弱化或缺损了的宿主细胞,例如,可以举出与所述ATP的分解系相关的酶等蛋白质被弱化或缺损了的宿主细胞。

[0301] 作为与所述ATP的分解系相关的酶等蛋白质被弱化或缺损了的宿主细胞,例如,可以举出在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的表达量降低或缺失的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的活性降低或缺失的变异的宿主细胞。

[0302] 作为所述ATP的合成系被强化了了的宿主细胞,例如,可以举出使与所述合成系相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主细胞。

[0303] 作为使与所述ATP的合成系相关的酶等蛋白质产生或强化的宿主细胞,例如,可以举出通过转化而导入了所述蛋白质的表达单元的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的表达量强化的变异的宿主细胞、在宿主细胞基因组中包含使所述蛋白质的活性强化的变异的宿主细胞。

[0304] 作为对N-酰基氨基酸分解酶的缺损或弱化有效的基因修饰,例如,可以氨基酰化酶的缺损或弱化。作为氨基酰化酶的缺损或弱化,例如,可以举出在宿主细胞基因组中导入氨基酰化酶基因的缺失或变异。

[0305] 就这样的宿主细胞而言,其可以以产生本发明中使用的酶的转化微生物(例如,微

生物培养物)或其处理物(例如,微生物的破碎物、溶菌物、冻结干燥物)的形式,用于在包含含氨基化合物(例如,氨基酸)和含羧基化合物(例如,脂肪酸)的反应液中制造含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)或其盐(酶法)。就这样的宿主细胞而言,其可以用于在包含含氨基化合物(例如,氨基酸)和/或含羧基化合物(例如,脂肪酸)的培养液中培养宿主细胞,从而制造含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)或其盐。并且,就这样的宿主细胞而言,由于从碳源(例如,葡萄糖等糖类)生成含氨基化合物(例如,氨基酸)和/或含羧基化合物(例如,脂肪酸)的代谢通路得到了强化,因此可用于通过在包含碳源的培养液中培养宿主细胞而制造含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)或其盐(直接发酵法)。

[0306] 本发明中使用的转化微生物可以通过该领域中公知的任意方法而制备。例如,如上所述的转化微生物可以通过使用表达载体的方法(例如,感受态细胞法、电穿孔法)或通过基因组修饰技术而制备。如果是表达载体与宿主细胞的基因组DNA发生同源重组的整合型(integrative)载体,则表达单元可以通过转化而导入宿主细胞的基因组DNA。另一方面,如果表达载体是不与宿主细胞的基因组DNA发生同源重组的非整合型载体,则表达单元可以不通过转化而导入宿主细胞的基因组DNA,而在宿主细胞内以表达载体的状态独立于基因组DNA而存在。或,可以通过基因组编辑技术(例如,CRISPR/Cas系统,Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)),将表达单元导入宿主细胞的基因组DNA、对宿主细胞固有具备的表达单元进行修饰。

[0307] (含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造方法)

[0308] 本发明提供含N-酰基-氨基的化合物或其盐的制造方法。本发明的方法包含:在具有N-酰化活性的修饰酶的存在下,使含氨基化合物和含羧基化合物反应,生成含N-酰基-氨基的化合物或其盐。

[0309] 本发明的方法中使用的修饰酶可以是上述的本发明的修饰酶。

[0310] (含氨基化合物)

[0311] 可以在本发明的方法中使用的含氨基化合物可以是含有氮原子与1个或2个氢原子键合了的氨基的有机化合物或含有氮原子不与氢原子键合的氨基的有机化合物中的任一种。作为含氨基化合物,从酶的基质特异性等的观点出发,优选为含有氮原子与1个或2个氢原子键合了的氨基的化合物,更优选为含有氮原子与2个氢原子键合了的氨基的化合物。

[0312] 就可以在本发明的方法中使用的含氨基化合物而言,优选为具有阴离子性基团的含氨基化合物。作为阴离子性基团,例如,可以举出羧基、磺酸基、硫酸基、磷酸基。

[0313] 就具有羧基作为阴离子性基团的含氨基化合物而言,例如,可以举出氨基酸和肽。

[0314] 作为氨基酸,例如,可以举出 α -氨基酸、 β -氨基酸和 γ -氨基酸。作为 α -氨基酸,例如,可以举出甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸。作为 β -氨基酸,例如,可以举出 β -丙氨酸。作为 γ -氨基酸,例如,可以举出 γ -氨基丁酸。氨基酸的氨基可以是氮原子与2个氢原子键合了的氨基、氮原子与1个氢原子键合了的氨基和氮原子不与氢原子键合的氨基中的任一种。作为含有氮原子与1个氢原子键合了的氨基的氨基酸,例如,可以举出肌氨酸、N-甲基- β -丙氨酸、N-甲基牛磺酸、脯氨酸。氨基酸可以是L-氨基酸或D-氨基酸中的任一种。

[0315] 肽是具有上述的氨基酸通过酰胺键而连接得到的结构的化合物。作为肽,例如,可

以举出具有2~10个氨基酸通过酰胺键而连接得到的结构的寡肽(例如,二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽),和具有11个以上的氨基酸通过酰胺键而连接得到的结构的多肽(蛋白质)。作为二肽,例如,可以举出天冬氨酰苯丙氨酸、甘氨酰甘氨酸、和β-丙氨酰组氨酸、丙氨酰谷氨酰胺。

[0316] 就具有磺酸基作为阴离子性基团的含氨基化合物而言,例如,可以举出牛磺酸、N-甲基牛磺酸、半胱氨酸。

[0317] 就具有硫酸基作为阴离子性基团的含氨基化合物而言,例如,可以举出O-磺基丝氨酸、O-磺基苏氨酸。

[0318] 就具有磷酸基作为阴离子性基团的含氨基化合物而言,例如,可以举出磷酸乙醇胺、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸。

[0319] 可以在本发明的方法中使用的含氨基化合物优选为酸性氨基酸。“酸性氨基酸”是指,具有酸性侧链的氨基酸。作为酸性氨基酸,例如,可以举出谷氨酸、天冬氨酸,优选为谷氨酸。

[0320] (含羧基化合物)

[0321] 可以在本发明的方法中使用的含羧基化合物为含有未被取代的羧基(例如,游离型、离子、盐)的化合物。作为含羧基化合物,例如,可以举出脂肪酸、芳香族羧酸、吡啶羧酸和它们的混合物。作为含羧基化合物,优选为脂肪酸。

[0322] 就脂肪酸而言,例如,可以是碳原子数为8~18的脂肪酸,可以优选为碳原子数为12的脂肪酸。作为碳原子数为6~18的脂肪酸,例如可以举出己酸(C6)、庚酸(C7)、辛酸(C8)、壬酸(C9)、癸酸(C10)、癸烯酸(C10:1)、十一烷酸(C11)、月桂酸(C12)、十二烯酸(C12:1)、十三烷酸(C13)、肉豆蔻酸(C14)、十四烯酸(C14:1)(例如,肉豆蔻烯酸)、十五烷酸(C15)、棕榈酸(C16)、十六烯酸(C16:1)(例如,棕榈烯酸、sapienic acid)、十七烷酸(C17)、硬脂酸(C18)、十八烯酸(C18:1)(例如,油酸、异油酸)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)(例如,α-亚麻酸、γ-亚麻酸)(括号内表示碳原子数),并且也可以使用椰子油脂肪酸、棕榈脂肪酸、硬化牛脂脂肪酸等混合脂肪酸。

[0323] 脂肪酸可以是饱和脂肪酸。作为所述脂肪酸中的饱和脂肪酸,可以举出己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、月桂酸、十三烷酸、肉豆蔻酸、十五烷酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸。作为饱和脂肪酸,优选为月桂酸。脂肪酸也可以是不饱和脂肪酸。作为所述脂肪酸中的不饱和脂肪酸,可以举出癸烯酸(C10:1)、十二烯酸(C12:1)、十四烯酸(C14:1)(例如,肉豆蔻烯酸)、十六烯酸(C16:1)(例如,棕榈烯酸、sapienic acid)、十八烯酸(C18:1)(例如,油酸、异油酸)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)(例如,α-亚麻酸、γ-亚麻酸)(括号内表示碳原子数)。作为不饱和脂肪酸,优选为十二烯酸(C12:1)或十六烯酸(C16:1)。脂肪酸也可以是它们的混合物。

[0324] 作为芳香族羧酸,可以举出苯甲酸、邻苯二甲酸、间苯二甲酸、对苯二甲酸、水杨酸、没食子酸、肉桂酸和它们的混合物。

[0325] (含N-酰基-氨基的化合物或其盐)

[0326] 以本发明的方法制造的含N-酰基-氨基的化合物或其盐,是具有所述含氨基化合物的氨基和所述含羧基化合物的羧基形成酰胺键的结构的化合物。所述含N-酰基-氨基的化合物或其盐在所述酶的存在下,通过所述含氨基化合物和所述含羧基化合物的反应而生

成。与羧基反应的氨基可以在所述含氨基化合物的任一位置,例如,可以是 α 位、 β 位、 γ 位、 δ 位、 ϵ 位中的任一处。以本发明的方法制造的含N-酰基-氨基的化合物或其盐优选为Na-酰基-L-谷氨酸或Na-酰基-L-天冬氨酸或其盐,更优选为Na-月桂酰基-L-谷氨酸或Na-月桂酰基-L-天冬氨酸或其盐。作为含N-酰基-氨基的化合物的盐,例如,可以举出无机盐和有机盐。作为无机盐,例如,可以举出金属(例如,锂、钠、钾、铷和铯等一价的金属、以及钙、镁和锌等二价的金属)的盐、以及无机碱(例如,氨)的盐。作为有机盐,例如,可以举出有机碱(例如,乙二胺、丙二胺、乙醇胺、单烷基乙醇胺、二烷基乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸和鸟氨酸)的盐。

[0327] 本说明书中,“碳原子数为n个的酰基”是指,以 $C_{n-1}H_m-CO-$ 表示的酰基(氢原子任选被取代)。此处,m可以根据碳原子数以及不饱和键的有无而适宜决定。

[0328] 本说明书中,“含N-单不饱和酰基-氨基的化合物(此处,不饱和酰基为碳原子数为10~16个的单不饱和酰基)”是指,作为游离体,以 $C_{n-1}H_m-CO-NH-CHR-COOH$ 表示的化合物(以 H_m 表示的氢原子任选被取代。m如上述所定义的。R表示酸性氨基酸的侧链)。即,“含N-单不饱和酰基-氨基的化合物”是指,酸性氨基酸的氨基上的1个氢原子被不饱和酰基取代的化合物。“含N-单不饱和酰基-氨基的化合物”可以是含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的游离体,也可以是含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的盐。

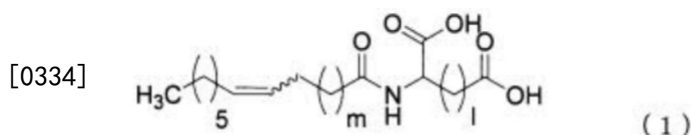
[0329] 本说明书中,出于便利,有时将含N-单不饱和酰基-氨基的化合物表示为来源于以 $C_{n-1}H_m-COOH$ 表示的脂肪酸或其衍生物的化合物。此外,本说明书中,也将“碳原子数为n个的不饱和酰基”和其来源的脂肪酸等以“ $C_n:m$ ”表示。例如,“N-十二烯酰基酸性氨基酸(C12:1)”是指,酸性氨基酸的氨基上的1个氢原子被作为来源于十二碳烯酸(C12:1)的酰基的十二烯酰基所取代的化合物($C_{11}H_{21}CO-NH-CHR-COOH$,此处,R表示酸性氨基酸的侧链)。

[0330] 在以本发明的方法制造的含N-酰基-氨基的化合物或其盐包含含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐的情况下,就含N-单不饱和酰基-氨基的化合物而言,例如,可以举出N-癸烯酰基酸性氨基酸(C10:1)、N-十二烯酰基酸性氨基酸(C12:1)、N-十四烯酰基酸性氨基酸(C14:1)、以及N-十六烯酰基酸性氨基酸(C16:1),优选为N-十二烯酰基酸性氨基酸(C12:1)或N-十六烯酰基酸性氨基酸(C16:1),更优选为N-十二烯酰基谷氨酸(C12:1)或N-十六烯酰基谷氨酸(C16:1),进一步优选为N-十二烯酰基谷氨酸(C12:1)。

[0331] 含N-单不饱和酰基-氨基的化合物可以是1种含N-单不饱和酰基-氨基的化合物,也可以包含2种以上的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物。即,含N-单不饱和酰基-氨基的化合物可以包含选自N-癸烯酰基酸性氨基酸(C10:1)、N-十二烯酰基酸性氨基酸(C12:1)、N-十四烯酰基酸性氨基酸(C14:1)以及N-十六烯酰基酸性氨基酸(C16:1)中的1种或2种以上。在为2种以上的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的情况下,优选为N-十二烯酰基酸性氨基酸(C12:1)与选自N-癸烯酰基酸性氨基酸(C10:1)、N-十四烯酰基酸性氨基酸(C14:1)以及N-十六烯酰基酸性氨基酸(C16:1)中的1种或2种以上的组合,从泡质更良好的观点出发,更优选为N-十二烯酰基酸性氨基酸(C12:1)和N-十六烯酰基酸性氨基酸(C16:1)的组合。

[0332] 含N-单不饱和酰基-氨基的化合物优选为以下述通式(1)表示的化合物。

[0333] [化学式2]



[0335] (通式(1)中,1为1或2的整数,m为0~6的整数)。

[0336] 含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的立体化学(不饱和双键部位)可以是顺式和反式中的任一种。但是,从抑制增粘性的增加,使其为操作性较高的低粘度的观点出发,优选为顺式。

[0337] (基于酶法的含N-酰基-氨基的化合物的制造)

[0338] 作为本发明的方法中使用的酶,可以利用重组蛋白质。就重组蛋白质而言,例如,可以使用无细胞系载体或从产生本发明中使用的酶的微生物中获得。本发明中使用的酶可以以未纯化、粗纯化或纯化酶的形式进行利用。作为这些酶,在反应中,可以以被固定在固相上的固相化蛋白质的形式进行利用。本发明中使用的酶可以以产生所述酶的转化微生物(例如,微生物培养物)或其处理物(例如,微生物的破碎物、溶菌物、冻结干燥物)的形态进行利用。

[0339] 可以通过以公知的方法分离本发明的方法中使用的酶,根据需要进一步进行纯化,而得到目标酶。作为产生酶的微生物,从酶的大量获得等的观点出发,优选为转化微生物。在本发明中,用语“转化”不单指对宿主细胞导入多聚核苷酸,也包含宿主细胞中的基因组的修饰。

[0340] 作为转化微生物的培养条件,无特别限定,可以根据宿主而使用标准细胞培养条件。用于培养转化微生物的培养基是公知的,例如,可以向LB培养基等营养培养基、M9培养基等最小培养基中添加碳源、氮源、维生素源等而使用。

[0341] 作为培养温度,优选为4~40℃,更优选为10~37℃。作为培养时间,优选为5~168小时,更优选为8~72小时。作为气体组成,CO₂浓度优选为约6%~约84%,pH优选为约5~9。此外,优选根据宿主细胞的性质而在好氧性、无氧性或厌氧性条件下进行培养。

[0342] 作为培养方法,可以使用任意的适当的方法。根据宿主细胞,可以使用振荡培养和静置培养中的任一种,可以根据需要进行搅拌,也可以进行通气。作为这样的培养方法,例如,可以举出分批培养法、流加培养法、连续培养法。在通过转化体微生物产生的特定蛋白质的表达处于lac启动子等诱导性启动子的控制下的情况下,可以向培养培养基中添加例如IPTG(异丙基-β-硫代吡喃半乳糖苷)等诱导剂,对蛋白质的表达进行诱导。

[0343] 产生的目标酶可以通过公知的盐析、等电点沉淀法或溶剂沉淀法等沉淀法、透析、超滤或凝胶滤过等利用分子量差的方法;离子交换色谱等利用特异性亲和性的方法;疏水色谱、逆相色谱等利用疏水度的差的方法或其它亲和性色谱、SDS聚丙烯酰胺电泳法、等电点电泳法等或它们的组合而从转化微生物的提取物中纯化和分离。在分泌表达目标酶的情况下,可以通过以离心分离等除去菌体而从培养转化微生物而得到的培养液中得到包含目标酶的培养上清。也可以从该培养上清中纯化和分离目标酶。

[0344] 作为本发明的方法中使用的基质的含氨基化合物和含羧基化合物可以添加至包含所述酶的反应体系(例如,包含所述酶的水溶液、包含产生所述酶的转化微生物的培养液、产生所述酶的转化微生物的处理物)中。或,在本发明的方法中,可以将其他反应体系中生成的含氨基化合物或含羧基化合物作为基质而利用。

[0345] 在使用所述酶本身(例如,纯化酶)进行本发明的方法的情况下,作为反应体系,可以使用包含所述酶的水溶液。作为水溶液,优选为缓冲液。作为缓冲液,例如,可以举出磷酸缓冲液、Tris缓冲液、碳酸缓冲液、乙酸缓冲液、柠檬酸缓冲液。pH例如优选为约5~10。反应体系中的酶、以及含氨基化合物和含羧基化合物(基质)的量、以及反应时间可以根据要生成的含N-酰基-氨基的化合物的量而适宜调节。就反应温度而言,只要反应能够进行就无特别限定,但优选为20~40℃。

[0346] 本发明的方法也可以与ATP再生系统组合的形式进行。在使用所述酶本身(例如,纯化酶)进行本发明的方法的情况下,作为与ATP再生系统的组合,例如,可以举出基于与ATP再生酶的组合(例如,混合)的反应。作为ATP再生酶,例如,可以举出多磷酸激酶、多磷酸:AMP磷酸转移酶和多磷酸激酶的组合、多磷酸:AMP磷酸转移酶和腺苷酸激酶的组合。在使用产生所述酶的转化微生物或其处理物进行本发明的方法的情况下,作为与ATP再生系统的组合,例如,可以举出使用ATP供给能力被增强了的微生物作为宿主。作为ATP供给能力被增强了的微生物,例如,可以举出上述的使ATP再生酶产生或强化的微生物。作为使ATP再生酶产生或强化的微生物,例如,可以举出通过转化而导入了ATP再生酶的表达单元的宿主、在宿主基因组中包含使ATP再生酶的表达量强化的变异的宿主、在宿主基因组中包含使ATP再生酶的活性强化的变异的宿主。

[0347] (基于微生物培养法的含N-酰基-氨基的化合物的制造)

[0348] 在本发明的方法中,所述酶的存在下的反应可以使用产生所述酶的转化微生物(例如,微生物培养物)进行。

[0349] 在使用所述转化微生物的培养物进行本发明的方法的情况下,就转化微生物而言,为了提高酶反应的基质的供给效率而提高生成效率,例如,可以是氨基酸和/或脂肪酸的吸收能力被强化了了的宿主。作为所述吸收能力被强化了了的宿主,可以举出上述的宿主。在该情况下,可通过在包含含氨基化合物(例如,氨基酸)和/或含羧基化合物(例如,脂肪酸)的培养液中培养转化微生物,两基质被转化微生物吸收,通过转化微生物中生成的酶而形成酰胺键,生成作为目标的含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)。

[0350] 此外,为了抑制酶反应的基质的损失、和/或为了促进酶反应的基质的供给或为了抑制生成物的损失,转化微生物例如可以进行了选自下述(1)~(4)中的至少1种以上的基因修饰:

[0351] (1) 脂肪酸供给能力强化;

[0352] (2) 氨基酸供给能力强化;

[0353] (3) ATP供给能力强化;

[0354] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

[0355] 就这样的转化微生物而言,可以优选进行了对脂肪酸供给能力强化有效的基因修饰,这样的转化微生物也可以是脂肪酸的分解系被弱化或缺损、和/或合成系被强化了了的转化微生物。作为所述分解系被弱化或缺损、和/或合成系被强化了了的转化微生物(宿主),可以举出上述的宿主。作为这样的转化微生物,可以优选地举出进行了选自下述中的至少1种以上的基因修饰的微生物:

[0356] (a) 酰基CoA合成酶缺损或弱化;

[0357] (b) 酰基-ACP硫酯酶增强。

[0358] (a) 和 (b) 的基因修饰的详细内容如上所述。

[0359] 在通过培养转化微生物来制造含N-酰基-氨基的化合物的情况下,作为转化微生物的培养条件,无特别限定,例如,在上述的培养条件中,可以使用以进一步包含给定量的含氨基化合物和/或含羧基化合物的培养基进行培养的培养条件。

[0360] (基于直接发酵法的含N-酰基-氨基的化合物的制造)

[0361] 本发明提供基于直接发酵法的含N-酰基-氨基的化合物的制造方法。“直接发酵法”是指,在包含作为原料的碳源的培养液中培养转化微生物,通过从碳源出发生成目标含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)而制造含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)的方法。该方法具有以下原理:碳源被微生物吸收,碳源在微生物中被代谢为含羧基化合物(例如,脂肪酸)和含氨基化合物(例如,氨基酸),通过代谢而产生的含羧基化合物(例如,脂肪酸)和含氨基化合物(例如,氨基酸)由于微生物中的具有N-酰化活性的酶的作用而通过酰胺键键合,从而生成目标含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)。

[0362] 例如,直接发酵法可以表示为含氨基化合物和含羧基化合物酰胺键合了的含N-酰基-氨基的化合物的制造方法,所述方法包含:在碳源的存在下培养进行了选自以下(1)~(4)中至少1种以上的基因修饰,并且包含编码具有N-酰化活性的酶的多聚核苷酸的表达单元的微生物。

[0363] (1) 脂肪酸供给能力强化;

[0364] (2) 氨基酸供给能力强化;

[0365] (3) ATP供给能力强化;

[0366] (4) N-酰基氨基酸分解酶缺损或弱化。

[0367] 所述(1)~(4)的详细内容与上述同样(其他处也同样)。

[0368] 优选直接发酵法可以表示为含氨基化合物和含羧基化合物酰胺键合了的含N-酰基-氨基的化合物的制造方法,所述方法包含:在碳源的存在下培养进行了选自以下(a)~(b)中至少1种以上的基因修饰,并且包含编码具有N-酰化活性的酶的多聚核苷酸的表达单元的微生物。

[0369] (a) 酰基CoA合成酶缺损或弱化;

[0370] (b) 酰基-ACP硫酯酶增强。

[0371] 所述(a)和(b)的详细内容与上述同样(其他处也同样)。

[0372] 作为碳源,例如,可以举出糖类、脂质、蛋白质、醇(例如,甘油),优选为糖类。作为糖类,例如,可以举出葡萄糖、半乳糖、甘露糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉水解物、糖蜜等,优选为葡萄糖。

[0373] (a) 和 (b) 的基因修饰的详细内容如上所述。通过选自(a)和(b)中的至少1种以上的基因修饰,酶反应的基质的损失被抑制和/或供给被促进,由此,微生物中从碳源到含羧基化合物(例如,脂肪酸)的代谢被强化。

[0374] 通过代谢产生的含氨基化合物(例如,氨基酸)和含羧基化合物(例如,脂肪酸),通过具有N-酰化活性的酶的作用而酰胺键合,作为目标物而生成含N-酰基-氨基的化合物(例如,N-酰基氨基酸)。

[0375] “具有N-酰化活性的酶”是指,具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力的酶。作为具有N-酰化活性的酶,可以使用上述的具有N-酰化活性的修饰酶(本

发明的修饰酶),也可以使用被发现具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力的蛋白质;包含在该蛋白质的氨基酸序列中含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性的蛋白质;以及,包含相对于该蛋白质的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性的蛋白质。作为被发现具有使羧基和氨基以依赖ATP的方式键合而形成酰胺键的能力的蛋白质,例如,可以举出PCT/JP2019/007681所述的GH3蛋白质(AtGH3-6、OsGH3-8、AtJAR1(AtGH3-11)、AtGH3-5、AtGH3-10、AtGH3-12、AtGH3-17、SsGH3和CfHP(WP__002626336))和PaaK蛋白质(PsIAAL和PaHP(WP__031591948)),可以优选为AtGH3-6(序列编号1)。GH3蛋白质和PaaK蛋白质中也包含它们的变异体(包含在该蛋白质的氨基酸序列中含有1个或数个氨基酸的置换、缺失、插入或添加的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性的蛋白质;以及,包含相对于该蛋白质的氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列,并且具有N-酰化活性的蛋白质)。

[0376] 就通过代谢而产生的含氨基化合物的例子而言,可以举出上述作为含氨基化合物的例子的化合物,优选为氨基酸,更优选为L-谷氨酸或L-天冬氨酸。就通过代谢而产生的含羧基化合物的例子而言,可以举出上述作为含羧基化合物的例子的化合物,优选为脂肪酸(例如,饱和脂肪酸),更优选为碳原子数为8~18的脂肪酸(例如,饱和脂肪酸),进一步优选为碳原子数为12的脂肪酸,最优选为月桂酸。

[0377] 在通过培养转化微生物来制造含N-酰基-氨基的化合物的情况下,作为转化微生物的培养条件,无特别限定,例如,在上述的培养条件中,可以使用以进一步包含给定量的碳源(例如,葡萄糖等糖类)的培养基进行培养的培养条件。

[0378] 含N-酰基-氨基的化合物的制造的确认可以适宜进行。例如,这样的确认可以通过向反应体系中添加反应停止液(例如,1.4%(w/v)磷酸、75%(v/v)甲醇水溶液),对离心后的上清进行UPLC-MS分析而进行。

[0379] (表面活性剂)

[0380] 含N-酰基-氨基的化合物(例如,以本发明的方法制造的含N-酰基-氨基的化合物)或其盐可以用于各种用途,例如,可以作为化妆品原材料(例如,表面活性剂)等组合物中包含的成分而使用。就这样的组合物中包含的含N-酰基-氨基的化合物或其盐而言,例如,可以包含含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐。作为含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐,例如可以举出上述的化合物。

[0381] 在将含N-酰基-氨基的化合物或其盐用作表面活性剂的成分的情况下,表面活性剂可以包含具有碳原子数为10~16的单不饱和酰基的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物或其盐。在这样的情况下,由于含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的酰基部位是单不饱和酰基,因此增粘性的增加被抑制,在变为操作性较高的低粘度的同时,还能发挥溶解性良好这一效果。此外,由于酰基部位的碳原子数为10~16个,因此具有良好的发泡、泡质。

[0382] 作为含N-酰基-氨基的化合物的盐,例如,可以举出上述的盐。

[0383] 如果含N-酰基-氨基的化合物是从单不饱和脂肪酸出发而得到的,则含N-酰基-氨基的化合物例如,可以通过下述方式得到:使以 $C_{n-1}H_m-COX$ 表示的单不饱和脂肪酸衍生物(X为任意的一价基团,例如,选自氟、氯、溴以及碘中的卤素原子)与酸性氨基酸的盐(作为盐,例如,可以举出如上所述的无机盐以及有机盐)反应。

[0384] 就作为含N-单不饱和酰基-氨基的化合物的来源的单不饱和脂肪酸而言,例如,可

以举出癸烯酸 (C10:1)、十二烯酸 (C12:1)、十四烯酸 (C14:1) (例如,肉豆蔻烯酸) 以及十六烯酸 (C16:1) (例如,棕榈烯酸), 优选为十二烯酸 (C12:1) 或十六烯酸 (C16:1)。

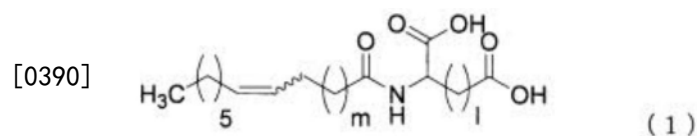
[0385] “含N-酰基-氨基的化合物”中的“酸性氨基酸”是指, 具有酸性侧链的氨基酸。作为酸性氨基酸, 例如, 可以举出谷氨酸、天冬氨酸, 优选为谷氨酸。

[0386] 就含N-单不饱和酰基-氨基的化合物而言, 例如, 可以举出N-癸烯酰基酸性氨基酸 (C10:1)、N-十二烯酰基酸性氨基酸 (C12:1)、N-十四烯酰基酸性氨基酸 (C14:1) 以及N-十六烯酰基酸性氨基酸 (C16:1), 优选为N-十二烯酰基酸性氨基酸 (C12:1) 或N-十六烯酰基酸性氨基酸 (C16:1), 更优选为N-十二烯酰基谷氨酸 (C12:1) 或N-十六烯酰基谷氨酸 (C16:1), 进一步优选为N-十二烯酰基谷氨酸 (C12:1)。

[0387] 含N-单不饱和酰基-氨基的化合物可以是1种含N-单不饱和酰基-氨基的化合物, 也可以包含2种以上的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物。即, 含N-单不饱和酰基-氨基的化合物可以包含选自N-癸烯酰基酸性氨基酸 (C10:1)、N-十二烯酰基酸性氨基酸 (C12:1)、N-十四烯酰基酸性氨基酸 (C14:1) 以及N-十六烯酰基酸性氨基酸 (C16:1) 中的1种或2种以上。如果是2种以上的含N-单不饱和酰基-氨基的化合物, 则优选为N-十二烯酰基酸性氨基酸 (C12:1) 与选自N-癸烯酰基酸性氨基酸 (C10:1)、N-十四烯酰基酸性氨基酸 (C14:1) 以及N-十六烯酰基酸性氨基酸 (C16:1) 中的1种或2种以上的组合, 从泡质更为良好的观点出发, 更优选为N-十二烯酰基酸性氨基酸 (C12:1) 和N-十六烯酰基酸性氨基酸 (C16:1) 的组合。

[0388] N-单不饱和酰基酸性氨基酸的不饱和键部位无特别限定, 可以是酰基部位的碳链末端, 可以是距离酰基部位的碳链末端数个碳原子数的碳原子间, 也可以是酰基部位的羰基的 α 位。其中, 优选在距离酰基部位的碳链末端6~7个碳原子数的碳原子间处具有不饱和键。即, N-单不饱和酰基酸性氨基酸优选为以下述通式 (1) 表示的化合物。

[0389] [化学式3]



[0391] (通式 (1) 中, l 为1或2的整数, m 为0~6的整数)

[0392] N-单不饱和酰基酸性氨基酸的立体化学 (不饱和双键部位) 可以为顺式和反式中的任一种。但是, 从抑制增粘性的增加, 使其为操作性较高的低粘度的观点出发, 优选为顺式。

[0393] (组合物)

[0394] 本发明的组合物包含: 成分 (A) N-单不饱和酰基酸性氨基酸 (此处, 不饱和酰基为碳原子数为10~16个的酰基) 或其盐; 以及成分 (B) N-饱和酰基酸性氨基酸或其盐。

[0395] 本发明的组合物由于包含成分 (A), 因此在与皮肤同等pH的弱酸性区域中也具有良好的发泡、泡质和溶解性, 并且为操作性较高的低粘度。此外, 由于本发明的组合物是也包含成分 (B) 的、在酰基具有变体的组合物, 因此也能够发挥提高油的清洗力的效果。

[0396] (成分 (A))

[0397] 关于成分 (A) 的详细内容, 如上述表面活性剂的N-单不饱和酰基酸性氨基酸中所述。

[0398] (成分 (B))

[0399] 在本说明书中,“N-饱和酰基酸性氨基酸”是指,作为游离体,以 $C_{n-1}H_m-CO-NH-CHR-COOH$ 表示的化合物(以 H_m 表示的氢原子任选被取代。 m 如上述所定义的。 R 表示酸性氨基酸的侧链)。即,“N-饱和酰基酸性氨基酸”是指,酸性氨基酸的氨基上的1个氢原子被饱和酰基所取代的化合物。“N-饱和酰基酸性氨基酸”可以是N-饱和酰基酸性氨基酸的游离体,也可以是N-饱和酰基酸性氨基酸的盐。

[0400] 需要说明的是,作为N-饱和酰基酸性氨基酸的盐,可以说与N-单不饱和酰基酸性氨基酸的盐同样。

[0401] 在本说明书中,为了方便,有时将N-饱和酰基酸性氨基酸表示为来源于以 $C_{n-1}H_m-COOH$ 表示的脂肪酸或其衍生物的物质。此外,本说明书中,有时也将“碳原子数为 n 个的饱和酰基”和其来源的脂肪酸等通过“ C_n ”表示。例如,“N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})”是指,酸性氨基酸的氨基上的1个氢原子被作为来源于月桂酸(C_{12})的酰基的月桂酰基所取代的化合物($C_{11}H_{23}CO-NH-CHR-COOH$,此处, R 表示酸性氨基酸的侧链)。

[0402] 如果N-饱和酰基酸性氨基酸是从饱和脂肪酸出发而得到的,则N-饱和酰基酸性氨基酸例如可以通过下述方式得到:使 $C_{n-1}H_m-COX$ 表示的饱和脂肪酸衍生物(X 为任意的一价基团,例如,选自氟、氯、溴以及碘中的卤素原子)与酸性氨基酸或其盐(作为盐,例如,可以举出如上所述的无机盐以及有机盐)反应。

[0403] 作为N-饱和酰基酸性氨基酸,例如,可以举出N-辛酰酸性氨基酸(C_8)、N-己酰酸性氨基酸(C_{10})、N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})、N-肉豆蔻酰酸性氨基酸(C_{14})、N-棕榈酰酸性氨基酸(C_{16})以及N-硬脂酰酸性氨基酸(C_{18})。

[0404] “N-饱和酰基酸性氨基酸”中的“酸性氨基酸”是指,具有酸性侧链的氨基酸。作为酸性氨基酸,例如,可以举出谷氨酸、天冬氨酸,优选为谷氨酸。

[0405] N-饱和酰基酸性氨基酸优选为N-辛酰酸性氨基酸(C_8)、N-己酰酸性氨基酸(C_{10})、N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})、N-肉豆蔻酰酸性氨基酸(C_{14})或N-棕榈酰酸性氨基酸(C_{16}),更优选为N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12}),进一步优选为N-月桂酰谷氨酸(C_{12})。

[0406] 成分(B)可以是1种N-饱和酰基酸性氨基酸或其盐,也可以包含2种以上的N-饱和酰基酸性氨基酸或其盐。即,成分(B)可以包含选自N-辛酰酸性氨基酸(C_8)、N-己酰酸性氨基酸(C_{10})、N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})、N-肉豆蔻酰酸性氨基酸(C_{14})、N-棕榈酰酸性氨基酸(C_{16})以及N-硬脂酰酸性氨基酸(C_{18})中的1种或2种以上。在为2种以上的N-饱和酰基酸性氨基酸的情况下,优选包含N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12}),更优选包含N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})与选自N-辛酰酸性氨基酸(C_8)、N-己酰酸性氨基酸(C_{10})、N-肉豆蔻酰酸性氨基酸(C_{14})以及N-棕榈酰酸性氨基酸(C_{16})中的1种或2种以上的组合。

[0407] 在成分(B)包含N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})的情况下,就成分(B)中的N-月桂酰酸性氨基酸(C_{12})的含量而言,例如为30质量%以上,优选为40质量%以上,更优选为50质量%以上,进一步优选为60质量%以上。更具体而言,就成分(B)中的N-月桂酰酸性氨基酸的含量而言,例如为30~100质量%,优选为40~100质量%,更优选为50~100质量%,进一步优选为60~100质量%。

[0408] 就成分(A)相对于成分(A)和成分(B)的合计的质量比($A/(A+B)$)而言,从基于成分(A)的、在低pH下的溶解性的提高等的观点出发,通常为0.001以上,优选为0.002以上,更优选为0.003以上,进一步优选为0.004以上。此外,就成分(A)相对于成分(A)和成分(B)的合

计的质量比 ($A/(A+B)$) 而言,从成分 (B) 的含量多而有助于油的清洗力等的观点出发,通常为1.00以下,优选小于1.00,更优选为0.80以下,进一步优选为0.60以下,更进一步优选为0.50以下。更具体而言,成分 (A) 相对于成分 (A) 和成分 (B) 的合计的质量比 ($A/(A+B)$) 通常为0.001~1.00,优选为0.001以上且小于1.00,更优选为0.002~0.80,进一步优选为0.003~0.60,更进一步优选为0.004~0.50。

[0409] 本发明的组合物可以进一步包含成分 (C) N-不饱和脂肪酸或其盐。

[0410] 在本发明的组合物包含成分 (C) 的情况下,泡质更为良好,同时油的清洗力进一步提高。

[0411] (成分 (C))

[0412] 不饱和脂肪酸的碳原子数优选为6~22,更优选为8~18。作为不饱和脂肪酸,例如,可以举出己烯酸 (C6:1)、辛烯酸 (C8:1)、癸烯酸 (C10:1)、十二烯酸 (C12:1)、十四烯酸 (C14:1) (例如,肉豆蔻烯酸)、十六烯酸 (C16:1) (例如,棕榈烯酸)、十八烯酸 (C18:1) (例如,油酸)、二十烯酸 (C20:1) (例如,花生烯酸)、二十二烯酸 (C22:1),优选为十二烯酸 (C12:1)。

[0413] 作为不饱和脂肪酸的盐,例如,可以举出钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、铝盐等无机盐;铵盐、单乙醇胺盐、二乙醇胺盐、三乙醇胺盐等有机胺盐;精氨酸盐、赖氨酸盐等碱性氨基酸盐等有机盐等。其中,优选三乙醇胺盐、钠盐、钾盐。

[0414] 成分 (C) 可以是1种不饱和脂肪酸或其盐,也可以包含2种以上的不饱和脂肪酸或其盐。即,成分 (C) 可以包含选自己烯酸 (C6:1)、辛烯酸 (C8:1)、癸烯酸 (C10:1)、十二烯酸 (C12:1)、十四烯酸 (C14:1) (例如,肉豆蔻烯酸)、十六烯酸 (C16:1) (例如,棕榈烯酸)、十八烯酸 (C18:1) (例如,油酸)、二十烯酸 (C20:1) (例如,花生烯酸) 以及二十二烯酸 (C22:1) 中的1种或2种以上。在为2种以上的不饱和脂肪酸或其盐的情况下,优选包含十二烯酸 (C12:1),更优选包含十二烯酸 (C12:1) 与选自辛烯酸 (C8:1)、癸烯酸 (C10:1)、十四烯酸 (C14:1) 以及十六烯酸 (C16:1) 中的1种或2种以上的组合。

[0415] 在成分 (C) 包含十二烯酸 (C12:1) 的情况下,成分 (C) 中的十二烯酸 (C12:1) 的含量例如为30质量%以上,优选为40质量%以上,更优选为50质量%以上,进一步优选为60质量%以上,更进一步优选为70质量%以上,特别优选为80质量%以上。更具体而言,成分 (C) 中的十二烯酸 (C12:1) 的含量例如为30~100质量%,优选为40~100质量%,更优选为50~100质量%,进一步优选为60~100质量%,更进一步优选为70~100质量%,特别优选为80~100质量%。

[0416] 成分 (C) 相对于成分 (A) 和成分 (B) 的合计的质量比 ($C/(A+B)$) 可以为0以上。在成分 (C) 相对于成分 (A) 和成分 (B) 的合计的质量比 ($C/(A+B)$) 为0的情况下,不含有成分 (C)。从成分 (C) 有助于提高泡质 (密度) 等的观点出发,可以设为0.01以上,优选为0.1以上,更优选为0.2以上,进一步优选为0.4以上,更进一步优选为0.5以上。此外,就成分 (C) 相对于成分 (A) 和成分 (B) 的合计的质量比 ($C/(A+B)$) 而言,从有助于成分 (A) 以及成分 (B) 的效果等的观点出发,通常为20以下,优选为15以下,更优选为13以下,进一步优选为11以下,更进一步优选为10以下。更具体而言,成分 (C) 相对于成分 (A) 和成分 (B) 的合计的质量比 ($C/(A+B)$) 通常为0.01~20,优选为0.1~15,更优选为0.2~13,进一步优选为0.4~11,更进一步优选为0.5~10。

[0417] 本发明的组合物可以在 (D) 水溶性介质中包含成分 (A)、成分 (B) 以及任意成分

(C)。作为水溶性介质,可以使用任意的水溶类溶剂。作为水溶性介质,例如,可以举出水溶液。水溶液可以具有缓冲能力也可以不具有。作为水溶液,例如,可以举出水(例如,蒸馏水、灭菌蒸馏水、纯化水、生理盐水、城市用水等自来水)、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、TE (Tris-EDTA) 缓冲液、碳酸缓冲液、硼酸缓冲液、酒石酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、乙酸缓冲液。

[0418] 成分(A)的含量根据本发明的组合物中包含的其他成分的种类和浓度、以及pH等各种条件而变动,因此无特别限定。在本发明的组合物为水溶液形态的情况下,从提高在低pH下的溶解性等的观点出发,例如为0.001质量%以上,优选为0.002质量%以上,更优选为0.003质量%以上。此外,成分(A)的含量例如可以设为60质量%以下,优选为40质量%以下。更具体而言,成分(A)的含量例如为0.001~60质量%,优选为0.001~40质量%,更优选为0.002~40质量%,进一步优选为0.003~40质量%。

[0419] 成分(B)的含量根据本发明的组合物中包含的其他成分的种类和浓度、以及pH等各种条件而变动,因此无特别限定。在本发明的组合物为水溶液形态的情况下,从提高在低pH下的溶解性等的观点出发,例如为0.01质量%以上,优选为0.02质量%以上,更优选为0.03质量%以上。此外,成分(B)的含量例如可以设为60质量%以下,优选为40质量%以下,更优选为10质量%以下。更具体而言,成分(B)的含量例如为0.01~60质量%,优选为0.02~40质量%,更优选为0.03~10质量%。

[0420] 成分(C)的含量根据本发明的组合物中包含的其他成分的种类和浓度、以及pH等各种条件而变动,因此无特别限定,可以为0质量%以上。在成分(C)的含量为0质量%的情况下,不含有成分(C)。在本发明的组合物为水溶液形态的情况下,从有助于提高泡质(密度)等的观点出发,例如为0.001质量%以上,优选为0.002质量%以上,更优选为0.003质量%以上。此外,从如果大量含有成分(C)则会抑制本发明的效果等的观点出发,成分(C)的含量例如可以设为5质量%以下,优选为3质量%以下,更优选为1质量%以下。更具体而言,成分(C)的含量例如为0.001~5质量%,优选为0.002~3质量%,更优选为0.003~1质量%。

[0421] 就本发明的组合物而言,从抑制杂菌繁殖(防腐作用)带来的保存稳定性、以及与皮肤(弱酸性)同等的pH带来的对皮肤的低刺激性的观点出发,优选为弱酸性。本发明的组合物的pH例如为3.0~9.0,可以设为3.0~8.0或3.0~7.0。pH的上限优选为8.0以下,更优选为7.0以下。此外,下限优选为4.0以上,更优选为4.5以上。就本发明的组合物的pH而言,从与皮肤同等的pH的观点出发,优选为4.0~8.0,更优选为4.0~7.0,或优选为4.5~8.0,更优选为4.5~7.0。本发明的组合物由于在低pH下溶解性也优异,因此析出受到抑制,从该点出发可认为保存稳定性优异。并且,一般来说,阴离子性表面活性剂在pH降低时会表现出发泡降低的倾向,本发明的组合物即使在低pH下发泡也良好。pH可以使用pH调节剂进行调节。作为pH调节剂,例如,可以举出如上所述的水溶液(缓冲液)、酸性物质(例如,盐酸、硫酸、硝酸、柠檬酸)、碱性物质(例如,钠、钾等碱金属、钙等碱土金属的氢氧化物)。

[0422] 就本发明的组合物的粘度而言,从操作性的观点出发,优选为低粘度。

[0423] 本发明的组合物的粘度例如为1.5Pa·s以下,优选为1.0Pa·s以下,更优选为0.80Pa·s以下,进一步优选为0.70Pa·s以下,更进一步优选为0.50Pa·s以下。

[0424] 本发明的组合物由于操作性优异,因此可用作作为个人护理的化妆品。

[0425] 本说明书中,粘度为如下测定的值:对于浓度为10质量%的组合物的水溶液,使用B型粘度计(DVB-10(株式会社)东洋精机制作所制B型粘度计,转子编号20~23、6~30rpm,25℃,30秒后)而测定的值。

[0426] 此外,本发明的组合物也可以包含追加的清洗成分、多元醇、增粘剂、稳定化剂、保存剂、香料、色素等其他成分。这些成分的具体种类及量可以适宜设定。

[0427] 作为追加的清洗成分,例如,可以举出阴离子性表面活性剂、两性表面活性剂、非离子性表面活性剂等表面活性剂;微小固形物(例如,微珠、磨砂)。

[0428] 阴离子性表面活性剂包含1种或2种以上的阴离子性基团。作为阴离子性基团,例如,可以举出羧基、磺酸基、硫酸基、磷酸基。作为阴离子性表面活性剂,例如,可以举出高级脂肪酸、N-酰基氨基酸、N-酰牛磺酸、烷基醚羧酸、烷基磷酸、聚氧乙烯烷基醚磷酸、烷基硫酸、聚氧乙烯烷基醚硫酸、具有烷基链的磺氧化合物;和它们的盐。

[0429] 两性表面活性剂包含如上所述的1种或2种以上的阴离子性基团、以及1种或2种以上的阳离子性基团。作为阳离子性基团,例如,可以举出铵基、伯氨基、仲氨基、叔氨基、季氨基。作为两性表面活性剂,例如,可以举出酰胺甜菜碱型两性表面活性剂、乙酸甜菜碱型两性表面活性剂、磺基甜菜碱型两性表面活性剂、以及咪唑啉型两性表面活性剂(例如,月桂酰两性基乙酸或其盐)。

[0430] 作为非离子性表面活性剂,例如,可以举出甘油脂肪酸酯、脱水山梨醇脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等酯型;烷基聚乙二醇、聚氧乙烯烷基苯基醚等醚型;糖与高级醇进行糖苷键合而得到的烷基糖苷、烷基聚糖苷等非离子性表面活性剂。

[0431] 作为多元醇,例如,可以举出2元醇(例如,乙二醇、丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2-丁烯-1,4-二醇、1,5-戊二醇、1,2-戊二醇、异戊乙二醇、己二醇、二乙二醇、二丙二醇、甘油单酯(单酰甘油))、3元醇(例如,甘油、三羟甲基丙烷、1,2,6-己三醇)、4元醇(例如,二甘油、季戊四醇)、更多元的醇以及它们的盐(例如,如上所述的无机盐以及有机盐)。作为更多元的醇,例如,任选被取代的糖醇(例如,山梨糖醇、甘露糖醇、蔗糖、葡萄糖、甘露糖等单糖醇、海藻糖等二糖醇、以及透明质酸、黄原胶等多糖醇),以及如上所述的2~4元醇的聚合物(例如,聚乙二醇、聚甘油)以及它们的盐(例如,如上所述的无机盐以及有机盐)。多元醇优选为2元~4元醇,更优选为2元或3元醇。

[0432] 作为增粘剂,例如,可以举出卡拉胶、糊精、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、羧基乙烯基聚合物(高分子胶)、(丙烯酸/丙烯酸烷基酯(C10-30))共聚物、黄原胶。

[0433] 作为稳定剂,例如,可以举出抗坏血酸、焦亚硫酸钠、EDTA。

[0434] 作为保存剂,例如,可以举出对羟基苯甲酸乙酯、苯甲酸钠、水杨酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等)、亚硫酸氢钠。

[0435] 作为香料,例如,可以举出天然香料以及合成香料。作为天然香料,例如,可以举出玫瑰油、茉莉油、橙花油、薰衣草油、依兰油、晚香玉油、澄清油、丁香油、薄荷油、天竺葵油、广藿香油、檀香油、肉桂油、芫荽油、肉豆蔻油、胡椒油、柠檬油、橙油、佛手柑油、罂粟油、香根草油、鸢尾油、橡苔油。作为合成香料,例如,可以举出柠檬烯(橙)、 β -石竹烯(木香)、Sis-3-己烯醇(新绿的嫩叶)、芳樟醇(铃兰)、法尼醇(清新绿调花香)、 β -苯基乙醇(玫瑰)、2,6-壬二烯(堇、黄瓜)、柠檬醛(柠檬)、 α -己基肉桂醛(茉莉花)、 β -紫罗兰酮(稀释得到堇)、1-

香芹酮(留兰香)、环十五烷酮(麝香)、乙酸芳樟酯(佛手柑、薰衣草)、苯甲酸苄酯(香脂)、 γ -十一烷内酯(桃)、丁香酚(丁香)、玫瑰氧化物(绿叶·花香)、吲哚(稀释得到茉莉花)、苯基乙醛二甲基缩醛(风信子)、奥兰硫醇(橙花)、薄荷醇(薄荷)(括号内表示香气)。

[0436] 作为色素,例如,可以举出有机颜料(例如,红色201号等红色颜料、蓝色404号等蓝色颜料、橙色203号等橙色颜料、黄色205号等黄色颜料、绿色3号等绿色颜料、铝色淀等有机色淀颜料、叶绿素等天然色素)、以及无机颜料(例如,氧化钛等白色颜料、氧化铁等有色颜料、滑石等体质颜料、云母等珠光颜料)。

[0437] 本发明的组合物例如可以以粉状、液状、凝胶状、糊状、膏状、泡状等各种形态进行提供。需要说明的是,本发明涉及的组合物可依照常规划方法制造。

[0438] 本发明的组合物可以通过常规方法,制成可适用于例如皮肤、毛发、头皮等的任意形态的化妆品。就化妆品而言,例如,作为用于人类等动物的清洗剂,优选适用于沐浴露、洗手液、洗面剂、洁面乳、洁面霜、按摩霜、洗发水等用途。化妆品优选的特性(例如,pH)与所述本发明的组合物优选的特性同样。

[0439] 此外,本发明的组合物也可以作为赋形剂等添加剂而利用。

实施例

[0440] 接下来将举出实施例对本发明进行更为详细的说明,但本发明不受以下实施例的限制。

[0441] 实施例1:基于部位特异性变异导入的变异型AtGH3-6表达质粒的构建(1)以表达N末端侧处融合有His-tag和凝血酶识别序列的、拟南芥来源的吲哚-3-乙酸-酰胺合成酶GH3.6(就AtGH3-6、Q9LSQ4而言,氨基酸序列为序列编号1,为用于E.coli中的表达而进行了密码子最优化的、编码该氨基酸序列的碱基序列为序列编号2)的pET-28a-AtGH3-6(PCT/JP2019/007681)为模板,对AtGH3-6导入了变异。此外,对于数种变异型AtGH3-6,以下述得到的变异型AtGH3-6表达质粒为模板,进一步导入了变异。变异型AtGH3-6(变异体编号31)的表达质粒的构建方法如实施例1(2)所述。变异导入使用Prime STAR Max DNA Polymerase(Takara Bio)通过以下的条件进行。

[0442] 1cycle 98°C,30sec

[0443] 30cycles 98°C,10sec

[0444] 55°C,15sec

[0445] 72°C,40sec

[0446] 1cycle 72°C,5min

[0447] 4°C,hold

[0448] 使用的引物如下所示。表中的WT表示野生型AtGH3-6。

[0449] [表2-1]

[0450] 表2-1.在变异型AtGH3-6的制作中使用的部位特异性变异导入用引物(1)

[0451]

变异体编号	模板	导入的 变异点	碱基序列(5'→3')	序列编号
R18	WT	Y134F	CGTCGGAGTCTGCTGTTTTCACTCCTTATGCCC	7
			GGGCATAAGGAGTGAAAACAGCAGACTCCGACG	8
R20	WT	Y134V	CGTCGGAGTCTGCTGGTGTCACTCCTTATGCCC	9
			GGGCATAAGGAGTGACACCAGCAGACTCCGACG	10
R30	WT	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	11
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	12
R32	WT	V174A	CTGCCTGCACGTCCCGCGCTGACCTCGTATTAC	13
			GTAATACGAGGTCAGCGCGGACGTGCAGGCAG	14
R39	WT	V231A	CTGCGTGTGGCGCGCGTTTGCCAGCGGGTTT	15
			AAACCCGCTGGCAAACGCCGCGCCAACACGCAG	16
R55	WT	T336S	TTACCGTTAGTCTGCAGCATGTATGCGAGCAGT	17
			ACTGCTCGCATACATGCTGCAGACTAACGGTAA	18
R56	WT	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	19
			TTCACTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	20
R59	WT	A339G	GTCTGCACGATGTATGGCAGCAGTGAATGCTAC	21
			GTAGCATTCACTGCTGCCATACATCGTGCAGAC	22
R61	WT	S340A	TGCACGATGTATGCGCGGAGTGAATGCTACTTT	23
			AAAGTAGCATTCACTCGCCGCATACATCGTGCA	24
R68	WT	Y344G	GCGAGCAGTGAATGCGGCTTTGGAGTGAATCTC	25
			GAGATTCACTCCAAAGCCGATTCACTGCTCGC	26
R69	WT	Y344A	GCGAGCAGTGAATGCGCGTTTGAGTGAATCTC	27
			GAGATTCACTCCAAACGCGCATTCACTGCTCGC	28
R70	WT	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTGTTGGAGTGAATCTC	29
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	30
R78	WT	S455T	GTTCTCTCCATTGACACCGACAAGACGGATGAA	31
			TTCATCCGTCTTGTGCGGTGCAATGGAGAGAAC	32
R1002	WT	T122S/ I123T	CGCAAACCTTATGCCGAGCACCGAGGAAGAACTGGAT	33
			ATCCAGTTCTTCTCGGTGCTCGGCATAAGTTTGGC	34
R1005	WT	R117P	ACCTCAGGCGGAGAACCAGAACTTATGCCGACG	35
			CGTCGGCATAAGTTTCGGTTCTCCGCTGAGGT	36
	R117P	Q533R	AATAGCGTGTATCGCCGTGGCCGTGTGTCCGAC	37
			GTCGGACACACGCCACGGCGATACACGCTATT	38

[0452] [表2-2]

[0453] 表2-2.在变异型AtGH3-6的制作中使用的部位特异性变异导入用引物(2)

[0454]

变异体编号	模板	导入的 变异点	碱基序列(5'→3')	序列编号
4	WT	C576A	TACAAAACACCAAGAGCGGTCAAATTCGCGCCG	39
			CGGCGCGAATTTGACCGCTCTGGTGTGTTGTA	40
7	R32	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	41
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	42
8	R39	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	43
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	44
9	R56	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	45
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	46
10	R70	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	47
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	48
11	R39	V174A	CTGCCTGCACGTCCCGCGCTGACCTCGTATTAC	49
			GTAATACGAGGTCAGCGCGGACGTGCAGGCAG	50
12	R32	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	51
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	52
13	R32	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTGGAGTGAATCTC	53
			GAGATTCCTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	54
14	R39	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	55
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	56
15	R39	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTGGAGTGAATCTC	57
			GAGATTCCTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	58
16	R56	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTGGAGTGAATCTC	59
			GAGATTCCTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	60
17	R1005	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	61
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	62
18	R1005	V174A	CTGCCTGCACGTCCCGCGCTGACCTCGTATTAC	63
			GTAATACGAGGTCAGCGCGGACGTGCAGGCAG	64
19	R1005	V231A	CTGCGTGTTGGCGCGGCGTTTGCCAGCGGGTTT	65
			AAACCCGCTGGCAAACGCCGCGCAACACGCAG	66
20	R1005	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	67
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	68
21	R1005	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTGGAGTGAATCTC	69
			GAGATTCCTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	70
24	WT	Y344I	GAATGCATTTTTGGAGTGAATCTCAGG	71
			TCCAAAATGCATTCACTGCTCGCATA	72

[0455] [表2-3]

[0456] 表2-3. 在变异型AtGH3-6的制作中使用的部位特异性变异导入用引物(3)

[0457]

变异体编号	模板	导入的变异点	碱基序列(5'→3')	序列编号
30	18	V231A	CTGCGTGTGGCGCGGCGTTTGCCAGCGGGTTT	73
			AAACCCGCTGGCAAACGCCGCCAACACGCAG	74
32	18	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTGGAGTGAATCTC	75
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	76
34	19	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTGGAGTGAATCTC	77
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	78
37	31	G379D	GTCCATCGTAACTCAGACGTAAGTACGAGCATT	79
			AATGCTGCTAGTTACGTCTGAGTTACGATGGAC	80
	31 + G379D	R350T	TTTGGAGTGAATCTCAGCCACTATGCAAACCA	81
			TGGTTTGCATAGTGGCGTGAGATTCACTCCAAA	82
38	31	V311A	ACCAAATATGTTGACGCGATTGTCAGTGGCACC	83
			GGTGCCAGTGACAATCGCGTCAACATATTTGGT	84
39	31	L137I	CTGCTGTACTCACTCATTATGCCCGTCATGGAT	85
			ATCCATGACGGGCATAATGAGTGAGTACAGCAG	86
40	31	Q200E	TATACCAGTCCGAATGAGACGATCTTGTGTCC	87
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCCGACTGGTATA	88
42	31	I123T	AAACTTATGCCGACGACCGAGGAAGAAGTGGAT	89
			ATCCAGTTCTTCCTCGGTCGTCCGCATAAGTTT	90
43	31	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	91
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	92
44	40	I123T	AAACTTATGCCGACGACCGAGGAAGAAGTGGAT	93
			ATCCAGTTCTTCCTCGGTCGTCCGCATAAGTTT	94
45	40	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	95
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	96
46	42	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	97
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	98
48	37	Q200E	TATACCAGTCCGAATGAGACGATCTTGTGTCC	99
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCCGACTGGTATA	100
49	37	I123T	AAACTTATGCCGACGACCGAGGAAGAAGTGGAT	101
			ATCCAGTTCTTCCTCGGTCGTCCGCATAAGTTT	102
50	37	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	103
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	104
54	49	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	105
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	106
55	49	Q200E	TATACCAGTCCGAATGAGACGATCTTGTGTCC	107
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCCGACTGGTATA	108
56	49	C576A	TACAAAACACCAAGAGCGGTCAAATTCGCGCCG	109
			CGGCGCGAATTGACCGCTCTTGGTGTGTTTGT	110

[0458] 用DpnI处理得到的PCR产物后,用该反应液转化E.coli JM109,从卡那霉素抗性株中提取目标质粒。将该质粒作为变异型AtGH3-6表达质粒。

[0459] (2) 以pET-28a-AtGH3-6 (PCT/JP2019/007681) 为模板,对AtGH3-6导入了变异。此外,对于数种变异型AtGH3-6,以上述或下述得到的变异型AtGH3-6表达质粒为模板,进一步导入了变异。变异导入使用PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio) 通过以下的条件进行。

[0460] 1cycle 98°C, 30sec

[0461] 30cycles 98°C, 10sec

[0462] 60°C, 15sec

[0463] 68°C, 7.5min

[0464] 1cycle 72℃,5min

[0465] 4℃,hold

[0466] 使用的引物如下所示。

[0467] [表3]

[0468] 表3.在变异型AtGH3-6的制作中使用的部位特异性变异导入用引物

[0469]

变异体编号	模板	导入的变异点	碱基序列(5'→3')	序列编号
26	18	S161P	TTCCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	111
			AGGGGTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	112
27	19	S161P	TTCCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	113
			AGGGGTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	114
29	21	S161P	TTCCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	115
			AGGGGTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	116
31	18	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	117
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	118
33	19	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	119
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	120
41	31	K388N	TAGCTTGCCTAATGCACTGACCG	121
			CGGTCAGTGCATTAGGCAAGCTA	122
47	31	C576A	TACAAAACACCAAGAGCGGTCAAATTCGCGCCG	123
			CGGCGCGAATTTGACCGCTCTTGGTGTGTTGTA	124
57	49	K388N	TAGCTTGCCTAATGCACTGACCG	125
			CGGTCAGTGCATTAGGCAAGCTA	126
58	56	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	127
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	128
59	56	Q200E	TATACCAGTCCGAATGAGACGATCTTGTGTTCC	129
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCGGACTGGTATA	130

[0470] 以DpnI处理得到的PCR产物后,用该反应液转化E.coli JM109,从卡那霉素抗性株中提取目标质粒。将该质粒作为变异型AtGH3-6表达质粒。对序列进行确认,其结果,变异体编号26中除了导入的变异点以外,还导入了M337A的变异。

[0471] (3) 以pET-28a-变异型AtGH3-6(变异体编号56)为模板,对AtGH3-6进一步导入了变异。PCR使用PrimeSTAR Max DNA Polymerase(Takara Bio)通过以下的条件进行。

[0472] 1cycle 98℃,30sec

[0473] 30cycles 98℃,10sec

[0474] 60℃,15sec

[0475] 72℃,5sec/kb

[0476] 1cycle 72℃,5min

[0477] 4℃,hold

[0478] 使用的引物如下所示。

[0479] [表4]

[0480] 表4.在变异型AtGH3-6的制作中使用的部位特异性变异导入用引物

[0481]

变异体编号	导入的变异点	PCR	碱基序列(5'→3')	序列编号
60	K388N	1	CGACGACCGAGGAAGAACTGGATCGTCG	131
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	132
		2	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	133
			CTTCCTCGGTCGTCGGCATAAGTTTGCG	134
61	N101S/Q200E	1	GTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTTCTCAC	135
			AGATCGTCTCATTTCGGACTGGTATAGTT	136
		2	CGAATGAGACGATCTTGTGTTCCGACTC	137
			TTATCGGGCTCGAACACAGAACCTGCGA	138
62	N101S/K388N	1	GTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTTCTCAC	139
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	140
		2	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	141
			TTATCGGGCTCGAACACAGAACCTGCGA	142
63	Q200E/K388N	1	CGAATGAGACGATCTTGTGTTCCGACTC	143
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	144
		2	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	145
			AGATCGTCTCATTTCGGACTGGTATAGTT	146
64	N101S/Q200E/K388N	1	GTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTTCTCAC	147
			AGATCGTCTCATTTCGGACTGGTATAGTT	148
		2	CGAATGAGACGATCTTGTGTTCCGACTC	149
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	150
		3	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	151
			TTATCGGGCTCGAACACAGAACCTGCGA	152

[0482] 将得到的PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离后,从琼脂糖凝胶中提取目标尺寸的DNA,使用In-Fusion(注册商标)HD Cloning Kit(Takara Bio)进行了In-Fusion反应。用该反应液转化E.coli JM109,从卡那霉素抗性株中提取目标质粒。将该质粒作为变异型AtGH3-6表达质粒。

[0483] (4)从Eurofins Genomics公司购入了pET-28a(+)的多克隆位点内的NdeI和XhoI位点中插入有变异型AtGH3-6(序列编号185和186)的基因的质粒,pET-28a-变异型AtGH3-6(变异体编号36)。

[0484] 实施例2:基于随机变异导入的变异型AtGH3-6表达质粒的构建

[0485] 以pET-28a-AtGH3-6(PCT/JP2019/007681)为模板,对AtGH3-6导入了变异。变异导入使用Gene Morph II Random Mutagenesis Kit(Agilent Technologies)通过以下的条件进行。

[0486] 1cycle 95°C,2min

[0487] 30cycles 95°C,30sec

[0488] 60°C,30sec

[0489] 72°C,1.2min

[0490] 1cycle 72°C,10min

[0491] 4°C,hold

[0492] 使用的引物如下所示。

[0493] [表5]

[0494] 表5. 在变异型AtGH3-6的制作中使用的随机变异导入用引物

[0495]	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
	TAATACGACTCACTATAGGG	153
	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	154

[0496] 用NdeI、XhoI制限酶处理得到的约2.1kb的DNA片段,将其与同样以NdeI、XhoI处理了的pET-28a-AtGH3-6的载体侧DNA片段进行连接。用该连接溶液对E.coli JM109进行转化,从卡那霉素抗性株中提取质粒,以此作为变异型AtGH3-6表达质粒文库。将得到的质粒文库导入E.coli BL21 (DE3) 中,从卡那霉素抗性株中得到具有变异型AtGH3-6表达质粒的转化体。从得到的转化体中提取质粒,对AtGH3-6的序列进行确认,其结果,确认到导入了以下的氨基酸置换。

[0497] [表6]

[0498] 表6. 通过随机变异导入而得到的变异型AtGH3-6的变异点

[0499]	变异体编号	变异点
	R1_3-F11	R350T/G379D
	R1_5-H9	V311A
	R3_5-C8	L137I
	R4_1-A6	Q200E
	R5_5-D3	K388N
	R5_5-E7	I123T
	R6_2-H7	C335S/L390P
	R6_5-B7	V140I
	R7_2-C2	N101S
	R9_3-D4	E483D

[0500] 实施例3: 变异型AtGH3-6的纯化

[0501] 将变异型AtGH3-6表达质粒分别导入E.coli BL21 (DE3) 中,从卡那霉素抗性株中得到具有该质粒的转化体。将该菌株接种至包含50mg/L的卡那霉素的LB培养基50mL中,使用坂口烧瓶在37℃下进行了振荡培养。当OD₆₁₀到达0.6时添加1mM IPTG,在15℃下进行了24小时的振荡培养。培养结束后,通过离心分离从20mL的培养液中收集菌体,将其悬浮于4mL的xTractor (商标) Buffer (Takara Bio) 中。添加xTractor (商标) Buffer Kit (Takara Bio) 附带的5units/μL DNase I溶液8μL、100×溶菌酶溶液40μL,倒转搅拌后,在室温下静置20分钟。将通过离心分离得到的上清用于TALON (注册商标) Spin Column (Takara Bio),根据制造商的说明书进行纯化。平衡化缓冲液使用20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl、10mM咪唑,溶出缓冲液使用20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl、150mM咪唑。回收得到的溶出液,使用Am icon Ultra-0.5 10kDa (Merck) 进行浓缩,在20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM DTT中进行缓冲液交换,以此作为纯化酶溶液。对于得到的纯化酶溶液的蛋白质浓度,使用蛋白质测定CBB溶液 (5倍浓缩) (Nacalai Tesque),以Quick Start BSA Standard Set (Bio-rad) 作为标准品进行了测定。

[0502] 实施例4: 变异型AtGH3-6针对各氨基酸基质的活性测定

[0503] 将50mM Tris-HCl、5mM L-谷氨酸或L-天冬氨酸、5mM月桂酸钠、10mM ATP、10mM MgCl₂、1mM DTT、50μg/mL纯化酶、pH8.0、0.2mL的反应液在25℃下孵育24小时。反应结束后，添加0.8mL的反应停止液(1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇)，将离心后的上清用于UPLC-MS分析。用选择性离子检测(SIR)法提出Na-月桂酰基-L-谷氨酸(C12-L-Glu)或Na-月桂酰基-L-天冬氨酸(C12-L-Asp)的分子量的信号并确认峰面积值，使用标准品的校准曲线对生成量进行了定量。

[0504] UPLC-MS分析条件如下所示。

[0505] (分析条件1)

[0506] 装置:ACQUITY UPLC (Waters)

[0507] 柱:ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm 2.1×50mm柱 (Waters)

[0508] 移动相A:0.1%甲酸

[0509] 移动相B:乙腈

[0510] 梯度:

[0511] A:B 60:40~20:80梯度1.2min

[0512] A:B 20:80~60:40梯度0.01min

[0513] A:B 60:40等度0.29min

[0514] 流速:0.6mL/min

[0515] 注入量:2μL

[0516] 柱温度:40℃

[0517] 离子化法:ESI-负

[0518] SIR:C12-L-Glu m/z328[M-H] -

[0519] C12-L-Asp m/z314[M-H] -

[0520] (分析条件2)

[0521] 装置:ACQUITY UPLC (Waters)

[0522] 柱:ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm 2.1×100mm柱 (Waters)

[0523] 移动相A:0.1%甲酸

[0524] 移动相B:乙腈

[0525] 梯度:

[0526] A:B 60:40~20:80梯度2.4min

[0527] A:B 20:80~60:40梯度0.1min

[0528] A:B 60:40等度0.5min

[0529] 流速:0.6mL/min

[0530] 注入量:2μL

[0531] 柱温度:40℃

[0532] 离子化法:ESI-负

[0533] SIR:C12-L-Glu m/z328[M-H] -

[0534] C12-L-Asp m/z314[M-H] -

[0535] 将UPLC-MS分析的结果与野生型AtGH3-6比较,确认到了在变异型At GH3-6中,Na-月桂酰基-L-谷氨酸(C12-L-Glu)的生成量、和/或针对L-谷氨酸的基质特异性(C12-L-Glu

的生成量/C12-L-Asp的生成量)得到了提高。表中的WT表示野生型AtGH3-6。

[0536] [表7-1]

[0537] 表7-1. 针对作为基质的L-谷氨酸和L-天冬氨酸的、各变异型AtGH3-6的N-酰基氨基酸合成活性(1)

编号	变异	生成物(mM)		基质特异性
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	C12-L-Glu/C12-L-Asp
WT	-	0.76	0.06	0.08
R18	Y134F	0.85	0.10	0.11
R20	Y134V	0.96	0.08	0.08
R30	S161P	0.75	0.14	0.18
R32	V174A	0.66	0.11	0.16
WT	-	0.93	0.07	0.08
R55	T336S	1.05	0.09	0.08
R56	M337G	1.13	0.15	0.14
R59	A339G	0.98	0.13	0.14
R61	S340A	0.78	0.10	0.13
WT	-	1.41	0.09	0.06
R39	V231A	0.98	0.18	0.19
R68	Y344G	1.54	0.11	0.07
R69	Y344A	1.74	0.12	0.07
R70	Y344V	1.35	0.19	0.14
R78	S455T	1.25	0.14	0.11
R1002	T122S/I123T	1.81	0.10	0.05
R1005	R117P/Q533R	0.08	0.14	1.74
WT	-	1.65	0.09	0.05
R1_3-F11	R350T/G379D	2.16	0.16	0.08
R1_5-H9	V311A	1.82	0.25	0.14
R3_5-C8	L137I	2.84	0.19	0.07
WT	-	0.55	0.03	0.05
R4_1-A6	Q200E	0.84	0.07	0.09
R5_5-D3	K388N	0.71	0.08	0.11
R5_5-E7	I123T	1.16	0.12	0.10
R7_2-C2	N101S	0.72	0.05	0.07
WT	-	0.83	0.07	0.09
R6_2-H7	C335S/L390P	0.88	0.11	0.13
R6_5-B7	V140I	1.00	0.10	0.10
R9_3-D4	E483D	1.00	0.09	0.09
WT	-	1.92	0.18	0.09
4	C576A	1.99	0.38	0.19
WT	-	2.29	0.15	0.07
7	S161P/V174A	1.67	0.64	0.38
8	S161P/V231A	1.69	0.69	0.41
10	S161P/Y344V	2.52	1.05	0.42
11	V174A/V231A	1.49	0.70	0.47
15	V231A/Y344V	1.63	0.35	0.21
18	R117P/V174A/Q533R	0.23	0.66	2.85
19	R117P/V231A/Q533R	0.38	1.43	3.74
20	R117P/M337G/Q533R	0.13	0.53	4.24
21	R117P/Y344V/Q533R	0.32	0.84	2.65
24	Y344I	2.14	0.17	0.08

[0539] [表7-2]

[0540] 表7-2. 针对作为基质的L-谷氨酸和L-天冬氨酸的、各变异型AtGH3-6的N-酰基氨基酸合成活性(2)

[0541]

编号	变异	生成物(mM)		基质特异性
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	C12-L-Glu/C12-L-Asp
WT	-	2.37	0.34	0.14
9	S161P/M337G	2.95	2.11	0.72
12	V174A/M337G	2.58	1.62	0.63
13	V174A/Y344V	2.40	0.68	0.28
14	V231A/M337G	1.92	1.12	0.58
17	R117P/S161P/Q533R	0.32	1.07	3.32
WT	-	2.11	0.23	0.11
16	M337G/Y344V	1.94	0.80	0.41
WT	-	1.85	0.08	0.04
30	R117P/V174A/V231A/Q533R	0.30	1.26	4.19
32	R117P/V174A/Y344V/Q533R	0.12	0.46	3.76
WT	-	1.78	0.10	0.06
34	R117P/V231A/Y344V/Q533R	0.08	0.37	4.63
WT	-	2.28	0.24	0.10
26	R117P/S161P/V174A/M337A/Q533R	0.84	1.79	2.12
29	R117P/S161P/Y344V/Q533R	0.59	1.27	2.16
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	1.22	2.20	1.81
33	R117P/V231A/M337G/Q533R	0.40	1.61	3.98
WT	-	2.20	0.26	0.12
27	R117P/S161P/V231A/Q533R	0.26	0.88	3.41
36	R117P/S161P/V174A/V231A/M337G/ Y344V/Q533R	0.51	1.04	2.03
WT	-	2.02	0.15	0.08
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.64	2.14	3.34
38	R117P/V174A/V311A/M337G/Q533R	0.70	2.47	3.55
39	R117P/L137I/V174A/M337G/Q533R	0.66	2.43	3.66
40	R117P/V174A/Q200E/M337G/Q533R	0.90	2.88	3.19
WT	-	1.47	0.15	0.10
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.55	1.72	3.11
41	R117P/V174A/M337G/K388N/Q533R	0.91	2.26	2.47
46	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ Q533R	0.93	2.30	2.46
47	R117P/V174A/M337G/Q533R/C576A	0.99	2.49	2.51

[0542] [表7-3]

[0543] 表7-3. 针对作为基质的L-谷氨酸和L-天冬氨酸的、各变异型AtGH3-6的N-酰基氨基酸合成活性(3)

编号	变异	生成物(mM)		基质特异性
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	C12-L-Glu/C12-L-Asp
WT	—	2.02	0.07	0.03
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.68	1.26	1.86
37	R117P/V174A/M337G/R350T/G379D/ Q533R	1.21	1.84	1.51
42	R117P/I123T/V174A/M337G/Q533R	1.43	2.14	1.50
43	N101S/R117P/V174A/M337G/Q533R	0.95	1.72	1.82
44	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/ Q533R	1.53	2.07	1.35
45	N101S/R117P/V174A/Q200E/M337G/ Q533R	1.07	1.72	1.60
48	R117P/V174A/Q200E/M337G/R350T/ G379D/Q533R	1.21	2.00	1.65
[0544] 49	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R	1.80	2.38	1.32
50	N101S/R117P/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R	1.36	2.25	1.66
WT	—	2.00	0.24	0.12
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.83	2.01	2.43
49	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R	1.73	3.07	1.77
54	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ R350T/G379D/Q533R	1.41	3.01	2.13
55	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/ R350T/G379D/Q533R	1.38	2.83	2.05
56	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R/C576A	2.23	3.28	1.47
57	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/K388N/Q533R	1.81	3.00	1.65

[0545] [表7-4]

[0546] 表7-4. 针对作为基质的L-谷氨酸和L-天冬氨酸的、各变异型AtGH3-6的N-酰基氨基酸合成活性(4)

编号	变异	生成物(mM)		基质特异性
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	C12-L-Glu/C12-L-Asp
WT	-	1.66	0.10	0.06
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.81	1.60	1.98
49	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R	1.89	2.61	1.38
56	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R/C576A	2.53	3.24	1.28
58	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ R350T/G379D/Q533R/C576A	2.12	2.92	1.38
[0547] 59	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/ R350T/G379D/Q533R/C576A	2.31	3.05	1.32
60	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/K388N/Q533R/C576A	2.38	3.26	1.37
61	N101S/R117P/I123T/V174A/Q200E/ M337G/R350T/G379D/Q533R/C576A	2.26	3.12	1.38
62	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ R350T/G379D/K388N/Q533R/C576A	2.48	3.11	1.25
63	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/ R350T/G379D/K388N/Q533R/C576A	2.44	3.23	1.33
64	N101S/R117P/I123T/V174A/Q200E/ M337G/R350T/G379D/K388N/Q533R/ C576A	2.77	3.25	1.17

[0548] 实施例5:变异型AtGH3-6针对各脂肪酸基质的活性测定

[0549] 将50mM Tris-HCl、5mM L-谷氨酸、5mM脂肪酸钠(或脂肪酸)、10mM ATP、10mM MgCl₂、1mM DTT、50μg/mL纯化酶、pH8.0、0.2mL的反应液在25℃下孵育24小时。就向酶反应中添加的脂肪酸钠(或脂肪酸)而言,调制溶解在20% (v/v) Triton X-100中的25mM的溶液,以终浓度为5mM的方式添加至反应液中。反应结束后,添加0.8mL的反应停止液(1.4% (w/v) 磷酸,75% (v/v) 甲醇),将离心后的上清用于UPLC-MS分析。以SIR法提出预测的Na-酰基-L-谷氨酸的分子量的信号并确认峰面积值,使用标准品的校准曲线对生成量进行了定量。C6-L-Glu和C8-L-Glu的定量使用C8-L-Glu作为标准品,C10-L-Glu的定量使用C10-L-Glu作为标准品,具有C12以上的碳链长的酰基的Na-酰基-L-Glu的定量使用C12-L-Glu作为标准品。脂肪酸钠(或脂肪酸)使用了己酸钠、辛酸钠、癸酸钠、月桂酸钠、肉豆蔻酸钠、棕榈酸钠、顺式-5-十二烯酸、顺式-9-十四烯酸或顺式-9-十六烯酸。碳原子数为x个的饱和脂肪酸以C_x表示,碳原子数为x个且碳-碳间的双键为y个的不饱和脂肪酸以C_x:y表示。

[0550] UPLC-MS分析条件如下所示。

[0551] 装置:ACQUITY UPLC (Waters)

[0552] 柱:ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm 2.1×50mm柱 (Waters)

[0553] 移动相A:0.1%甲酸

[0554] 移动相B:乙腈

[0555] 梯度:

[0556] A:B 90:10~0:100 梯度1.8min

[0557] A:B 0:100 等度0.6min

[0558] A:B 0:100~90:10 梯度0.1min

[0559] A:B 90:10 等度0.5min

[0560] 流速:0.6mL/min

[0561] 注入量:2 μ L

[0562] 柱温度:40 $^{\circ}$ C

[0563] 离子化法:ESI-负

[0564] [表8]

[0565] 表8.以SIR法检测出的MS离子

Na-acyl-L-Glu	m/z [M-H] ⁻
C6-L-Glu	244
C8-L-Glu	272
C10-L-Glu	300
C12-L-Glu	328
C12:1-L-Glu	326
C14-L-Glu	356
C14:1-L-Glu	354
C16-L-Glu	384
C16:1-L-Glu	382

[0567] 将UPLC-MS分析的结果与野生型AtGH3-6比较,确认到了在变异型AtGH3-6中,具有碳链数8以上的酰基的各种Na-酰基-L-谷氨酸的生成量得到了提高。表中的WT表示野生型AtGH3-6。

[0568] [表9]

[0569] 表9.各变异型AtGH3-6的针对各脂肪酸基质的N-酰基氨基酸合成活性

变异体 编号	变异点	Nα-acyl-L-Glu (mM)								
		C6	C8	C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1
WT	-	1.14	0.30	0.35	0.50	1.03	0.64	0.17	0.07	2.21
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.14	1.37	2.72	3.11	3.12	1.67	1.70	0.24	4.38
49	R117P/I123T/V174A/M337G /R350T/G379D/Q533R	0.22	1.47	3.12	3.12	3.61	1.52	1.95	0.12	4.01
56	R117P/I123T/V174A/M337G /R350T/G379D/Q533R/C576 A	0.35	1.50	2.89	3.17	3.25	2.62	2.14	0.28	4.97
61	N101S/R117P/I123T/V174A /Q200E/M337G/R350T/G379 D/Q533R/C576A	0.41	1.62	2.44	3.80	3.25	2.50	1.92	0.33	3.97

[0571] 实施例6:脂肪酸生产株(E.coli)的构建

[0572] 作为从葡萄糖等碳源出发生产脂肪酸的菌株,通过以下的步骤构建了acyl-CoA合成酶(fadD)缺失/acyl-ACP硫酯酶增强E.coli株(E.coli Δ fadD/pMW118-Ptac-UcTEopt)。

[0573] (1)UcTE(加州月桂来源的acyl-ACP硫酯酶)基因的合成

[0574] 作为与中链脂肪酸合成相关的来源于植物的酶,已知有acyl-ACP硫酯酶。该酶可

以用于在细菌的脂肪酸合成中改变链长。从以前开始,在油料种子中优先生成月桂酸的加州月桂(California bay (*Umbellularia californica*))来源的中链酰基-ACP硫酯酶(medium-chain acyl-ACP thioesterase) (UcTE, GenBank:M94159) 相关的研究就一直在进行,并被用于E.coli中的月桂酸生产(Voelker and Davies, J. of Bacteriol. 1994; 176 (23): 7320-7327)。已知转运肽存在于UcTE的N末端区域(序列编号187),但已表明转运肽对于UcTE的酶活性而言并非必须的(Feng et al. ACS Chem Biol. 2017; 12 (11): 2830-2836)。因此,在UcTE基因的表达质粒的构建中,使用了不包含转运肽的切断型基因(即,编码以下蛋白质的基因,所述蛋白质包含对序列编号3的氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基赋予了起始蛋氨酸的氨基酸序列)。为用于在E.coli中的表达而进行了密码子最优化的切断型UcTE基因的序列如序列编号4所示。就为用于在E.coli中的表达而进行了密码子最优化的UcTE的基因而言,将基因合成委托给Eurofins Genomics,购入了pEX-K4J1载体内插入有包含该基因的DNA片段的质粒(pEX-K4J1-UcTEopt)。

[0575] (2) pMW118-Sce-Km质粒的构建

[0576] 为了得到能够在E.coli和P.ananatis这两种中使用的质粒,构建了表达载体pMW118-Sce-Km。该质粒包含kan基因(卡那霉素抗性标记)和bla基因(氨苄西林抗性标记)。以pMW118-placUV5-lacI质粒(Skorokhodova et al., Biotechnologia (Russian). 2004; 5:3-21)为基础,构建了pMW118-Sce-Km质粒(图1)。以pUC-4K (GenBank/EMBL accession number X06404, Pharmacia)为模板,对包含编码氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferase)的kan基因(卡那霉素抗性标记)和其RBS的DNA片段进行了PCR扩增(Mashko et al., Biotekhnologiya. 2001; 5:3-20)。使用的引物如下所示。

[0577] [表10]

[0578] 表10. 包含Kan基因和其RBS的DNA片段的扩增用引物

引物编号	碱基序列(5'→3')	序列编号
[0579] P1	TCTGATCTAGATAGGGATAACAGGGTAATCAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAA	155
P2	GGAAAGGATCCGCGGCCGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTC	156

[0580] 将得到的DNA片段通过基于T4 DNA连接酶(Thermo Fisher Scientific)的连接反应,插入pMW118-placUV5-lacI质粒的BamHI和XbaI位点中。用该连接反应液对E.coli TG1进行转化,使其在包含50mg/L的卡那霉素的LB琼脂培养基上繁殖后,从卡那霉素抗性株中提取pMW118-Sce-Km。质粒的结构通过测序解析而确认(图1)。

[0581] (3) pMW118-Ptac-UcTEopt质粒的构建

[0582] 以pEX-K4J1-UcTEopt质粒为模板,用PCR扩增了包含与T7噬菌体来源的RBS(RBST7)融合而添加有制限酶位点的切断型UcTEopt基因的DNA片段。使用的引物如下所示。

[0583] [表11]

[0584] 表11. 包含RBST7和切断型UcTEopt基因的DNA片段的扩增用引物

引物编号	碱基序列(5'→3')	序列编号
[0585] P3	TTTTTCTAGAAATAATTTTGTTAACCTTAAGAAGGAGATATACCATGCTAGAGTGGAAACCGAAACCG	157
P4	TTTTTGGATCCTCGAGTTAAACGCGAGGTTCCGCAG	158

[0586] 以导入有P_{tac}启动子的染色体DNA (Katashkina et al. Molecular Biology. 2005;39 (5) :719-726) 为模板,用PCR扩增了包含添加有制限酶位点的P_{tac}启动子的DNA片段。使用的引物如下所示。

[0587] [表12]

[0588] 表12. 包含P_{tac}启动子的DNA片段的扩增用引物

引物编号	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
P5	TTTTTAGATCTCCCTGTTGACAATTAATCATCGG	159
P6	CTGTTTCTAGATCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC	160

[0590] 将得到的包含RBST7和切断型UcTEopt基因的DNA片段、包含P_{tac}启动子的DNA片段用XbaI进行处理,使用T4 DNA连接酶(Thermo Fisher Scientific)使这两种DNA片段连接。以该连接反应液为模板,用PCR扩增了包含添加有BglII和EcoRI位点的P_{tac}-RBST7-UcTEopt (序列编号6) 的DNA片段。使用的引物如下所示。

[0591] [表13]

[0592] 表13. 包含P_{tac}-RBST7-UcTEopt的DNA片段的扩增用引物

引物编号	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
P5	TTTTTAGATCTCCCTGTTGACAATTAATCATCGG	161
P7	TTTTTGAATTCGAGCTCGGTACCAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGA GATATACC	162

[0594] 将得到的DNA片段通过基于T4 DNA连接酶(Thermo Fisher Scientific)的连接反应而插入pMW118-Sce-Km的BglII和EcoRI位点中。用该连接反应液转化E. coli TG1,在包含50mg/L的卡那霉素的LB琼脂培养基上使其繁殖后,从卡那霉素抗性株中提取了pMW118-P_{tac}-UcTEopt质粒。质粒的结构通过测序解析进行了确认(图2)。

[0595] (4) E. coli Δ fadD/pMW118-P_{tac}-UcTEopt (脂肪酸生产株) 的构建

[0596] 在E. coli的脂肪酸生产株的构建中,将E. coli K-12MG1655 (F-lambda-ilvG-rfb-50rph-ATCC47076) 作为基本株而使用。为了阻断脂肪酸分解通路,进行了fadD基因的框内缺失。使用包含添加有与fadD基因相同的40bp的区域的λattL-kan-λattR的PCR扩增DNA片段,以与已报道的方法 (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009;10:34) 相同的方式,进行了基于λ-Red法的缺失。电穿孔后,使菌株在包含50mg/L的卡那霉素的LB琼脂培养基上繁殖。就为了用λattL-kan-λattR置换fadD基因而使用的DNA片段而言,以导入有λattL-kan-λattR组件的基因组DNA (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009;10:34) 为模板,进行了PCR扩增。使用的引物如下所示。

[0597] [表14]

[0598] 表14. 包含λattL-kan-λattR的DNA片段 (fadD基因缺失用DNA片段) 的扩增用引物

引物编号	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
P9	TGAGCTGACGGCGGCAAAAAGTCACCACTGACTCTTCGGTTGAAGCCTGC TTTTTATACTAAGTTGG	163
P10	CAACCTGCGTTTGTGAATATGGGGGAGGTAATGACCTTCCCGCTCAAGTT AGTATAAAAAGCTGAAC	164

[0600] 得到的E. coli MG1655 Δ fadD::λattL-kan-λattR通过PCR进行了确认。使用的引物如下所示。

[0601] [表15]

[0602] 表15.fadD基因缺失确认用引物

[0603]	引物编号	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
	P11	TGCGATGACGACGAACACGC	165
	P12	GATTAACCGGCGTCTGACGAC	166

[0604] 从得到的菌株中,使用已报道的依赖噬菌体 λ Int/Xis的手法 (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009;10:34) 除去卡那霉素抗性标记 (kan基因)。通过PCR确认标记从染色体被除去。使用的引物如下所示。

[0605] [表16]

[0606] 表16. 卡那霉素抗性标记 (kan基因) 除去确认用引物

[0607]	引物编号	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
	P11	TGCGATGACGACGAACACGC	167
	P12	GATTAACCGGCGTCTGACGAC	168

[0608] 通过电穿孔法用pMW118-Ptac-UcTEopt质粒转化得到的菌株 (E.coli MG1655 Δ fadD:: λ attB),取得了E.coli Δ fadD/pMW118-Ptac-UcTEopt作为脂肪酸生产株。

[0609] 实施例7:脂肪酸生产株 (P.ananatis) 的构建

[0610] 作为从葡萄糖等碳源出发生产脂肪酸的菌株,通过以下的步骤构建了fadD缺失/gcd缺失/acyl-ACP硫酯酶增强P.ananatis株 (P.ananatis SC17 (0) Δ fadD Δ gcd/pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt)。

[0611] (1) pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt质粒的构建

[0612] 以实施例6所述的pMW118-Ptac-UcTEopt质粒为模板,用PCR扩增了包含RBST7和切断型UcTEopt基因的DNA片段。使用的引物如下所示。

[0613] [表17]

[0614] 表17. 包含RBST7和切断型UcTEopt基因的DNA片段的扩增用引物

[0615]	引物编号	碱基序列 (5' → 3')	序列编号
	P4	TTTTTGATCCTCGAGTTAAACGCGAGGTTCCGCAG	169
	P8	TTTTTGAGCTCGAATTCTTAAACGCGAGGTTCCGCAG	170

[0616] 将得到的DNA片段通过基于T4 DNA连接酶 (Thermo Fisher Scientific) 的连接反应而插入pMW118-Sce-Km质粒的EcoRI和BamHI位点中。用该连接反应液转化E.coli TG1,在包含50mg/L的卡那霉素的LB琼脂培养基上使其繁殖后,从卡那霉素抗性株中提取了pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt质粒。质粒的结构通过测序解析进行了确认 (图3)。

[0617] (2) P.ananatis SC17 (0) Δ fadD Δ gcd/pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt的构建

[0618] 在P.ananatis的脂肪酸生产株的构建中,使用P.ananatis SC17 (0) (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009;10:34) 作为基本株。为了阻断脂肪酸分解通路,进行了fadD基因 (PAJ-1453) 的框内缺失。使用包含添加有与fadD基因相同的40bp的区域的 λ attL-kan- λ attR的PCR扩增DNA片段,以与已报道的方法 (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009;10:34) 同样的方法,进行了基于 λ -Red法的缺失。电穿孔后,使菌株在包含50mg/L的卡那霉素的LB琼脂培养基上繁殖。就为了用 λ attL-kan- λ attR置换fadD基因而使用的DNA片段而言,以

导入有 λ attL-kan- λ attR组件的基因组DNA (Katashkina et al., BMCMol Biol.2009;10:34) 为模板,进行了PCR扩增。使用的引物如下所示。

[0619] [表18]

[0620] 表18. 包含 λ attL-kan- λ attR的DNA片段 (fadD基因缺失用DNA片段) 的扩增用引物

引物编号	碱基序列(5'→3')	序列编号
P13	CTGACGACGACAGTGATCGAGCAGCTCTTCTTTGGTCAGCTGAAGCCTGC TTTTTTATACTAAGTTGG	171
P14	CTCTGGTTGATCTGTTTGAGCAGGCCGTTTCCCGTTACGCCGCTCAAGTT AGTATAAAAAAGCTGAAC	172

[0622] 得到的P.ananatis SC17 (0) Δ fadD:: λ attL-kan- λ attR通过PCR进行了确认。使用的引物如下所示。

[0623] [表19]

[0624] 表19.fadD基因缺失确认用引物

引物编号	碱基序列(5'→3')	序列编号
P15	CAAATGCGATTGTCGAGGCG	173
P16	CCGGCGTTCAACCTGAATCC	174

[0626] 从得到的菌株中,通过已报道的依赖噬菌体 λ Int/Xis的手法 (Katashkina et al., BMCMol Biol.2009;10:34),除去了卡那霉素抗性标记 (kan基因)。通过PCR确认标记从染色体被除去。使用的引物如下所示。

[0627] [表20]

[0628] 表20. 卡那霉素抗性标记 (kan基因) 除去确认用引物

引物编号	碱基序列(5'→3')	序列编号
P15	CAAATGCGATTGTCGAGGCG	175
P16	CCGGCGTTCAACCTGAATCC	176

[0630] 将得到的菌株命名为P.ananatis SC17 (0) Δ fadD:: λ attB。

[0631] 接下来,进行了gcd基因 (PAJ_3473) 的缺失。将使用Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) 而从P.ananatis SC17 (0) Δ gcd:: λ attR-attL ϕ 80-kan-attR ϕ 80中分离的基因组DNA (Katashkina et al., Biotekhnologiya.2019;35 (2) :3-15),依照已报道的方法 (Katashkina et al., BMCMol Biol.2009;10:34) 电穿孔至P.ananatis SC17 (0) Δ fadD:: λ attB株中。 Δ gcd:: λ attR-attL ϕ 80-kan-attR ϕ 80组件的导入使用以下的引物进行了确认。

[0632] [表21]

[0633] 表21.gcd基因缺失确认用引物

引物编号	碱基序列(5'→3')	序列编号
P17	AGGGCAGATAGCAGGCATAA	177
P18	TCTGATTGTTTTCTGAGTTTTC	178

[0635] 将得到的菌株命名为P.ananatis SC17 (0) Δ fadD:: λ attB Δ gcd:: λ attR-attL ϕ 80-kan-attR ϕ 80。通过使用了pAH129-cat辅助质粒的已报道的方法 (Andreeva et al.,

FEMS Microbiol Lett.2011;318(1):55-60),从该菌株中除去了卡那霉素抗性标记(kan基因)。标记的除去通过PCR进行了确认。使用的引物如下所示。

[0636] [表22]

[0637] 表22.卡那霉素抗性标记(kan基因)除去确认用引物

[0638]	引物编号	碱基序列(5' → 3')	序列编号
	P17	AGGGCAGATAGCAGGCATAA	179
	P18	TCTGATTGTTTCCTGAGTTTC	180

[0639] 通过电穿孔法,用pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt质粒转化得到的菌株(P.ananatis SC17(0) Δ fadD::λ attB Δ gcd::λ attR-attBφ80),使其在包含50~200mg/L的卡那霉素的LB琼脂培养基上繁殖,取得了P.ananatis SC17(0) Δ fadD Δ gcd/pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt作为脂肪酸生产株。

[0640] 实施例8:使用脂肪酸生产株的、从葡萄糖出发的月桂酸合成

[0641] 将实施例6和7中构建的脂肪酸生产株接种至包含50mg/L的卡那霉素的K-medium琼脂培养基(K-medium:加入了0.5×M9盐、5g/L D-葡萄糖的LB培养基)上,在30℃下进行了16小时的孵育。进行了评价的菌株如下所示。

[0642] [表23]

[0643] 表23.在月桂酸合成的评价中使用的脂肪酸生产株(实施例6以及7中构建的脂肪酸生产株)

[0644]	菌株编号	宿主	质粒
	1	E.coli Δ lacD	pMW118-Ptac-UcTEopt
	2	P.ananatis Δ fadD Δ gcd	pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt

[0645] 将得到的菌体接种至50mL的评价用培养基上,使用Ultra Yield(商标)Flask 500mL (THOMSON) 在30℃、220rpm的条件下振荡培养。在培养菌株编号2时,将1mM IPTG添加至培养基中。评价用培养基的组成如下所示。

[0646] [表24]

[0647] 表24.脂肪酸生产株的评价用培养基的组成

[0648]

原料名	浓度
D-葡萄糖	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
KCl	1 g/L
MES	10 g/L
D-泛酸钙盐	10 mg/L
甜菜碱	1 g/L
Bacto™ 胰蛋白胨	1 g/L
Bacto™ 酵母提取物	1 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg/L
L-Lys · HCl	125 mg/L
L-Met	100 mg/L
2,6-二氨基庚二酸(DAP)	100 mg/L
CaCO ₃	30 g/L
单硫酸卡那霉素	50 mg/L

[0649] 培养结束后,向将充分混合的培养液1mL离心分离而得到的菌体中,添加1mL的1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇(作为内部标准,包含1000ppm的十三烷酸),使用涡流混合器混合3分钟。将通过离心分离而得到的上清用于GC和GC-MS分析。

[0650] GC分析条件如下所示。

[0651] 装置:GC-2010 (SHIMADZU)

[0652] 柱:DB-FFAP 30m, ID 0.25mm, film 0.25μm (Agilent Technologies)

[0653] 注入量:1μL

[0654] 注入法:分流50:1

[0655] 注入口温度:280℃

[0656] 柱烘箱:190℃ (5min) -8℃/min-250℃ (7.5min)

[0657] 载气:He, 线速度, 35cm/sec

[0658] 检测器:FID, 300℃

[0659] GC-MS分析条件如下所示。

[0660] 装置:网络气相色谱系统 (6890N, Agilent Technologies)

[0661] 质量选择检测器 (5973, Agilent Technologies)

[0662] 柱:DB-FFAP 30m, ID 0.25mm, film 0.25μm (Agilent Technologies)

[0663] 注入量:1μL

[0664] 注入法:分流50:1

[0665] 注入口温度:280℃

[0666] 柱烘箱:190℃ (5min) -8℃/min-250℃ (7.5min)

[0667] 载气:He, 线速度, 39cm/sec

[0668] MS温度:230℃ (离子源), 150℃ (四极杆)

[0669] 扫描范围:m/z30-350

[0670] 根据通过GC分析而得到的峰的面积值,对各种脂肪酸量进行了定量。标准品是通过将各种脂肪酸溶解于1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇(作为内部标准,包含1000ppm的十三烷酸)中而调制的。通过与内部标准的十三烷酸的峰面积值的比较进行样品间的补正,算出了单位培养液的各种脂肪酸量。分析的结果,在菌株编号1和2中,确认到了以月桂酸为主成分的各种脂肪酸的生成。生成的各种脂肪酸根据GC分析中的保持时间和GC-MS分析而鉴定。

[0671] [表25]

[0672] 表25.由脂肪酸生产株所生成的各种脂肪酸的生成量

菌株 编号	菌种	脂肪酸(g/L)						
		C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1	C18:1
[0673] 1	<i>E. coli</i>	1.5±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	ND	ND	ND
2	<i>P. ananatis</i>	1.2±0.2	0.2±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0

[0674] ND:未检测出

[0675] 实施例9:N-酰基氨基酸生产株的构建

[0676] 作为从葡萄糖等碳源出发而生产N-酰基氨基酸的菌株,通过以下的步骤构建了向实施例6和7中构建的脂肪酸生产株中导入了野生型AtGH3-6或变异型AtGH3-6表达单元的菌株。

[0677] 关于启动子PphoC__SDatc序列(序列编号5),将DNA合成委托给了The rmo Fisher Scientific公司,购入了包含该序列的DNA片段被插入至EcoRI和NdeI位点中的质粒。以该质粒为模板,用PCR扩增了包含PphoC__SDatc的DNA片段。PCR使用PrimeSTAR Max DNA Polymerase(Takara Bio)通过以下的条件进行。

[0678] 1cycle 98°C,30sec

[0679] 30cycles 98°C,10sec

[0680] 60°C,15sec

[0681] 72°C,5sec

[0682] 1cycle 72°C,5min

[0683] 4°C,hold

[0684] 使用的引物如下所示。

[0685] [表26]

[0686] 表26.包含PphoC-SDatc的DNA片段的扩增用引物

碱基序列(5'→3')	序列编号
CCATGATTACGAATTCATTTTTTCAATGTG	181
ATGGATTCCTCCTTACGGTGTTATATGTCC	182

[0688] 以pET-28a-AtGH3-6或实施例1中构建的pET-28a-AtGH3-6ID31、pET-28a-AtGH3-6ID49、pET-28a-AtGH3-6 ID56、pET-28a-AtGH3-6 ID61(ID表示变体编号)为模板,用PCR扩增了包含野生型或变异型AtGH3-6基因的DNA片段。PCR使用PrimeSTAR Max DNA Polymerase(Takara Bio)通过以下的条件进行。

[0689] 1cycle 98°C,30sec

[0690] 30cycles 98°C,10sec

[0691] 60℃,15sec

[0692] 72℃,10sec

[0693] 1cycle 72℃,5min

[0694] 4℃,hold

[0695] 使用的引物如下所示。

[0696] [表27]

[0697] 表27. 包含野生型或变异型AtGH3-6基因的DNA片段的扩增用引物

碱基序列 (5' → 3')	序列编号
TAAGGAGGAATCCATATGCCGGAAGCACCA	183
GATCCCCGGGTACCGAGCTCCTCGAGTTAATTACT	184

[0699] 将包含PphoC_SDatc的PCR产物、包含野生型或变异型AtGH3-6基因的PCR产物、和以EcoRI、SacI处理了的pHSG398 (Takara Bio), 分别通过琼脂糖凝胶电泳分离后, 从琼脂糖凝胶中提取目标尺寸的DNA, 使用In-Fusion (注册商标) HD Cloning Kit (Takara Bio) 进行了In-Fusion反应。用该反应液对E.coli JM109进行转化, 从氯霉素抗性株中提取目标的质粒 (包含PphoC_SDatc和AtGH3-6表达单元的质粒)。以该质粒作为pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID31 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID49 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID56 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)。通过得到的目标质粒、pHSG398 (阴性对照), 对实施例6和7中构建的脂肪酸生产株 (E.coli Δ fadD/pMW118-Ptac-UcTEopt, P.ananatis Δ fadD Δ gcd/pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt) 进行转化, 从卡那霉素和氯霉素抗性株中得到了具有该质粒的转化体。将得到的转化体作为N-酰基氨基酸生产株。构建的菌株如下所示。

[0700] [表28]

[0701] 表28.N-酰基氨基酸生产株

菌株编号	宿主	质粒(1)	质粒(2)
3	<i>E. coli</i> Δ fadD	pMW118-Ptac-UcTEopt	pHSG398
4			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)
5			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID31 (SDatc)
6			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID49 (SDatc)
7			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID56 (SDatc)
8			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)
9	<i>P. ananatis</i> Δ fadD Δ gcd	pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt	pHSG398
10			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)
11			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID31 (SDatc)
12			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID49 (SDatc)
13			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID56 (SDatc)
14			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)

[0703] 实施例10: 使用了N-酰基氨基酸生产株的、从葡萄糖出发的Na-月桂酰基-L-谷氨酸合成

[0704] 将实施例9中构建的N-酰基氨基酸生产株接种至包含50mg/L的卡那霉素和25mg/L

的氯霉素的LB琼脂培养基上,在30℃下进行了16小时的孵育。将得到的菌体接种至3mL的评价用培养基中,使用试验管在30℃、120rpm的条件下进行了48小时的振荡培养。在培养菌株编号9到14时,将1mM IPTG添加至培养基中。评价用培养基的组成如下所示。

[0705] [表29]

[0706] 表29.N-酰基氨基酸生产株的评价用培养基的组成

原料名	浓度
D-葡萄糖	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
KCl	1 g/L
MES	10 g/L
D-泛酸钙盐	10 mg/L
甜菜碱	1 g/L
[0707] Bacto™ 胰蛋白胨	1 g/L
Bacto™ 酵母提取物	1 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg/L
L-Lys · HCl	125 mg/L
L-Met	100 mg/L
2,6-二氨基庚二酸(DAP)	100 mg/L
CaCO ₃	30 g/L
单硫酸卡那霉素	50 mg/L
氯霉素	25 mg/L

[0708] 培养结束后,向充分混合的培养液100μL中,添加900μL的1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇,使用涡流混合器混合3分钟。将通过离心分离而得到的上清适宜地以1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇进行稀释,用于UPLC-MS分析。UPLC-MS分析条件如实施例5所述。

[0709] UPLC-MS分析的结果,在使阴性对照 (pHSG398)、野生型AtGH3-6表达的情况下,各种Nα-酰基-L-谷氨酸几乎没有生成,但在使变异型AtGH3-6 (ID31、49、56和61) 表达的情况下,确认到了各种Nα-酰基-L-谷氨酸的生成。表中的Control表示阴性对照,WT表示野生型AtGH3-6。

[0710] [表30]

[0711] 表30.由各N-酰基氨基酸生产株所生成的各种Nα-酰基-L-谷氨酸的生成量

[0712]

菌株 编号	菌株		Na-acyl-L-Glu (g/L)						
			C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1
3	<i>E. coli</i>	Control	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4		WT	0.0000	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
5		ID31	0.0012	0.1296	0.0682	0.0003	0.0053	0.0001	0.0003
6		ID49	0.0019	0.1474	0.0863	0.0009	0.0086	0.0003	0.0012
7		ID56	0.0036	0.1942	0.1188	0.0017	0.0211	0.0006	0.0018
8		ID61	0.0028	0.1745	0.1059	0.0012	0.0149	0.0003	0.0014
9	<i>P. ananatis</i>	Control	0.0000	0.0022	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10		WT	0.0011	0.0345	0.0183	0.0007	0.0008	0.0000	0.0003
11		ID31	0.0073	0.7553	0.1953	0.0104	0.1003	0.0001	0.0016
12		ID49	0.0075	0.7029	0.2248	0.0341	0.1200	0.0008	0.0132
13		ID56	0.0069	0.7486	0.1905	0.0125	0.0892	0.0004	0.0054
14		ID61	0.0042	0.7613	0.1522	0.0143	0.0806	0.0004	0.0069

[0713] 实施例11:使用了N-酰基氨基酸生产株的、从葡萄糖出发的Na-月桂酰基-L-天冬氨酸合成

[0714] 将实施例9中构建的N-酰基氨基酸生产株接种至包含50mg/L的卡那霉素和25mg/L的氯霉素的LB琼脂培养基上,在30℃下进行了16小时的孵育。将得到的菌体接种至3mL的评价用培养基中,使用试验管在30℃、120rpm的条件下进行了48小时的振荡培养。在培养菌株编号9到14时,将1mM IPTG添加到培养基中。评价用培养基的组成为向实施例10所述的组成中添加10g/L L-天冬氨酸。

[0715] 培养结束后,向充分混合的培养液100μL中,添加900μL的1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇,使用涡流混合器混合3分钟。将通过离心分离而得到的上清适宜地以1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇进行稀释,用于UPLC-MS分析。UPLC-MS分析如实施例5所述地进行,SIR检测如下所示地进行。C10-L-Asp的定量中使用C10-L-Asp作为标准品,具有C12以上的碳链长的酰基的Na-酰基-L-Asp的定量中使用C12-L-Asp作为标准品。

[0716] [表31]

[0717] 表31.以SIR法检测出的MS离子

[0718]

Na-acyl-L-Asp	m/z [M-H] ⁻
C10-L-Asp	286
C12-L-Asp	314
C12:1-L-Asp	312
C14-L-Asp	342
C14:1-L-Asp	340
C16-L-Asp	370
C16:1-L-Asp	368

[0719] 根据UPLC-MS分析的结果,在阴性对照(pHSG398)中,各种Na-酰基-L-天冬氨酸几乎没有生成,但在使野生型AtGH3-6或变异型AtGH3-6(ID31、49、56和61)表达的情况下,确认到了各种Na-酰基-L-天冬氨酸的生成。表中的Control表示阴性对照,WT表示野生型AtGH3-6。

[0720] [表32]

[0721] 表32.由各N-酰基氨基酸生产株所生成的各种Na-酰基-L-天冬氨酸的生成量

菌株 编号	菌株		N α -acyl-L-Asp (g/L)						
			C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1
3	<i>E. coli</i>	Control	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4		WT	0.0000	0.0003	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0008
5		ID31	0.0000	0.0012	0.0005	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001
6		ID49	0.0001	0.0025	0.0012	0.0001	0.0003	0.0000	0.0001
7		ID56	0.0001	0.0007	0.0017	0.0002	0.0006	0.0000	0.0002
8		ID61	0.0000	0.0022	0.0008	0.0001	0.0003	0.0000	0.0001
9	<i>P. ananatis</i>	Control	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10		WT	0.0087	0.1560	0.0912	0.0036	0.0566	0.0003	0.0054
11		ID31	0.0002	0.0816	0.0255	0.0008	0.0065	0.0001	0.0010
12		ID49	0.0006	0.1178	0.0341	0.0028	0.0140	0.0002	0.0042
13		ID56	0.0002	0.0939	0.0277	0.0015	0.0094	0.0001	0.0019
14		ID61	0.0006	0.1359	0.0375	0.0032	0.0171	0.0002	0.0046

[0723] 实施例12:N-酰基氨基酸生产株的培养液的发泡评价

[0724] 将实施例9中构建的N-酰基氨基酸生产株接种至包含50mg/L的卡那霉素和25mg/L的氯霉素的LB琼脂培养基中,在30℃下进行了16小时的孵育。进行了评价的菌株如下所示。

[0725] [表33]

[0726] 表33.在培养液的发泡评价中使用的N-酰基氨基酸生产株(实施例9中构建的N-酰基氨基酸生产株)

菌株 编号	宿主	质粒(1)	质粒(2)
3	<i>E. coli</i> $\Delta fadD$	pMW118-Ptac-UcTEopt	pHSG398
4			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDate)
8			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDate)
9	<i>P. ananatis</i> $\Delta fadD \Delta gcd$	pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt	pHSG398
10			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDate)
14			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDate)

[0728] 将得到的菌体接种至50mL的评价用培养基中,使用Ultra Yield(商标)Flask 500mL (THOMSON)在30℃、220rpm的条件下进行振荡培养。在培养菌株编号9、10、14时,将1mM IPTG添加至培养基中。评价用培养基的组成如实施例10所述。

[0729] 培养结束后,将充分混合的培养液离心分离,向得到的培养上清100 μ L中添加900 μ L的1.4% (w/v) 磷酸、75% (V/v) 甲醇,使用涡流混合器混合3分钟。将通过离心分离而得到的上清适宜地以1.4% (w/v) 磷酸、75% (v/v) 甲醇进行稀释,并用于UPLC-MS分析。UPLC-MS分析条件如实施例5所述。

[0730] 根据UPLC-MS分析的结果,在使阴性对照(pHSG398)、野生型AtGH3-6表达的情况下,各种Na-酰基-L-谷氨酸几乎没有生成,而在使变异型AtGH3-6(ID61)表达的情况下,确认到了各种Na-酰基-L-谷氨酸的生成。表中的Control表示阴性对照,WT表示野生型AtGH3-6,total表示具有C10、C12、C12:1、C14、C14:1、C16、C16:1的酰基的Na-酰基-L-谷氨酸的总浓度。

[0731] [表34]

[0732] 表34.由各N-酰基氨基酸生产株在培养上清中生成的各种Na-酰基-L-谷氨酸的生成量

[0733]

菌株 编号	菌株		Na-acyl-L-Glu (g/L)							
			C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1	total
3	<i>E. coli</i>	Control	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
4		WT	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
8		ID61	0.003	0.094	0.094	0.001	0.014	0.000	0.001	0.205
9	<i>P. ananatis</i>	Control	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
10		WT	0.001	0.009	0.011	0.000	0.002	0.000	0.000	0.024
14		ID61	0.003	0.672	0.177	0.032	0.092	0.001	0.013	0.990

[0734] 为了评价得到的培养上清的发泡,通过HCl将各种培养上清4mL的pH调节至5.0后,添加超纯水至5mL。作为对照,准备了将Na-月桂酰基-L-谷氨酸(Amisoft(注册商标)LA-D)溶解至超纯水中,通过NaOH将pH调节至5.0的溶液。并且,准备了将Na-月桂酰基-L-谷氨酸(Amisoft(注册商标)LA-D)溶液添加至阴性对照(pHSG398)的培养上清4mL中,通过HCl将pH调节至5.0后,添加超纯水至5mL的溶液。

[0735] 将各样品2mL加入螺口试验管(全长105mm,口内径 $\phi 10.0\text{mm}$,体径 $\phi 16.5\text{mm}$)中,以35℃、10分钟、水浴的条件进行孵育。然后,将螺口试验管拿在手中,上下挥动10秒,之后立刻测定泡的高度。

[0736] 其结果,与使阴性对照(pHSG398)、野生型AtGH3-6表达的情况相比,在使变异型AtGH3-6(ID61)表达的情况下,确认到了较强的发泡。因此,N-酰基氨基酸生产株所生成的Na-酰基-L-谷氨酸表现出了可以用于表面活性剂用途的可能性。表中的Control表示阴性对照,WT表示野生型AtGH3-6,总Na-acyl-L-Glu表示具有C10、C12、C12:1、C14、C14:1、C16、C16:1的酰基的Na-酰基-L-谷氨酸的总浓度。

[0737] [表35]

[0738] 表35.振荡各N-酰基氨基酸生产株的培养上清后的泡的高度

样品编号	菌株编号	菌株	样品中的 总 Na-acyl-L-Glu (g/L)		泡的高度 (mm)
1	3	<i>E. coli</i>	Control	0.00	1.0±0.0
2	4		WT	0.00	4.0±0.0
3	8		ID61	0.16	16.5±0.5
4			C12-L-Glu 溶液(对照)	0.16	10.5±2.5
5			样品编号1+C12-L-Glu 溶液(对照)	0.16	5.5±1.5
6	9	<i>P. ananatis</i>	Control	0.00	4.5±2.5
7	10		WT	0.02	4.0±2.0
8	14		ID61	0.79	33.0±0.0
9			C12-L-Glu 溶液(对照)	0.79	11.0±1.0
10			样品编号6+C12-L-Glu 溶液(对照)	0.79	16.0±1.0

[0740] 工业实用性

[0741] 本发明可用于能够在化妆品原材料(特别是,表面活性剂)等中使用的含N-酰基-氨基的化合物的制造。

[0742] 序列编号1和2分别表示AtGH3-6的氨基酸序列和为用于大肠杆菌中的表达而对密码子进行了最优化的、编码该氨基酸序列的碱基序列。

[0743] 序列编号3和4分别表示加州月桂 (*California bay* (*Umbellularia californica*)) 来源的中链酰基-ACP硫酯酶 (medium-chain acyl-ACP thioesterase) (UcTE, GenBank:M94159) 的氨基酸序列 (氨基酸1~83表示转运肽) 和编码对该氨基酸序列中的第84位到第382位的氨基酸残基赋予了起始蛋氨酸的氨基酸序列的碱基序列 (密码子为用于大肠杆菌中的表达而进行了最优化)。

[0744] 序列编号5表示PphoC__SDatc的碱基序列。

[0745] 序列编号6表示Ptac-RBST7-UcTEopt的碱基序列 (核苷酸7~71表示Ptac启动子, 核苷酸82~110表示RBST7, 117~1019表示UcTEopt基因)。

[0746] 序列编号7~184表示引物的碱基序列。

[0747] 序列编号185和186分别表示变异型AtGH3-6的氨基酸序列和为用于大肠杆菌中的表达而对密码子进行了最优化的、编码该氨基酸序列的碱基序列。

[0748] 序列编号187表示UcTE的转运肽 (Transit peptide) 的氨基酸序列。

序列表

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 具有N-酰化活性的修饰酶

<130> AM-R021864

<150> RU2019131887

<151> 2019-10-10

<160> 187

<210> 1

<211> 612

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 1

```

Met Pro Glu Ala Pro Lys Ile Ala Ala Leu Glu Val Ser Asp Glu Ser
1           5           10           15
Leu Ala Glu Lys Asn Lys Asn Lys Leu Gln Phe Ile Glu Asp Val Thr
           20           25           30
Thr Asn Ala Asp Asp Val Gln Arg Arg Val Leu Glu Glu Ile Leu Ser
           35           40           45
Arg Asn Ala Asp Val Glu Tyr Leu Lys Arg His Gly Leu Glu Gly Arg
           50           55           60
Thr Asp Arg Glu Thr Phe Lys His Ile Met Pro Val Val Thr Tyr Glu
65           70           75           80
Asp Ile Gln Pro Glu Ile Asn Arg Ile Ala Asn Gly Asp Lys Ser Gln
           85           90           95
Val Leu Cys Ser Asn Pro Ile Ser Glu Phe Leu Thr Ser Ser Gly Thr
           100          105          110
Ser Gly Gly Glu Arg Lys Leu Met Pro Thr Ile Glu Glu Glu Leu Asp
           115          120          125
Arg Arg Ser Leu Leu Tyr Ser Leu Leu Met Pro Val Met Asp Gln Phe
           130          135          140
Val Pro Gly Leu Asp Lys Gly Lys Gly Met Tyr Phe Leu Phe Ile Lys
145          150          155          160
Ser Glu Ser Lys Thr Pro Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Val Leu Thr
           165          170          175
Ser Tyr Tyr Lys Ser Ser His Phe Lys Asn Arg Pro Tyr Asp Pro Tyr
           180          185          190
Thr Asn Tyr Thr Ser Pro Asn Gln Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Tyr
           195          200          205

```

Gln Ser Met Tyr Ser Gln Met Leu Cys Gly Leu Cys Gln His Lys Glu		
210	215	220
Val Leu Arg Val Gly Ala Val Phe Ala Ser Gly Phe Ile Arg Ala Ile		
225	230	235 240
Lys Phe Leu Glu Lys His Trp Pro Glu Leu Ala Arg Asp Ile Arg Thr		
	245	250 255
Gly Thr Leu Ser Ser Glu Ile Thr Asp Ser Ser Val Arg Glu Ala Val		
	260	265 270
Gly Glu Ile Leu Lys Pro Asp Pro Lys Leu Ala Asp Phe Val Glu Ser		
	275	280 285
Glu Cys Arg Lys Thr Ser Trp Gln Gly Ile Ile Thr Arg Leu Trp Pro		
	290	295 300
Asn Thr Lys Tyr Val Asp Val Ile Val Thr Gly Thr Met Ser Gln Tyr		
305	310	315 320
Ile Pro Thr Leu Asp Tyr Tyr Ser Asn Gly Leu Pro Leu Val Cys Thr		
	325	330 335
Met Tyr Ala Ser Ser Glu Cys Tyr Phe Gly Val Asn Leu Arg Pro Leu		
	340	345 350
Cys Lys Pro Ser Glu Val Ser Tyr Thr Leu Ile Pro Asn Met Ala Tyr		
	355	360 365
Phe Glu Phe Leu Pro Val His Arg Asn Ser Gly Val Thr Ser Ser Ile		
	370	375 380
Ser Leu Pro Lys Ala Leu Thr Glu Lys Glu Gln Gln Glu Leu Val Asp		
385	390	395 400
Leu Val Asp Val Lys Leu Gly Gln Glu Tyr Glu Leu Val Val Thr Thr		
	405	410 415
Tyr Ala Gly Leu Tyr Arg Tyr Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Val Ala		
	420	425 430
Gly Phe Lys Asn Asn Ala Pro Gln Phe Ser Phe Ile Cys Arg Lys Asn		
	435	440 445
Val Val Leu Ser Ile Asp Ser Asp Lys Thr Asp Glu Val Glu Leu Gln		
	450	455 460
Asn Ala Val Lys Asn Ala Val Thr His Leu Val Pro Phe Asp Ala Ser		
465	470	475 480
Leu Ser Glu Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Thr Ser Ser Ile Pro Gly His		
	485	490 495
Tyr Val Leu Phe Trp Glu Leu Cys Leu Asn Gly Asn Thr Pro Ile Pro		
	500	505 510
Pro Ser Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Thr Ile Glu Glu Ser Leu Asn		

515	520	525
Ser Val Tyr Arg Gln Gly Arg Val Ser Asp Lys	Ser Ile Gly Pro Leu	
530	535	540
Glu Ile Lys Met Val Glu Ser Gly Thr Phe Asp Lys	Leu Met Asp Tyr	
545	550	555
Ala Ile Ser Leu Gly Ala Ser Ile Asn Gln Tyr Lys	Thr Pro Arg Cys	
565	570	575
Val Lys Phe Ala Pro Ile Ile Glu Leu Leu Asn Ser	Arg Val Val Asp	
580	585	590
Ser Tyr Phe Ser Pro Lys Cys Pro Lys Trp Ser	Pro Gly His Lys Gln	
595	600	605
Trp Gly Ser Asn		

610

<210> 2

<211> 1839

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 2

```

atgccggaag caccaaaaat cgcagcctta gaagtcagtg atgagagcct ggctgagaaa 60
aacaaaaaca agctgcaatt tatcgaagat gttaccacca acgctgacga tgtgcaacgt 120
cgcggttctgg aagaaattct gagtcgtaat gcggacgtag aatatctgaa acgccatggt 180
ctggaaggcc gaaccgatcg cgagaccttc aagcacatca tgccggttgt gacgtacgaa 240
gatatccaac ccgaaatcaa ccgtattgcg aatggcgaca aatcgcaggt tctgtgttcg 300
aacccgataa gcgagtttct caccagttcc ggtacctcag gcggagaacg caaacttatg 360
ccgacgatcg aggaagaact ggatcgtcgg agtctgctgt actcactcct tatgcccgctc 420
atggatcagt ttgttccggg gttagataaa gggaaaggga tgtacttcct cttcatcaag 480
tcggaatcga aaaccctggt tggctcgcct gcacgtcccc tcctgacctc gtattacaag 540
tcctctcact tcaagaatcg accttacgat ccgtatacca actataccag tccgaatcag 600
acgatcttgt gttccgactc ctaccaatcg atgtacagcc agatgctttg cggctctgtgt 660
cagcacaaaag aagtgtctcg tgttggcgcg gtttttgcca gcgggtttat tcgcgcaatc 720
aaattttctgg agaaacactg gccggaattg gcgcgcgaca ttcgcacagg cactctgagc 780
agcgaaaatta cggattccag cgttcgcgaa gcagtgggag agattctgaa acccgatcct 840
aaactggcgg atttcgtcga aagtgaatgt cgcaaaacat cttggcaggg aattattacg 900
cggctatggc caaataccaa atatgttgac gtgattgtca ctggcaccat gagccagtac 960
attccgacac ttgactatta ctccaacggc ttaccgttag tctgcacgat gtatgcgagc 1020
agtgaatgct actttggagt gaatctcagg ccactatgca aaccatctga agtatcttac 1080
acccttatcc cgaacatggc ctatttcgag ttccttcagg tccatcgtaa ctcaggcgta 1140
actagcagca ttagcttgcc taaagcactg accgaaaaag aacaacagga gttagtagat 1200
ctggtagacg tgaagctggg ccaggaatat gagttagtcg tcacaacgta tgccggtctg 1260

```

tatcgggtatc gcgtgggtga tgtgctgagt gtagccggat tcaaaaataa tgctccgcag 1320
 tttagcttta tctgccgtaa aaacgtgggt ctcctcattg actctgacaa gacggatgaa 1380
 gtggaattgc aaaatgctgt gaaaaacgcc gtaacgcac tggttccgtt tgatgcctca 1440
 ctgtcagaat atacctcgtg tgcggatact tcttctattc caggtcatta cgtgctgttc 1500
 tgggaattgt gtctgaatgg caacactccg atacctccgt ctgtgtttga ggattgctgc 1560
 ttgaccattg aagagagctt aaatagcgtg tatcgccaag gccgtgtgtc cgacaaaagc 1620
 attggtccac tggagatcaa gatggtggaa tcgggtactt ttgataagtt gatggattat 1680
 gcgattttctt taggcgcgtc catcaaccag tacaaaacac caagatgcgt caaatcgcg 1740
 ccgattatcg agctcctgaa ctcacgtgtg gttgacagct atttttcccc caaatgtccg 1800
 aaatgggtcac cggggcataa acagtggggg agtaattaa 1839

<210> 3

<211> 382

<212> PRT

<213> 加州月桂

<400> 3

Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser	Ala	Phe	Cys	Ser	Met	Lys	Ala	Val
1				5					10					15	
Met	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Leu
			20					25						30	
Gln	Leu	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Lys	Met	Ile	Asn	Gly
		35					40						45		
Thr	Lys	Phe	Ser	Tyr	Thr	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Leu	Pro	Asp	Trp	Ser
	50					55					60				
Met	Leu	Phe	Ala	Val	Ile	Thr	Thr	Ile	Phe	Ser	Ala	Ala	Glu	Lys	Gln
65				70					75					80	
Trp	Thr	Asn	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Pro	Gln	Leu	Leu
			85						90					95	
Asp	Asp	His	Phe	Gly	Leu	His	Gly	Leu	Val	Phe	Arg	Arg	Thr	Phe	Ala
		100						105					110		
Ile	Arg	Ser	Tyr	Glu	Val	Gly	Pro	Asp	Arg	Ser	Thr	Ser	Ile	Leu	Ala
		115					120					125			
Val	Met	Asn	His	Met	Gln	Glu	Ala	Thr	Leu	Asn	His	Ala	Lys	Ser	Val
	130					135						140			
Gly	Ile	Leu	Gly	Asp	Gly	Phe	Gly	Thr	Thr	Leu	Glu	Met	Ser	Lys	Arg
145				150						155				160	
Asp	Leu	Met	Trp	Val	Val	Arg	Arg	Thr	His	Val	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr
			165						170					175	
Pro	Thr	Trp	Gly	Asp	Thr	Val	Glu	Val	Glu	Cys	Trp	Ile	Gly	Ala	Ser
			180						185					190	

Gly Asn Asn Gly Met Arg Arg Asp Phe Leu Val Arg Asp Cys Lys Thr		
195	200	205
Gly Glu Ile Leu Thr Arg Cys Thr Ser Leu Ser Val Leu Met Asn Thr		
210	215	220
Arg Thr Arg Arg Leu Ser Thr Ile Pro Asp Glu Val Arg Gly Glu Ile		
225	230	235
Gly Pro Ala Phe Ile Asp Asn Val Ala Val Lys Asp Asp Glu Ile Lys		
	245	250
Lys Leu Gln Lys Leu Asn Asp Ser Thr Ala Asp Tyr Ile Gln Gly Gly		
	260	265
Leu Thr Pro Arg Trp Asn Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Asn Asn		
	275	280
Leu Lys Tyr Val Ala Trp Val Phe Glu Thr Val Pro Asp Ser Ile Phe		
	290	295
Glu Ser His His Ile Ser Ser Phe Thr Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys		
305	310	315
Thr Arg Asp Ser Val Leu Arg Ser Leu Thr Thr Val Ser Gly Gly Ser		
	325	330
Ser Glu Ala Gly Leu Val Cys Asp His Leu Leu Gln Leu Glu Gly Gly		
	340	345
Ser Glu Val Leu Arg Ala Arg Thr Glu Trp Arg Pro Lys Leu Thr Asp		
	355	360
Ser Phe Arg Gly Ile Ser Val Ile Pro Ala Glu Pro Arg Val		
	370	375
		380

<210> 4

<211> 903

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于在E.coli中表达的密码子最优化

<400> 4

```

atgctagagt ggaaaccgaa accgaaactg ccgcagctgt tagacgatca ctttggttg 60
catggcttgg tctttcgccg cacgtttgcc attcgagct atgaggtagg tcccgatcgc 120
agtacctga ttcttgccgt tatgaaccac atgcaagaag ctaccttgaa ccatgcgaaa 180
tcagtgggca tcttagggga tgggttttgt accacctgg aatgtccaa acgcgacctg 240
atgtgggtgg tgcgtcgtac gcatgttgca gttgaacgtt accctacttg gggtgatacc 300
gttgaggtgg aatgctggat tggcgctagc ggcaataacg gtatgcgtcg ggatttcctt 360
gtccgggatt gtaaaaccgg ggaaattctt acccgctgta cgtcactctc agtgcgatg 420
aacacccgta ctcgtcgcct gattaccatt ccggacgaag ttcgcggtga aattggtcca 480

```

gcgttcattg acaatgtggc agtcaaagat gacgagatca agaaactgca gaaactcaac 540
gattcaacgg ccgattacat ccaaggcggc ctcacgccac gctggaatga cctggatgtg 600
aatcagcacg tcaacaacct gaagtacgtt gcgtgggtct ttgaaacgg accggattcg 660
atctttgaga gccatcacat tagtagcttc accctcgaat atcgtcgtga atgtacacgc 720
gatagtgtac ttcgtagcct gaccaccgtg agtggtggtt cttcggaagc aggcttggtg 780
tgcgaccatc tgctgcaact ggaaggcgga tcggaagtgc tgcgtgctcg cactgaatgg 840
cgtccgaaac tgacagatag ctttcgcgga atctcggtga ttcctgcgga acctcgcgtt 900
taa 903

<210> 5

<211> 98

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 5

attttttcaa tgtgatttta acttttactt ccagatgact ataatgtgac taaaaacaaa 60
accattgttc tggacatata acaccgtaag gaggaatc 98

<210> 6

<211> 1025

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒

<400> 6

agatctccct gttgacaatt aatcatcggc tctataatgt gtggaatcgt gagcggataa 60
caatttcaca caggatctag aaataatttt gttaaacttt aagaaggaga tataccatgc 120
tagagtggaa accgaaaccg aaactgccgc agctgttaga cgatcacttt ggcttgcagt 180
gcttgggtctt tcgccgcacg tttgccattc gcagctatga ggtaggtccc gatcgagta 240
cctcgattct tgccgttatg aaccacatgc aagaagctac cttgaaccat gcgaaatcag 300
tgggcatctt aggggatggg tttggtacca ccctggaaat gtccaaacgc gacctgatgt 360
gggtgggtgcg tcgtacgcat gttgcagttg aacgttacc cacttggggg gataccgttg 420
agggtggaatg ctggattggc gctagcggca ataacggtat gcgtcgggat ttccttgtcc 480
gggattgtaa aaccggggaa attcttacc gctgtacgtc actctcagt ctgatgaaca 540
cccgtactcg tcgcctgagt accattccgg acgaagtgc cggtgaaatt ggtccagcgt 600
tcattgacaa tgtggcagtc aaagatgacg agatcaagaa actgcagaaa ctcaacgatt 660
caacggccga ttacatccaa ggcggcctca cgccacgctg gaatgacctg gatgtgaatc 720
agcacgtcaa caacctgaag tacgttgcgt ggggtcttga aacggtaccg gattcgatct 780
ttgagagcca tcacattagt agcttcaccc tcgaatatcg tcgtgaatgt acacgcgata 840
gtgtacttcg tagcctgacc accgtgagtg gtggttcttc ggaagcaggc ttggtatgcg 900
accatctgct gcaactggaa ggcggatcgg aagtgtctgc tgctcgact gaatggcgctc 960
cgaaactgac agatagcttt cgcggaatct cggtgattcc tgcggaacct cgcgtttaag 1020

aattc 1025
<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 7
cgtcggagtctgctgttttcactccttatgccc 33
<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 8
gggcataaggagtgaaaacagcagactccgacg 33
<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 9
cgtcggagtctgctgggtgtcactccttatgccc 33
<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 10
gggcataaggagtgacaccagcagactccgacg 33
<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物

<400> 11
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 12
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 13
ctgcctgcacgtcccgcgctgacctcgtattac 33
<210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 14
gtaatacagaggtcagcgcgggacgtgcaggcag 33
<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 15
ctgcgtgttgcgcgggcgtttgccagcgggttt 33
<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 引物
<400> 16
aaacccgctggcaaacgccgcgccaacacgcag 33
<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 17
ttaccgttagtctgcagcatgtatgcgagcagt 33
<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 18
actgctgcatacatgctgcagactaacggtaa 33
<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 19
ccgttagtctgcacgggctatgcgagcagtga 33
<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 20
ttcactgctgcatagcccgtgcagactaacgg 33
<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 21
gtctgcacgatgtatggcagcagtgaatgctac 33
<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 22
gtagcattcactgctgccatacatcgtgcagac 33
<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 23
tgcacgatgtatgcggcgagtgaatgctacttt 33
<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 24
aaagtagcattcactcgccgatacatcgtgca 33
<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 25
gcgagcagtgaatgcggctttggagtgaatctc 33
<210> 26
<211> 33
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 26
gagattcactccaaagccgcattcactgctcgc 33
<210> 27
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 27
gcgagcagtgaatgcgcgtttggagtgaatctc 33
<210> 28
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 28
gagattcactccaaacgcgcattcactgctcgc 33
<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 29
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 30
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 30
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 31
<211> 33

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 31
gttctctccattgacaccgacaagacggatgaa 33
<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 32
ttcatccgtcttgtcgggtcaatggagagaac 33
<210> 33
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 33
cgcaaacttatgccgagcacccgaggaagaactggat 36
<210> 34
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 34
atccagttcttcctcgggtgctcggcataagtttgcg 36
<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 35
acctcaggcggagaaccgaaacttatgccgacg 33
<210> 36

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 36
cgtcggcataaagtttcggttctccgcctgaggt 33
<210> 37
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 37
aatagcgtgtatcgccgtggccgtgtgtccgac 33
<210> 38
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 38
gtcggacacacggccacggcgatacacgctatt 33
<210> 39
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 39
tacaaaacaccaagagcgggtcaaattcgcgccg 33
<210> 40
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 40
cggcgcgaatttgaccgctcttggtgttttgta 33

<210> 41
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 41
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 42
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 42
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 43
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 44
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 44
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 45
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 45

ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 46
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 47
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 47
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 48
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 49
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 49
ctgcctgcacgtcccgcgtgacctcgattac 33
<210> 50
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物

<400> 50
gtaatacagaggtcagcgcgggacgtgcaggcag 33
<210> 51
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 51
ccgttagtctgcacgggctatgcgagcagtga 33
<210> 52
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 52
ttcactgctcgcatagcccgtgcagactaacgg 33
<210> 53
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 53
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 54
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 54
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 55
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 引物
<400> 55
ccgttagtctgcacgggctatgcgagcagtga 33
<210> 56
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 56
ttcactgctcgcatagcccgtgcagactaacgg 33
<210> 57
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 57
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 58
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 58
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 59
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 59
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 60
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 61
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 61
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 62
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 62
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 63
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 63
ctgcctgcacgtcccgcgctgacctcgtattac 33
<210> 64
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 64
gtaatacagaggtcagcgcgggacgtgcaggcag 33
<210> 65
<211> 33
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 65
ctgcgtgttggcgcggcgtttgccagcgggttt 33
<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 66
aaacccgctggcaaacgccgcgccaacacgcag 33
<210> 67
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 67
ccgttagtctgcacgggctatgcgagcagtga 33
<210> 68
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 68
ttcactgctcgcatagcccgtgcagactaacgg 33
<210> 69
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 69
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 70
<211> 33

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 70
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 71
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 71
gaatgcatttttggagtgaatctcagg 27
<210> 72
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 72
tccaaaaatgcattcactgctcgcata 27
<210> 73
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 73
ctgcgtgttggcgcggcgtttgccagcgggttt 33
<210> 74
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 74
aaacccgctggcaaacgccgcgccaacacgcag 33
<210> 75

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 75
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 76
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 76
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 77
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 77
gcgagcagtgaatgcgtgtttggagtgaatctc 33
<210> 78
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 78
gagattcactccaaacacgcattcactgctcgc 33
<210> 79
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 79
gtccatcgtaactcagacgtaactagcagcatt 33

<210> 80
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 80
aatgctgctagttacgtctgagttacgatggac 33
<210> 81
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 81
tttggagtgaatctcacgccactatgcaaacca 33
<210> 82
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 82
tggtttgcatagtggcgtgagattcactccaaa 33
<210> 83
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 83
accaaatatgttgacgcgattgtcactggcacc 33
<210> 84
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 84

ggtgccagtgacaatcgcgtaacatatttgg 33

<210> 85

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 85

ctgctgtactcactcattatgccgcatggat 33

<210> 86

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 86

atccatgacgggcataatgagtgagtacagcag 33

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 87

tataccagtccgaatgagacgatcttggttcc 33

<210> 88

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 88

ggaacacaagatcgtctcattcggactggtata 33

<210> 89

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 89
aaacttatgccgacgaccgaggaagaactggat 33
<210> 90
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 90
atccagtttcttcctcggtcgtcggcataagttt 33
<210> 91
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 91
caggttctgtgttcgagcccgataagcgagttt 33
<210> 92
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 92
aaactcgcttatcgggctcgaacacagaacctg 33
<210> 93
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 93
aaacttatgccgacgaccgaggaagaactggat 33
<210> 94
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 引物
<400> 94
atccagttcttctcctcggtcgtcggcataagttt 33
<210> 95
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 95
caggttctgtgttcgagcccgataagcgagttt 33
<210> 96
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 96
aaactcgcttatcgggctcgaacacagaacctg 33
<210> 97
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 97
caggttctgtgttcgagcccgataagcgagttt 33
<210> 98
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 98
aaactcgcttatcgggctcgaacacagaacctg 33
<210> 99
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 99
tataaccagtccgaatgagacgatcttgtgttcc 33
<210> 100
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 100
ggaacacaagatcgtctcattcggactggtata 33
<210> 101
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 101
aaacttatgccgacgaccgaggaagaactggat 33
<210> 102
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 102
atccagttcttctcctcggtcgtcggcataagttt 33
<210> 103
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 103
caggttctgtgttcgagcccgataagcgagttt 33
<210> 104
<211> 33
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 104
aaactcgcttatcgggctcgaacacagaacctg 33
<210> 105
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 105
caggttctgtgttcgagcccgataagcgagttt 33
<210> 106
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 106
aaactcgcttatcgggctcgaacacagaacctg 33
<210> 107
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 107
tataaccagtccgaatgagacgatcttgtgttcc 33
<210> 108
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 108
ggaacacaagatcgtctcattcggactggtata 33
<210> 109
<211> 33

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 109
tacaaaacaccaagagcggtcaaattcgcgccg 33
<210> 110
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 110
cggcgcgaaatttgaccgctcttggtgttttgta 33
<210> 111
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 111
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 112
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 112
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 113
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 113
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 114

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 114
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 115
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 115
ttcctcttcatcaagccggaatcgaaaaccct 33
<210> 116
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 116
aggggttttcgattccggcttgatgaagaggaa 33
<210> 117
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 117
ccgttagtctgcacgggctatgcgagcagtga 33
<210> 118
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 118
ttcactgctcgcatagcccgtgcagactaacgg 33

<210> 119
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 119
ccgttagtctgcacgggctatgcgagcagtga 33
<210> 120
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 120
ttcactgctcgcatagcccgtgcagactaacgg 33
<210> 121
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 121
tagcttgccctaatgcactgaccg 23
<210> 122
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 122
cggtcagtgcattaggcaagcta 23
<210> 123
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 123

tacaaaacaccaagagcggtcaaattcgcgccg 33

<210> 124

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 124

cggcgcgaaatttgaccgctcttggtgttttgta 33

<210> 125

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 125

tagcttgccataatgcactgaccg 23

<210> 126

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 126

cggtcagtgcattaggcaagcta 23

<210> 127

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 127

caggttctgtgttcgagcccgataagcgagttt 33

<210> 128

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 128
aaactcgcttatcgggctcgaacacagaacctg 33
<210> 129
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 129
tataaccagtccgaatgagacgatcttgtgttcc 33
<210> 130
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 130
ggaacacaagatcgtctcattcggactggtata 33
<210> 131
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 131
cgacgaccgaggaagaactggatcgtcg 28
<210> 132
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 132
tcagtgcattaggcaagctaattgctgct 28
<210> 133
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 引物
<400> 133
tgcctaatgcactgaccgaaaaagaaca 28
<210> 134
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 134
cttcctcggtcgtcggcataagtttgcg 28
<210> 135
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 135
gttcgagcccgataagcgagtttctcac 28
<210> 136
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 136
agatcgtctcattcggactggtatagtt 28
<210> 137
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 137
cgaatgagacgatcttggttccgactc 28
<210> 138
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 138
ttatcgggctcgaacacagAACCTgcga 28
<210> 139
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 139
gttcgagcccgataagcgagtttctcac 28
<210> 140
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 140
tcagtgcattaggcaagctaattgctgct 28
<210> 141
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 141
tgcctaattgcactgaccgaaaaagaaca 28
<210> 142
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 142
ttatcgggctcgaacacagAACCTgcga 28
<210> 143
<211> 28
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 143
cgaatgagacgatcttgtgttccgactc 28
<210> 144
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 144
tcagtgcattaggcaagctaatactgct 28
<210> 145
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 145
tgcctaatactgactgaccgaaaaagaaca 28
<210> 146
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 146
agatcgtctcattcggactggtatagtt 28
<210> 147
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 147
gttcgagcccgataagcgagtttctcac 28
<210> 148
<211> 28

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 148
agatcgtctcattcggactggtatagtt 28
<210> 149
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 149
cgaatgagacgatcttgtgttccgactc 28
<210> 150
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 150
tcagtgcattaggcaagctaattgctgct 28
<210> 151
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 151
tgcctaattgcactgaccgaaaaagaaca 28
<210> 152
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 152
ttatcgggctcgaacacagaacctgcga 28
<210> 153

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 153
taatacgactcactataggg 20
<210> 154
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 154
atgctagttattgctcagcgg 21
<210> 155
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 155
tctgatctagatagggataacagggtaatcaaccaattaaccaattctgattagaa 56
<210> 156
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 156
ggaaaggatccgcggccgcacgttggtgtctcaaaatctc 40
<210> 157
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 157
ttttttctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatataccatgctagagtggaaaccgaaaccg 70

<210> 158
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 158
tttttggatcctcgagttaaacgcgaggttccgcag 36
<210> 159
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 159
tttttagatctccctgttgacaattaatcatcgg 34
<210> 160
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 160
ctgtttctagatcctgtgtgaaattgttatccgc 34
<210> 161
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 161
tttttagatctccctgttgacaattaatcatcgg 34
<210> 162
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 162

tttttgaattcgagctcggtagccaataattttgtttaactttaagaaggagatatacc 58

<210> 163

<211> 68

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 163

tgagctgacggcgcaaaaagtcaccagtgactcttcggttgaagcctgcttttttataactaagttgg 68

<210> 164

<211> 68

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 164

caacctgcgtttgtgaatatgggggaggtaatgaccttcccgctcaagttagtataaaaaagctgaac 68

<210> 165

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 165

tgcgatgacgacgaacacgc 20

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 166

gattaaccggcgtctgacgac 21

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 167
tgcgatgacgacgaacacgc 20
<210> 168
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 168
gattaaccggcgtctgacgac 21
<210> 169
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 169
tttttggatcctcgagttaaacgcgaggttccgcag 36
<210> 170
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 170
tttttgagctcgaattcttaaacgcgaggttccgcag 37
<210> 171
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 171
ctgacgacgacagtgatcgagcagctcttcttttggtcagctgaagcctgcttttttataactaagttgg 68
<210> 172
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 引物

<400> 172

ctctggttgatctgtttgagcaggccgtttcccggttacgccgctcaagttagtataaaaaagctgaac 68

<210> 173

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 173

caaatgcgattgtcgaggcg 20

<210> 174

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 174

ccggcggttcaacctgaatcc 20

<210> 175

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 175

caaatgcgattgtcgaggcg 20

<210> 176

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 176

ccggcggttcaacctgaatcc 20

<210> 177

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 177
agggcagatagcaggcataa 20
<210> 178
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 178
tctgattgttttcctgagttttc 23
<210> 179
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 179
agggcagatagcaggcataa 20
<210> 180
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 180
tctgattgttttcctgagttttc 23
<210> 181
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 181
ccatgattacgaattcattttttcaatgtg 30
<210> 182
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 182

atggattcctccttacggtgttatatgtcc 30

<210> 183

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 183

taaggagggaatccatatgccggaagcacca 30

<210> 184

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 184

gatccccgggtaccgagctcctcgagttaattact 35

<210> 185

<211> 612

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 变异体

<400> 185

Met Pro Glu Ala Pro Lys Ile Ala Ala Leu Glu Val Ser Asp Glu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Glu Lys Asn Lys Asn Lys Leu Gln Phe Ile Glu Asp Val Thr

20 25 30

Thr Asn Ala Asp Asp Val Gln Arg Arg Val Leu Glu Glu Ile Leu Ser

35 40 45

Arg Asn Ala Asp Val Glu Tyr Leu Lys Arg His Gly Leu Glu Gly Arg

50 55 60

Thr Asp Arg Glu Thr Phe Lys His Ile Met Pro Val Val Thr Tyr Glu

65 70 75 80

Asp Ile Gln Pro Glu Ile Asn Arg Ile Ala Asn Gly Asp Lys Ser Gln

				85					90					95			
Val	Leu	Cys	Ser	Asn	Pro	Ile	Ser	Glu	Phe	Leu	Thr	Ser	Ser	Gly	Thr		
				100					105					110			
Ser	Gly	Gly	Glu	Pro	Lys	Leu	Met	Pro	Thr	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Asp		
				115					120					125			
Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Leu	Leu	Met	Pro	Val	Met	Asp	Gln	Phe		
				130					135					140			
Val	Pro	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Lys	Gly	Met	Tyr	Phe	Leu	Phe	Ile	Lys		
145									150					155			160
Pro	Glu	Ser	Lys	Thr	Pro	Gly	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr		
				165					170					175			
Ser	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Ser	His	Phe	Lys	Asn	Arg	Pro	Tyr	Asp	Pro	Tyr		
				180					185					190			
Thr	Asn	Tyr	Thr	Ser	Pro	Asn	Gln	Thr	Ile	Leu	Cys	Ser	Asp	Ser	Tyr		
				195					200					205			
Gln	Ser	Met	Tyr	Ser	Gln	Met	Leu	Cys	Gly	Leu	Cys	Gln	His	Lys	Glu		
				210					215					220			
Val	Leu	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Phe	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Arg	Ala	Ile		
225									230					235			240
Lys	Phe	Leu	Glu	Lys	His	Trp	Pro	Glu	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Arg	Thr		
				245					250					255			
Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Ile	Thr	Asp	Ser	Ser	Val	Arg	Glu	Ala	Val		
				260					265					270			
Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Pro	Asp	Pro	Lys	Leu	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser		
				275					280					285			
Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Ser	Trp	Gln	Gly	Ile	Ile	Thr	Arg	Leu	Trp	Pro		
				290					295					300			
Asn	Thr	Lys	Tyr	Val	Asp	Val	Ile	Val	Thr	Gly	Thr	Met	Ser	Gln	Tyr		
305									310					315			320
Ile	Pro	Thr	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	Cys	Thr		
				325					330					335			
Gly	Tyr	Ala	Ser	Ser	Glu	Cys	Val	Phe	Gly	Val	Asn	Leu	Arg	Pro	Leu		
				340					345					350			
Cys	Lys	Pro	Ser	Glu	Val	Ser	Tyr	Thr	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Ala	Tyr		
				355					360					365			
Phe	Glu	Phe	Leu	Pro	Val	His	Arg	Asn	Ser	Gly	Val	Thr	Ser	Ser	Ile		
				370					375					380			
Ser	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Val	Asp		
385									390					395			400

Leu Val Asp Val Lys Leu Gly Gln Glu Tyr Glu Leu Val Val Thr Thr		
405	410	415
Tyr Ala Gly Leu Tyr Arg Tyr Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Val Ala		
420	425	430
Gly Phe Lys Asn Asn Ala Pro Gln Phe Ser Phe Ile Cys Arg Lys Asn		
435	440	445
Val Val Leu Ser Ile Asp Ser Asp Lys Thr Asp Glu Val Glu Leu Gln		
450	455	460
Asn Ala Val Lys Asn Ala Val Thr His Leu Val Pro Phe Asp Ala Ser		
465	470	475
Leu Ser Glu Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Thr Ser Ser Ile Pro Gly His		
485	490	495
Tyr Val Leu Phe Trp Glu Leu Cys Leu Asn Gly Asn Thr Pro Ile Pro		
500	505	510
Pro Ser Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Thr Ile Glu Glu Ser Leu Asn		
515	520	525
Ser Val Tyr Arg Arg Gly Arg Val Ser Asp Lys Ser Ile Gly Pro Leu		
530	535	540
Glu Ile Lys Met Val Glu Ser Gly Thr Phe Asp Lys Leu Met Asp Tyr		
545	550	555
Ala Ile Ser Leu Gly Ala Ser Ile Asn Gln Tyr Lys Thr Pro Arg Cys		
565	570	575
Val Lys Phe Ala Pro Ile Ile Glu Leu Leu Asn Ser Arg Val Val Asp		
580	585	590
Ser Tyr Phe Ser Pro Lys Cys Pro Lys Trp Ser Pro Gly His Lys Gln		
595	600	605

Trp Gly Ser Asn
610

<210> 186

<211> 1839

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 变异体

<400> 186

```

atgccggaag caccaaaaaat cgcagcctta gaagtcagt atgagagcct ggctgagaaa 60
aacaaaaaca agctgcaatt tatcgaagat gttaccacca acgctgacga tgtgcaacgt 120
cgcggttctgg aagaaaattct gagtcgtaat gcggacgtag aatatctgaa acgccatggt 180
ctggaaggcc gaaccgatcg cgagaccttc aagcacatca tgccggttgt gacgtacgaa 240

```

gatatccaac ccgaaatcaa ccgtattgcg aatggcgaca aatcgcaggt tctgtgttcg 300
 aacccgataa gcgagtttct caccagttcc ggtacctcag gcggagaacc gaaacttatg 360
 ccgacgatcg aggaagaact ggatcgtcgg agtctgctgt actcactcct tatgcccgtc 420
 atggatcagt ttgttccggg gttagataaa gggaaaggga tgtacttcct cttcatcaag 480
 ccggaatcga aaacccctgg tggctctgcct gcacgtcccg cgctgacctc gtattacaag 540
 tcctctcact tcaagaatcg accttacgat ccgtatacca actataccag tccgaatcag 600
 acgatcttgt gttccgactc ctaccaatcg atgtacagcc agatgctttg cggctctgtgt 660
 cagcacaagaag aagtgtcgcg tgttggcgcg gcgtttgccg gcgggtttat tcgcgcaatc 720
 aaattttctgg agaaacactg gccggaattg gcgcgcgaca ttcgcacagg cactctgagc 780
 agcgaaatta cggattccag cgttcgcgaa gcagtgggag agattctgaa acccgatcct 840
 aaactggcgg atttcgtcga aagtgaatgt cgcaaaacat cttggcaggg aattattacg 900
 cggctatggc caaataccaa atatgttgac gtgattgtca ctggcaccat gagccagtac 960
 attccgacac ttgactatta ctcgaaacggc ttaccgttag tctgcacggg ctatgcgagc 1020
 agtgaatgcg tgtttggagt gaatctcagg ccactatgca aaccatctga agtatcttac 1080
 acccttatcc cgaacatggc ctatttcgag ttcttccggg tccatcgtaa ctcaggcgta 1140
 actagcagca ttagcttgcc taaagcactg accgaaaaag aacaacagga gttagtagat 1200
 ctggtagacg tgaagctggg ccaggaatat gagttagtcg tcacaacgta tgccggctctg 1260
 tatcggtatc gcgtgggtga tgtgctgagt gtagccggat tcaaaaataa tgctccgcag 1320
 tttagcttta tctgccgtaa aaacgtgggt ctctccattg actctgacaa gacggatgaa 1380
 gtggaattgc aaaatgctgt gaaaaacgcc gtaacgcac tggttccgtt tgatgcctca 1440
 ctgtcagaat atacctcgta tgcggatact tcttctatc caggtcatta cgtgctgttc 1500
 tgggaattgt gtctgaatgg caacactccg atacctccgt ctgtgtttga ggattgctgc 1560
 ttgaccattg aagagagctt aaatagcgtg tatcgccgtg gccgtgtgtc cgacaaaagc 1620
 attggtccac tggagatcaa gatggtggaa tcgggtactt ttgataagtt gatggattat 1680
 gcgatttctt taggcgcgtc catcaaccag tacaaaacac caagatgcgt caaatcgcg 1740
 ccgattatcg agctcctgaa ctcacgtgtg gttgacagct atttttcccc caaatgtccg 1800
 aaatggtcac cggggcataa acagtggggt agtaattaa 1839

<210> 187

<211> 83

<212> PRT

<213> 加州月桂

<400> 187

Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser	Ala	Phe	Cys	Ser	Met	Lys	Ala	Val
1				5					10					15	
Met	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Leu
			20					25					30		
Gln	Leu	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Lys	Met	Ile	Asn	Gly
		35					40					45			
Thr	Lys	Phe	Ser	Tyr	Thr	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	Leu	Pro	Asp	Trp	Ser

50	55	60														
Met	Leu	Phe	Ala	Val	Ile	Thr	Thr	Ile	Phe	Ser	Ala	Ala	Glu	Lys	Gln	
65					70					75					80	
Trp	Thr	Asn														

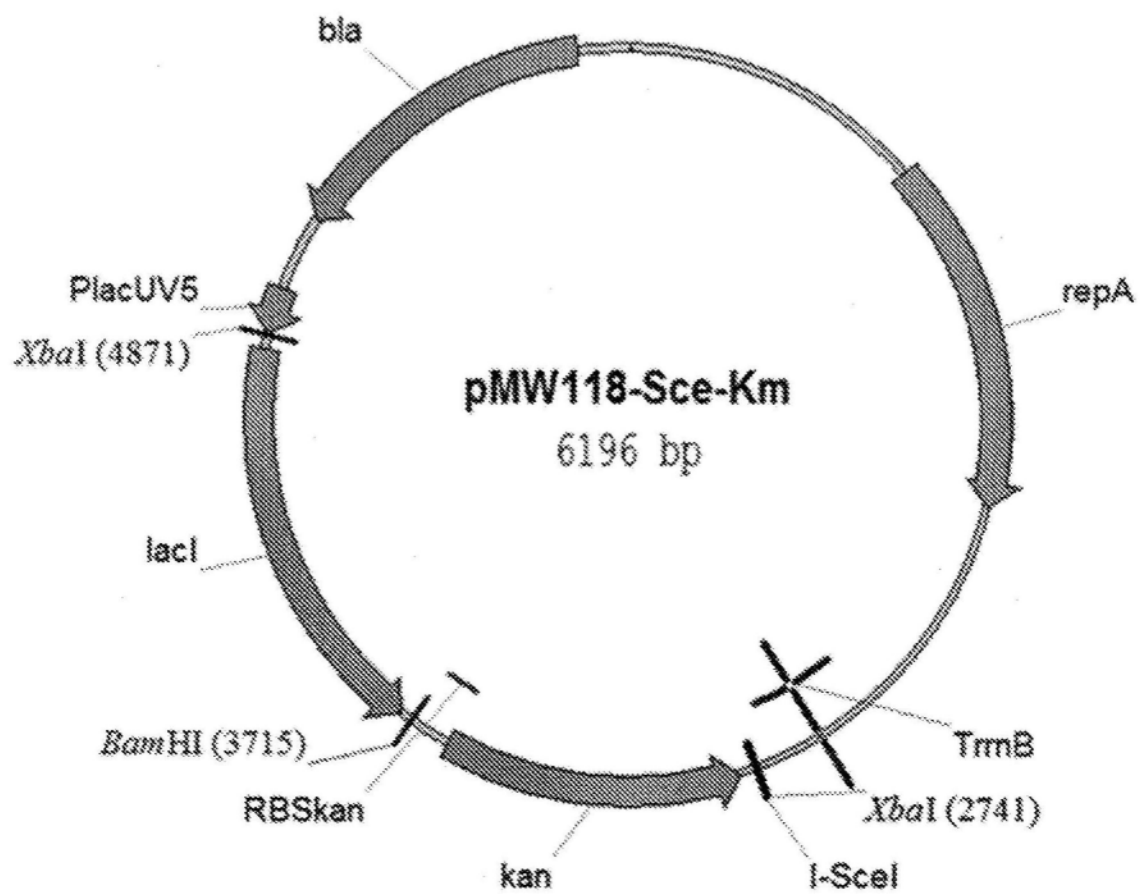


图1

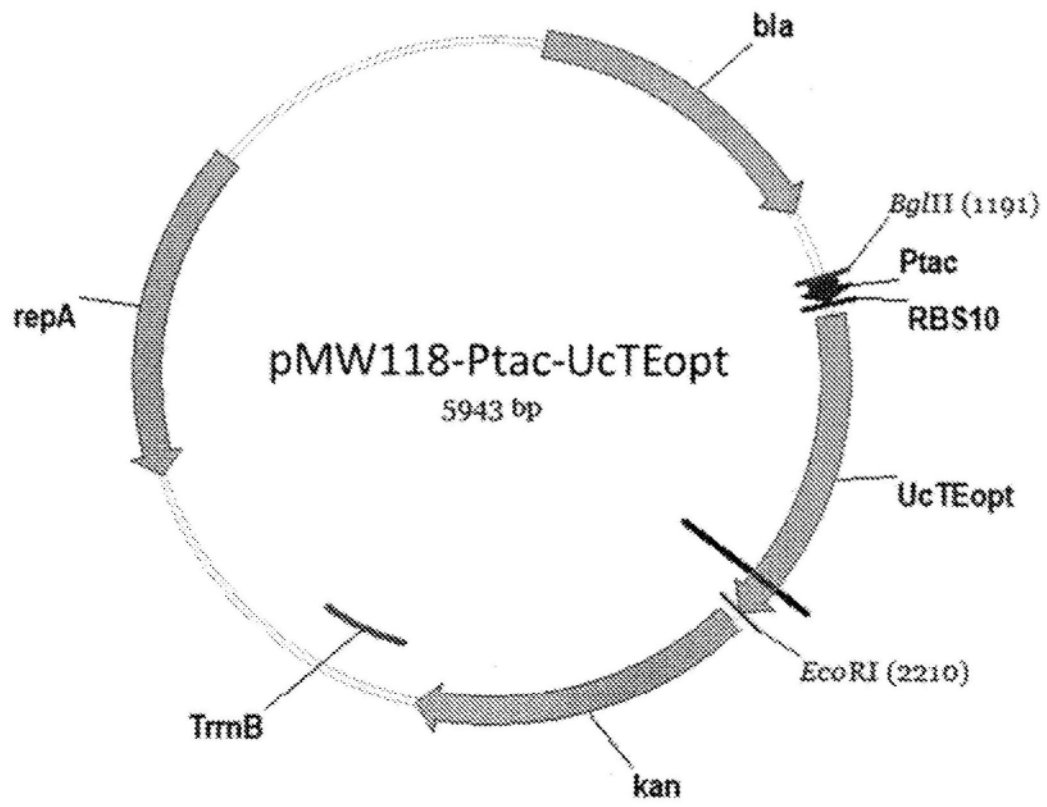


图2

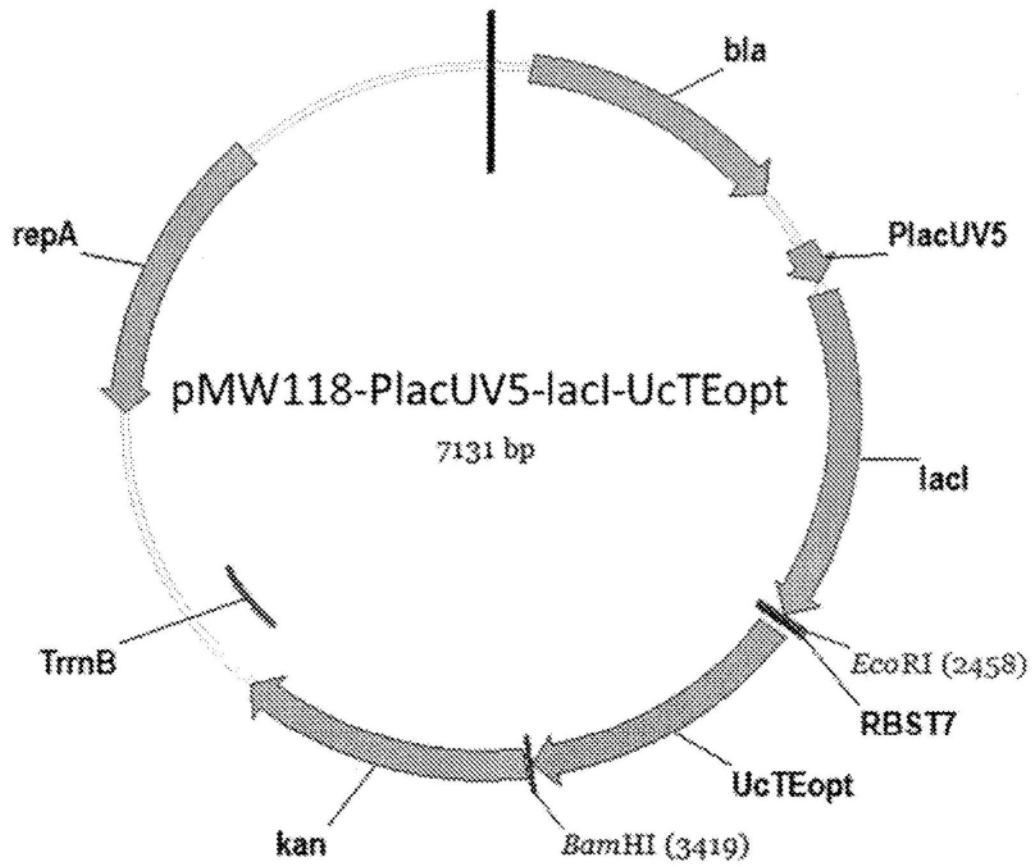


图3

(1) AtGH3-6的氨基酸序列

```

MPEAPKIAAL EVSDESLAEK NKNKLQFIED VTTNADDVQR RVLEEILSRN ADVEYLKRHG
LEGRTDRETF KHIMPVVTYE DIQPEINRIA NGDKSQVLCS NPISEFLTSS GTSGGERKLM
PTIEEELDRR SLLYSLLMPV MDQFVPGLDK GKGMFLFIK SESKTPGGLP ARPVLTSYYK
SSHFKNRPYD PYTNYTSPNQ TILCSDSYQS MYSQMLCGLC QHKEVLRVGA VFASGFIRAI
KFLEKHWPEL ARDIRTGTLS SEITDSSVRE AVGEILKPDP KLADFVESEC RKTSWQGIIT
RLWPNTKYVD VIVTGTMSQY IPTLDYYSNG LPLVCTMYAS SECYFGVNLR PLCKPSEVSY
TLIPNMAYFE FLPVHRNSGV TSSISLPKAL TEKEQQELVD LVDVKLGQEQY ELVVTTYAGL
YRVRVGDVLS VAGFKNNAPQ FSFICRKNV LSIDSDKTDE VELQNAVKNA VTHLVFPDAS
LSEYTSYADT SSIPGHYVLF WELCLNGNTP IPPSVFEDCC LTIEESLNSV YRQGRVSDKS
IGPLEIKMVE SGTFDKLMDY AISLGASINQ YKTPRCVKFA PIIELLNSRV VDSYFSPKCP
KWSPGHKQWG SN (序列编号1)

```

(2) UcTE的氨基酸序列

```

MATTSLASAF CSMKAVMLAR DGRGMKPRSS DLQLRAGNAP TSLKMINGTK FSYTESLKRL
PDWSMLFAVI TTIFSAAEKQ WTNLEWKPKP KLPQLDDHF GLHGLVFRRT FAIRSYEVGP
DRSTSILAVM NHMQEATLNH AKSVGILGDG FGTTLEMSKR DLMWVVRRT VAVERYPTWG
DTVEVECWIG ASGNNGMRRD FLVRDCKTGE ILTRCTSLSV LMNTRTRRLS TIPDEVGEI
GPAFIDNVAV KDDEIKKLQK LNDSTADYIQ GGLTPRWNDL DVNQHVNNLK YVAWVFETVP
DSIFESHHS SFTLEYRREC TRDSVLRSLT TVSGGSSEAG LVCDHLLQLE GGSEVLRART
EWRPKLTDSF RGISVIPAEF RV (序列编号3)

```

图4