

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

日 本國(地區) 申請專利，申請日期 1996-9-17 案號 8-244451 ，☐有 ☒無主張優先權
1996-10-28 8-285066

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明()

技術領域

本發明為關於作為防禦細菌、病毒等之感染、於心血管損害之適應及免疫治療有用之複合糖質的製造方法及作為該複合糖質之合成受質之重要的糖核苷酸之製造方法。

背景技術

糖核苷酸之製造方法已知有1)化學合成法[Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307(1973)、Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275(1973)、J. Org. Chem., 57, 146(1992)、Carbohydr. Res., 242, 69(1993)]、2)使用酵素之製造方法[J. Org. Chem., 55, 1834(1990)、J. Org. Chem., 57, 152(1992)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159(1988)、特表平7-508413、特表平7-5000248、W096/27670]、3)使用酵母等之微生物菌體之方法(特公昭45-2073、特公昭46-40756、特公昭47-1837、特公昭47-26703、特公昭49-8278、特開平2-268692)、4)由耐鹽性酵母之微生物菌體之萃取法(特開平8-23993)等。

於1)之方法中，需要昂貴的核苷-5'-一磷酸(以下，簡稱NMP)之嗎啉酸鹽衍生物和糖磷酸等，於2)之方法中，需要核苷-5'-二磷酸(以下，簡稱NDP)、核苷-5'-三磷酸(以下，簡稱NTP)、磷酸烯醇丙酮酸、糖磷酸等之昂貴原料和丙酮酸激酶等多數酵素，於3)之方法中，需要菌體之乾燥處理等。包含4)方法之上述任何方法，均使用昂貴的核苷酸和糖磷酸等作為原料，因為操作上之大量生產困難，故至今日，並未確立出糖核苷酸以工業性規模之製造方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

複合糖質之製造方法已知有1)化學合成法[Method in Enzymol. 247, 193(1994)、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 21, 155(1982)、Carbohydr. Res. 211, c1(1991)]、2)使用水解酶[Anal. Biochem. 202, 215(1992)、Trends Biotechnol. 6, 256(1988)之方法、及3)利用糖轉移酶(特開平7-79792、特表平7-500248、特公平5-82200、W094/25614、特表平9-503905、USP5,583,042)之方法。

1)之方法為了立體選擇性地合成，而必須導入保護基，2)之方法為產率、選擇性不夠充分，3)之方法中則需要NDP、NTP、磷酸烯醇丙酮酸、糖磷酸、或糖核苷酸等昂貴原料和丙酮酸激酶等多種酵素，於任何方法中均未確立複合糖質的廉價工業性製造方法。又，僅以廉價的核苷酸之前驅物質及糖及複合糖質前驅物質作為原料，直接工業性製造複合糖質之方法仍為未知。

已有經由在屬於棒狀桿菌屬之微生物中，添加乳清酸，生產UMP之報告[Amino Acid, Nucleic Acid, 23, 107(1971)]。又，亦已知以乳清酸為原料生成胞苷二磷酸膽鹼之方法已知(特開平5-276974)。

發明之揭示

本發明之目的為提供於防禦細菌、病毒等之感染、於心血管損害之適應及免疫治療等中有用的複合糖質之製造方法及作為該複合糖質之合成受質之重要的糖核苷酸之廉價且有效率的製造方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

本發明者等對於使用微生物、以核苷酸之前驅物質作為原料之複合糖質及糖核苷酸之生產進行致力檢討，結果發現僅以核苷酸之前驅物質及糖作為原料，則可有效率地生產糖核苷酸、且經由強化參與糖核苷酸生成之基因的表現，則可提高及生產性，並且再發現可生產該糖核苷酸之微生物、及利用具有由糖核苷酸和複合糖質前驅物質生產複合糖質能力之微生物或動物細胞或昆蟲細胞，且僅以核苷酸之前驅物質及糖及複合糖質前驅物質作為原料，即可有效率地生產複合糖質，並到達完成本發明。

本發明為提供使用 a) 是有由核苷酸之前驅物質生產 NTP 能力之微生物培養液或該培養液之處理物及 b) 具有由糖和 NTP 生產糖核苷酸能力之微生物培養液或該培養液之處理物及 c) 糖核苷酸和複合糖質前驅物質生產複合糖質能力之微生物、動物細胞或昆蟲細胞之培養液或該培養液之處理物作為酵素源，令此些酵素源、核苷酸之前驅物質、糖及複合糖質前驅物質存在於水性介質中，使得於該水性介質中生成蓄積複合糖質，並由該水性介質中採集複合糖質為其特徵之複合糖質的製造方法、使用 a) 具有由核苷酸之前驅物質生產 NTP 能力之微生物培養液或該培養液之處理物及 b) 具有由糖和 NTP 生產糖核苷酸能力之微生物培養液或該培養液之處理物作為酵素源，令此些酵素源、核苷酸之前驅物質及糖存在於水性介質中，使得於該水性介質中生成蓄積糖核苷酸，並由該水性介質中採集糖核苷酸為其特徵之糖核苷酸的製造方法、及使用具有由糖核苷酸和複合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

糖質前驅物質生產複合糖質能力之微生物、動物細胞或昆蟲細胞之培養液或該培養液之處理液作為酵素源，令該酵素源、複合糖質前驅物質及依據上述記載之糖核苷酸的製造方法所得之糖核苷酸存在於水性介質中，使得於該水性介質中生成蓄積複合糖質，並由該水性介質中採集複合糖質為其特徵之複合糖質的製造方法。再者，提供使用半乳糖激酶活性強之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，令該酵素源及N-乙醯葡萄糖胺存在於水性介質中，使得於該水性介質中生成蓄積N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸，並由該水性介質中採集N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸為其特徵之N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸的製造方法。

圖面之簡單說明

圖1為示出表現質體pPA31及pPAC31的作成工程。

圖2為示出galU、ppa基因表現質體pNT12及pNT32的作成工程。

圖3為示出galT、galK基因表現質體pNT25的作成工程。

圖4為示出galT、galK基因於產氨棒狀桿菌中表現之質體pTK7的作成工程。

圖5為示出glmU、ppa基因表現質體pNT14的作成工程。

圖6為示出pgm基因表現質體pNT24的作成工程。

圖7為示出glm基因表現質體pNT44的作成工程。

圖8為示出glk基因表現質體pNT46的作成工程。

圖9為示出pfkB基因表現質體pNT47的作成工程。

圖10為示出galK基因表現質體pNT54的作成工程。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 ()

圖 11 為示出 *manB*、*manC* 基因表現質體 pNK7 的作成工程。

圖 12 為示出 *pgm*、*pfkB* 基因表現質體 pNT55 的作成工程。

圖 13 為示出 *gmd*、*wcaG* 基因表現質體 pNK8 的作成工程。

圖 14 為示出 *neuA* 基因表現質體 pTA14 的作成工程。

圖 15 為示出 *lgtC* 基因表現質體 pGT3 的作成工程。

圖 16 為示出 *lgtB* 基因表現質體 pNT60 的作成工程。

於第 1-(1) 表及第 1-(2) 表中記述本發明所使用之縮寫及該縮寫之說明。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

第 1-(1) 表

Glc	葡萄糖
G-6-P	葡萄糖-6-磷酸
G-1-P	葡萄糖-1-磷酸
Glc-1, 6-P2	葡萄糖-1,6-二磷酸
Gal	半乳糖
Gal-1-P	半乳糖-1-磷酸
GlcN-6-P	葡萄糖胺-6-磷酸
GlcN-1-P	葡萄糖胺-1-磷酸
GlcUA	葡萄糖醛酸
GlcN	葡萄糖胺
GlcNAc	N-乙醯葡萄糖胺
GlcNAc-1-P	N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸
F-6-P	果糖-6-磷酸
F-1, 6-P2	果糖-1,6-二磷酸
Man	甘露糖
Man-6-P	甘露糖-6-磷酸
Man-1-P	甘露糖-1-磷酸
GDP-4-keto-6-deoxyMan	鳥嘌呤核甘-5-二磷酸-4-酮基-6-脫氧甘露糖
ManNAc	N-乙醯甘露糖胺
NeuAc	N-乙醯神經胺酸
乙醯CoA	乙醯輔酶A
NTP	核甘-5'-三磷酸
NDP	核甘-5'-二磷酸
NMP	核甘-5'-單磷酸
ATP	腺甘-5'-三磷酸
UTP	尿甘-5'-三磷酸
GTP	鳥甘-5'-三磷酸
CTP	胞甘-5'-三磷酸
GMP	鳥甘-5'-單磷酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

第 1-(2) 表

UDP-Glc	尿 苷 -5'-二 磷 酸 葡 萄 糖
UDP-Gal	尿 苷 -5'-二 磷 酸 半 乳 糖
UDP-GlcNAc	尿 苷 -5'-二 磷 酸 N-乙 醯 葡 萄 糖 胺
UDP-GalNAc	尿 苷 -5'-二 磷 酸 N-乙 醯 半 乳 糖 胺
UDP-GlcUA	尿 苷 -5'-二 磷 酸 葡 萄 糖 醛 酸
GDP-Man	鳥 苷 -5'-二 磷 酸 甘 露 糖
GDP-Fuc	鳥 苷 -5'-二 磷 酸 岩 藻 糖
CMP-NeuAc	胞 苷 -5'-單 磷 酸 N-乙 醯 神 經 胺 酸
galU	葡 萄 糖 -1-磷 酸 尿 苷 醯 轉 移 酶
ppa	(Innorganic) 焦 磷 酸 酶
galK	半 乳 糖 激 酶
galT	半 乳 糖 -1-磷 酸 尿 苷 醯 轉 移 酶
glmU	N-乙 醯 葡 萄 糖 胺 -1-磷 酸 尿 苷 醯 轉 移 酶 葡 萄 糖 胺 -1-磷 酸 乙 醯 轉 移 酶
pgm	磷 酸 葡 萄 糖 變 位 酶
pfkB	磷 酸 果 糖 激 酶
glmM	磷 酸 葡 萄 糖 變 位 酶
glk	葡 萄 糖 激 酶
manB	磷 酸 甘 露 糖 變 位 酶
manC	甘 露 糖 -1-磷 酸 鳥 苷 醯 轉 移 酶
gmd	GDP-甘 露 糖 -4,6-脫 水 酶
wcaG	GDP-4-酮 基 -6-脫 氧 甘 露 糖 表 異 構 酶 / 還 原 酶
neuA	CMP-N-乙 醯 神 經 胺 酸 合 成 酶
neuB	N-乙 醯 神 經 胺 酸 合 成 酶
nanA	N-乙 醯 神 經 胺 酸 醛 縮 酶
pyrG	胞 苷 -5'-三 磷 酸 合 成 酶
lgtB	β 1,4-半 乳 糖 基 轉 移 酶
lgtC	α 1,4-半 乳 糖 基 轉 移 酶
ugd	UDP-葡 萄 糖 脫 氫 酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明()

若依據本發明，則可提供具有1)不需要NTP和糖磷酸等昂貴原料，且僅以乳清酸等之廉價核苷酸之前驅物質及糖作為原料，2)於NMP或NDP轉換成NTP中，不需要添加昂貴的磷酸烯醇丙酮酸和丙酮酸激酶，並且，3)不需要酵素之單離操作等特徵之糖核苷酸的新穎製造方法及利用該糖核苷酸製造方法之新穎複合糖質的製造方法。

本發明之製造方法所製造之糖核苷酸可列舉具有核苷-5'-二磷酸殘基之末端磷基與糖殘基之還原基以酯鍵所構成之一般構造的化合物，再者，核苷酸殘基為胞苷-5'-單磷酸者、糖殘基為多元醇者亦被包含於依據本發明所製造之糖核苷酸。

本發明之製造方法所製造之複合糖質可列舉單糖、寡醣、結合至載體等之單糖或寡醣、蛋白質、胜肽、脂質、糖蛋白質、糖脂質、糖胜肽或類固醇化合物等糖質所結合之化合物。

以下詳細說明本發明。

1)本發明所使用之具有由核苷酸之前驅物質生產NTP能力之微生物，若為具有由核苷酸之前驅物質生產NTP能力之微生物則均可使用，可列舉例屬於埃希氏桿菌屬或棒狀桿菌屬之微生物。

於屬於埃希氏桿菌屬之微生物可列舉大腸桿菌。

於屬於棒狀桿菌屬之微生物可列舉產氨棒狀桿菌等。

2)本發明所使用之具有由糖和NTP生產糖核苷酸能力之微生物，若為具有生成目的糖核苷酸活性之生物則均可使

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

又，亦可使用(5)及(6)所選出一個以上酵素之活性、或(5)及(6)所選出之一個以上酵素和(1)至(4)所選出之一個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。該轉形株之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之galT及galK基因之重組體DNA(pNT25)的大腸桿菌NM522株及具有含來自大腸桿菌之galT及galK基因之重組體DNA(pTK7)的產氨棒狀桿菌ATCC 21170。



(5)：半乳糖激酶(EC2.7.1.6)

(6)：半乳糖-1-磷酸尿苷鹽轉移酶(EC2.7.7.12)

關於2)-③ UDP-GlcNAc之生產，則以使用下述式3所示之(7)至(12)及式1所示之(4)之酵素活性強的微生物、或式3所示之(13)及(10)之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬及棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

又，亦可使用(4)、(7)、(8)、(9)、(10)、及(13)所選出一個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。該轉形株之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之glmM基因之重組體DNA(pNT44)的大腸桿菌NM522株，具有含來自大腸桿菌之glmU及ppa基因之重組體DNA(pNT14)的大腸桿菌KY8415株、具有含來自大腸桿菌之glk基因之重組體DNA(pNT46)的大腸桿菌NM522株、具有含來自大腸桿菌之galK

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

基因之重組體 DNA(pNT54)的大腸桿菌 NM522株等。

經由基因重組之(8)磷酸葡萄糖胺變位酶活性之表現及增強上，雖必須添加 Glc-1, 6-P2[J.Biol. Chem., 271, 32(1996)]，但經由使用(11)及(12)酵素之活性以基因重組技術而增強之轉形株，則可不添加 Glc-1, 6-P2而可由 G-6-P及 F-6-P供給 Glc-1, 6-P2。

此類轉形體之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之 pgm 基因之重組體 DNA(pNT24)的大腸桿菌 NM522株、具有含來自大腸桿菌之 pfkB 基因之重組體 DNA(pNT47)的大腸桿菌 NM522株、具有含來自大腸桿菌之 pgm 及 pfkB 基因之重組體 DNA(pNT55)的大腸桿菌 NM522株。

經由使用(11)及(12)之酵素活性，由 G-6-P及 F-6-P供給 Glc-1,6-P2，令(8)之磷酸葡萄糖胺變位酶活性之表現增強之方法為本發明所首先揭示之方法。

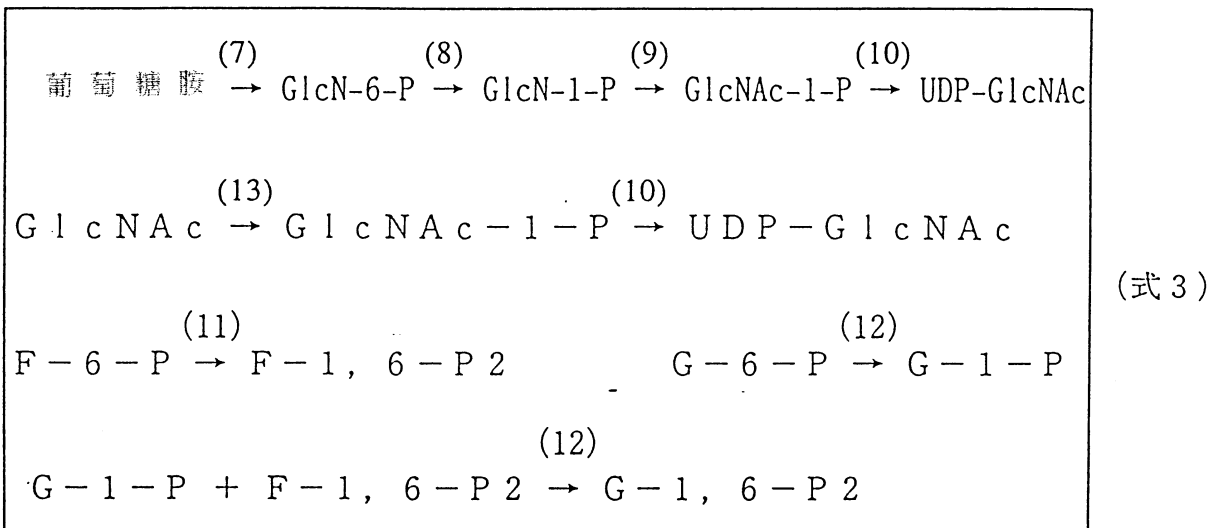
使用(13)之半乳糖激酶(EC2.7.1.6)由 Glc NAC製造 GlcNAc-1-P之方法為本發明所首先揭示之製造方法。使用該製造方法可製造 Glc NAc-1-P。即，使用半乳糖激酶活性強之微生物，例如具有含編碼 galk 基因之 DNA斷片和載體之重組體 DNA的微生物之培養液或該培養液之處理物作為酵素源，並令該酵素源及 GlcNAc存在於水性介質中，令該水性介質中生成蓄積 GlcNAc-1-P，並由該水性介質中採集 GlcNAc-1-P，即可製造 GlcNAc-1-P。

由水性介質進行 GlcNAc-1-P之採集，可使用活性炭和離子交換樹脂等經由通常之方法而進行。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()



(7)：己糖激酶 (EC2.7.1.1) 或葡萄糖激酶 (EC2.7.1.2)

(8)：磷酸葡萄糖胺變位酶

(9)：葡萄糖胺-1-磷酸乙醯轉移酶

(10)：N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸尿甘醯轉移酶

(EC2.7.7.23)

(11)：磷酸果糖激酶 (EC2.7.1.11)

(12)：磷酸葡萄糖變位酶 (EC2.7.5.1)

(13)：半乳糖激酶 (EC2.7.1.6)

關於 2)-④ UDP-GalNAc 之生產，則以使用下述式 3 所示之

(7) 至 (12) 及式 4 所示之 (14) 之酵素活性強的微生物、或式 3 所示之 (10)、(13) 及式 4 所示之 (14) 之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬及棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

又，亦可使用 (7) 至 (14) 及 (4) 所選出一個以上酵素之活

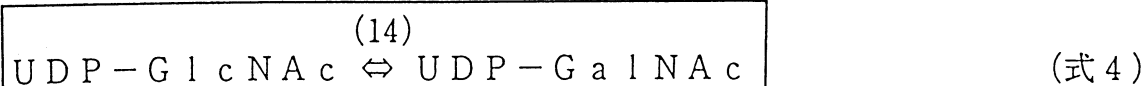
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 ()

性經由基因重組技術而增強之轉形株。



(14)：UDP-GlcNAc 4-表異構酶 (EC5.1.3.7)

關於 2)-⑤ UDP-GlcUA 之生產，則使用式 1 所示之 (1) 至 (4) 及式 5 所示之 (15) 之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬及棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

又，亦可使用 (1)、(2)、(3)、(4) 及 (15) 所選出一個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。



(15)：UDP-Glc 脫水酶 (EC1.1.1.22)

關於 2)-⑥ GDP-Man 之生產，則以使用下述式 6 所示之 (16) 至 (18) 及式 3 所示之 (11) 及 (12) 之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬及棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

又，亦可使用 (16)、(17) 及 (18) 所選出一個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。該轉形株之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之 manB 及 manC 基因之重組 DNA (pNK7) 的大腸桿菌 NM522 株、具有含來自大腸桿菌之 glk 基因之重組體 DNA (pNT46) 的大腸桿菌 NM522 株等。

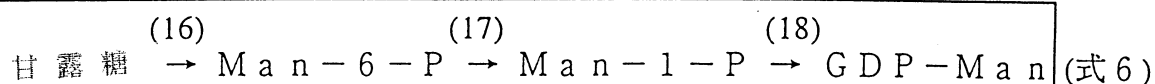
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

經由基因重組之(17)磷酸甘露糖胺變位酶活性之表現及增強上，雖必須添加Glc-1, 6-P2，但經由使用(11)及(12)酵素之活性以基因重組技術而增強之轉形株，則可不添加Glc-1, 6-P2而可由G-6-P及F-6-P供給Glc-1,6-P2。此類轉形體之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之pgm基因之重組體DNA(pNT24)的大腸桿菌NM522株、具有含來自大腸桿菌之pfkB基因之重組體DNA(pNT47)的大腸桿菌NM522株、具有含來自大腸桿菌之pgm及pfkB基因之重組體DNA(pNT55)的大腸桿菌NM522株。

經由使用(11)及(12)之酵素活性，由G-6-P及F-6-P供給Glc-1,6-P2，令(17)之磷酸甘露糖變位酶活性之表現增強之方法乃為本發明所首先揭示之方法。



(16)：己糖激酶(EC2.7.1.1)或葡萄糖激酶(EC2.7.1.2)

(17)：磷酸甘露糖變位酶(EC2.7.5.7)

(18)：甘露糖-1-磷酸鳥苷醯轉移酶(EC2.7.7.13)

關於2)-⑦ GDP-Fuc之生產，則以使用下述式7所示之(19)及(20)及式6所示之(16)至(18)及式3所示之(11)及(12)之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬及棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

又，亦可使用(16)、(17)、(18)、(19)及(20)所選出一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。該轉形株之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之 *manB* 及 *manC* 基因之重組 DNA (pNK7) 的大腸桿菌 NM522 株、具有含來自大腸桿菌之 *glk* 及 *wcaG* 基因之重組體 DNA (pNK8) 的大腸桿菌 NM522 株、具有含來自大腸桿菌之 *glk* 基因之重組體 DNA (pNT46) 的大腸桿菌 NM522 株等。

經由基因重組之 (17) 磷酸甘露糖胺變位酶活性之表現及增強上，雖必須添加 Glc-1, 6-P2，但經由使用 (11) 及 (12) 酵素之活性以基因重組技術而增強之轉形株，則可不添加 Glc-1, 6-P2 而可由 G-6-P 及 F-6-P 供給 Glc-1,6-P2。

此類轉形體之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之 *pgm* 基因之重組體 DNA (pNT24) 的大腸桿菌 NM522 株、具有含來自大腸桿菌之 *pfkB* 基因之重組體 DNA (pNT47) 的大腸桿菌 NM522 株、具有含來自大腸桿菌之 *pgm* 及 *pfkB* 基因之重組體 DNA (pNT55) 的大腸桿菌 NM522 株。



(19)：GDP-Man-4,6-脫水酶

(20)：GDP-4-酮基-6-脫氧甘露糖表異構酶/還原酶

關於 2)-⑧ CMP-NeuAc 之生產，則以使用下述式 8 所示之 (21)、(22) 或 (23)、(24) 及 (25) 之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬及棒狀桿菌屬之微生物，較佳之具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

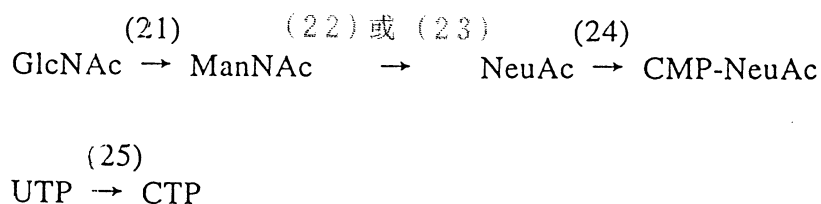
又，亦可使用 (21)、(22)、(23)、(24) 及 (25) 所選出一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。該轉形株之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之 nanA 基因之重組體 DNA (pNAL1) 的大腸桿菌 C600 株 [Appl. Environ. Microbiol., 51, 562 (1986)]、具有含來自大腸桿菌之 neuA 基因之重組體 DNA (pTA14) 的大腸桿菌 NM522 株等。



(式 8)

(21): GlcNAc 2-表異構酶 (EC5.1.3.8)

(22): NeuAc 醛縮酶 (EC4.1.3.3)

(23): NeuAc 合成酶 (EC4.1.3.19)

(24): CMP-NeuAc 合成酶 (EC2.7.7.43)

(25): CTP 合成酶 (EC6.3.4.2)

於微生物為同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2) 中記載之微生物性質之情形中，則可利用該微生物，由核苷酸之前驅物質和糖生產糖核苷酸。

於微生物為同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-① 中記載之性質之情形中，則可利用該微生物，由乳清酸等之 UTP 前驅物質和葡萄糖生產 UDP-Glc，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-② 中記載之微生物性質之情形中，則可利用該微生物，由乳清酸等之 UTP 前驅物質和半乳糖生產 UDP-Gal，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-③ 中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明()

記載之性質之情形中，則可利用該微生物，由乳清酸等之 UTP 前驅物質和由葡萄糖胺或 N-乙醯葡萄糖胺生產 UDP-GlcNAc，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-④ 中記載之性質之情形中，則可利用該微生物，由乳清酸等之 UTP 前驅物質和葡萄糖胺或 N-乙醯葡萄糖胺生產 UDP-GalNAc，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-⑤ 中記載之微生物性質之情形中，則可利用該微生物，由乳清酸等之 UTP 前驅物質和葡萄糖生產 UDP-GlcUA，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-⑥ 中記載之性質之情形中，則可利用該微生物，由 GMP 等之 GTD 前驅物質和甘露糖生產 GDP-Man，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-⑦ 中記載之性質之情形中，則可利用該微生物，由 GMP 等之 GTP 前驅物質和甘露糖生產 GDP-Fuc，於同時具有 1) 中記載之微生物性質及 2)-⑧ 中記載之性質之情形中，則可利用該微生物，由乳清酸等之 CTP 前驅物質和 N-乙醯葡萄糖胺或 N-乙醯甘露糖胺生產 CMP-NeuAc。

此類微生物的具體例可列舉表現來自大腸桿菌之 galT 及 galK 基因之產氨棒狀桿菌。

又，與上述之菌株不同，於 1 菌株中僅具有糖核苷酸之製造上所必須之部分活性之微生物之情形中，可適當組合具有各種活性的微生物，進行糖核苷酸之製造。

具有 1) 中記載性質之微生物亦不須為一種，以二種以上構成 1) 中記載性質時亦可利用作為具有 1) 中記載性質之微生物。具體而言，可例示表現來自大腸桿菌之 pyrG 基因之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

大腸桿菌和產氨棒狀桿菌之組合(特開平5-276974)。

同樣地，具有1)記載性質之微生物亦不須為一種，且可以二種以上所構成。經由適當組合該微生物群，則可生產目的之糖核苷酸，

例如，使用具有1)中記載性質之微生物及具有2)-①中記載性質之一種以上之微生物，則可由乳清酸等之UTP前驅物質和葡萄糖生產UDP-Glc，使用具有1)記載性質之微生物及具有2)-②記載性質之一種以上之微生物，則可由乳清酸等之UTP前驅物質和半乳糖生產UDP-Gal，使用具有1)記載性質之微生物及具有2)-③記載性質之一種以上之微生物，則可由乳清酸等之UTP前驅物質和葡萄糖胺或N-乙醯葡萄糖胺生產UDP-GlcNAc，使用具有1)記載性質之微生物及具有2)-④記載性質之一種以上之微生物，則可由乳清酸等之UTP前驅物質和葡萄糖胺或N-乙醯葡萄糖胺生產UDP-GalNAc，使用具有1)記載性質之微生物及具有2)-⑤記載性質之一種以上之微生物，則可由乳清酸等之UTP前驅物質和葡萄糖生產UDP-GlcUA，使用具有1)記載性質之微生物及具有2)-⑥記載性質之一種以上之微生物，則可由GMP等之GTP前驅物質和甘露糖生產GDP-Man，使用具有1)記載性質之微生物及具有2)⑦記載性質之一種以上之微生物，則可由GMP等之GTP前驅物質和甘露糖生產GDP-Fuc，使用具有1)中記載性質之微生物及具有2)-⑧中記載性質之一種以上之微生物，則可由乳清酸等之CTP前驅物質和N-乙醯葡萄糖胺或N-乙醯甘露糖胺生產CMP-NeuAc。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

衆

訂

五、發明說明 ()

如上述，於糖核苷酸之製造中，可利用基因重組微生物，參與該製造之第2表中所記載之微生物，為經由大腸桿菌之染色體被選殖化，並且已決定出其全部的鹼基序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

第 2 表

基 因	參 考 文 獻
g a l U 基 因	J. Biochem., <u>115</u> , 965 (1994)
p p a 基 因	J. Bacteriol., <u>170</u> , 5901 (1988)
g a l K 基 因	Nucleic Acids Res., <u>13</u> , 1841 (1985)
g a l T 基 因	Nucleic Acids Res., <u>14</u> , 7705 (1986)
g l m U 基 因	J. Bacteriol., <u>175</u> , 6150 (1993)
p g m 基 因	J. Bacteriol., <u>176</u> , 5847 (1994)
p f k B 基 因	Gene, <u>28</u> , 337 (1984)
g l m M 基 因	J. Biol. Chem., <u>271</u> , 32 (1996)
g l k 基 因	J. Bacteriol., <u>179</u> , 1298 (1997)
m a n B 基 因	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
m a n C 基 因	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
g m d 基 因	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
w c a G 基 因	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
n e u A 基 因	J. Biol. Chem., <u>264</u> , 14769 (1989)
n e u B 基 因	J. Bacteriol., <u>177</u> , 312 (1995)
n a n A 基 因	Nucleic Acids Res., <u>13</u> , 8843 (1985)
p y r G 基 因	J. Biol. Chem., <u>261</u> , 5568 (1986)
u g d 基 因	J. Bacteriol., <u>177</u> , 4562 (1995)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

關於由具有含有該基因之質體的大腸桿菌之質體DNA的單離精製、質體DNA以限制酶之切斷、切斷之DNA片段的單離精製、DNA片段的酵素性鍵結、使用重組體DNA之大腸桿菌的轉形等基因重組的各種操作，可依據公知的方法[例如J.Sambrook等之著書；Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second edition冷泉港實驗室(1989)]進行。又，聚合酶鏈反應(以下，簡稱PCR)可使用Perlicin Elmer Cytus公司製之Thermal Cyclers等進行。

為了令參與糖核苷酸製造之基因於宿主中表現，可將含有該基因之DNA片段，以限制酶類或PCR，作成含有該基因的適當長度之DNA片段後，插入表現載體中啟動基因的下流，其次將插入上述DNA之表現載體，導入表現載體所適合之宿主中，即可達成。

宿主可使用能表現目的基因之全部宿主。除了可列舉例如屬於埃希氏桿菌屬、沙雷氏菌屬、棒狀桿菌屬、短桿菌屬、假單胞菌屬、桿菌屬等之微生物以外，可列舉屬於酵母屬、念珠菌屬等之酵母等。

表現載體可使用於上述宿主中能獨立複製或可嵌入染色體中，並且在可轉錄參與糖核苷酸製造之基因之位置中含有啟動基因之表現載體。

於使用上述微生物作為宿主之情形中，以參與糖核苷酸製造之基因的表現載體可在微生物中獨立複製且同時由啟動基因、核糖體結合序列、參與糖核苷酸製造之基因、轉錄終止序列所構成較為佳。亦可包含控制啟動基因之基因。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

表現載體可例示例如 pBTrp2、PBtacl、pBTac2(均為 Boehringer Mannheim 公司製)、pKYP10(特開昭 58-110600)、pKYP200[Agri. Biol. Chem., 48, 669(1984)]、pLSA1[Agri. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 82, 4306(1985)]、pBluescript II Sk+ (STRATAGENE 公司製)、pTrS 30[由大腸桿菌 JM109/pTrS30(FERM BP-5407)所調製]及 pTrS 32[由大腸桿菌 JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)所調製]、pUC19[Gene, 33, 103(1985)]、pSTV28(寶酒造公司製)、pPA1(特開昭 63-233798)、pCG11(特公平 6-91827)等。

啟動基因若為可在上述宿主中表現，則任何物質均可。可列舉例如 trp 啟動基因、lac 啟動基因、P_L 啟動基因、P_R 啟動基因等之來自大腸桿菌和噬菌體等之啟動基因。又，亦可使用令二個 trp 啟動基因直列之啟動基因、如 tac 啟動基因般經人工地設計改變之啟動基因等。

核糖體結合序列若為可在上述宿主中表現，則任何物質均可，但以使用令核糖體結合序列與起始密碼子之間調節至適當距離(例如 6~18 個鹼基)之質體為較佳。

令參與糖核苷酸製造之基因表現上，並非必定需要轉錄終止序列，但較佳期望於構造基因之下游設置轉錄終結序列。

宿主亦可使用重組體 DNA 可表現、且可利用於糖核苷酸生成反應之任何微生物，具體而言可列舉大腸桿菌 XL1-Blue、大腸桿菌 XL2-Blue、大腸桿菌 DH1、大腸桿菌 MC1000

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

、大腸桿菌 KY3276、大腸桿菌 W1485、大腸桿菌 JM109、大腸桿菌 HB101、大腸桿菌 No.49、大腸桿菌 W3110、大腸桿菌 NY49、大腸桿菌 KY8415、大腸桿菌 NM522、枯草枯菌、短桿菌、澱粉液狀桿菌、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、溶醴短桿菌 ATCC14066、黃色短桿菌 ATCC14067、乳酸醴酵短桿菌 ATCC13869、產氨棒狀桿菌 ATCC21170、麩胺醴胺棒狀桿菌 ATCC13032、嗜乙醴酸棒狀桿菌 ATCC13870、嗜氨細桿菌 ATCC15354、惡臭假單胞菌、黏質沙雷氏菌等。

於使用酵母菌株之情形中，其表現載體可例示例如 YEp 13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp 50(ATCC37419)等。

啟動基因若為可在酵母菌株之宿主中表現，則任何物質均可。可列舉例如，己糖激酶等之解糖系基因的啟動基因、gal 1啟動基因、gal 10啟動基因、熱衝擊蛋白質啟動基因、MF α 1啟動基因、CUP1啟動基因等之啟動基因。

宿主亦可使用重組體 DNA 可表現、且可利用於糖核苷酸

生成反應之任何酵母、具體而言可列舉 Saccharomyces cerevisiae、Candida utilis、Candida parapsilosis、Candida krusei、Candida versatilis、Candida lipolytica、Candida zeylanoides、Candida guilliermondii、Candida albicans、Candida humicola、Pichia farinosa、Pichia ohmeri、Torulopsis candida、Torulopsis sphaerica、Torulopsis xylinus、Torulopsis famata、Torulopsis versatilis、Debaryomyces

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

subglobosus、Debaryomyces cantarellii、Debaryomyces globosus、
Debaryomyces hansenii、Debaryomyces japonicus、Zygosaccharomyces rouxii、
Zygosaccharomyces bailii、Kluyveromyces lactis、Kluyveromyces marxianus、
Hansenula anomala、Hansenula jadinii、Brettanomyces lambicus、
Brettanomyces anomalus、Schizosaccharomyces pombe

、Trichosporon pullulans及Schwanniomyces alluvius
 等。

本發明所使用之微生物之培養，可依通常之培養方法進行。培養該微生物之培養基若為含有該微生物可資化之碳源、氮源、無機鹽類等，且可有效率進行該微生物培養之培養基，則不論天然培養基、合成培養基均可使用。

碳源若為各微生物可資化之物質即可，且可使用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麥芽糖、甘露糖醇、山梨糖醇、糖蜜、澱粉或澱粉水解物等之碳水化合物、丙酮酸、乳酸、檸檬酸、反丁烯二酸等之各種有機酸、麩胺酸、甲硫胺酸、離胺酸等之各種胺基酸、乙醇、丙醇、甘油等之醇類。又，亦可使用白糖、木薯、蔗渣、玉米條浸液等之天然有機營養源。

氮源可使用氨、氯化銨、硫酸銨、碳酸銨、醋酸銨、磷酸銨等之各種無機及有機銨鹽類、麩胺酸、麩胺醯胺、甲硫胺酸等之胺基酸、蛋白胨、NZ胺、玉米條浸液、肉萃取

五、發明說明 ()

物、酵母萃取物、麥芽萃取物、酪蛋白水解物、大豆渣滓、大豆渣滓水解物、魚粉或其消化物等。

無機物可使用磷酸鉀、磷酸氫二鉀、磷酸鈉、磷酸氫二鈉、磷酸鎂、硫酸鎂、氯化鎂、氯化鈉、氯化鈣、硫酸亞鐵、硫酸錳、硫酸銅、硫酸鋅、碳酸鈣等。亦可視需要添加維生素、胺基酸、核酸等。

在振盪培養或通氣攪拌培養等之好氣性條件下進行培養。培養溫度以 15~45℃ 為佳，培養時間通常為 5~96 小時。培養中之 pH 為保持於 3.0~9.0。視需要，可使用無機或有機酸、鹼性溶液、尿素、碳酸鈣、氨、pH 緩衝液等進行培養基 pH 之調整。

又，於培養中，亦可視需要在培養基中添加安比西林和四環黴素等抗生素。

於培養使用誘導性啟動基因作為啟動基因之表現載體所轉形之微生物時，視需要，亦可於培養基中添加誘導物。例如，於培養使用 lac 啟動基因之表現載體所轉形之微生物時，亦可於培養基中添加異丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 等，於培養使用 trp 啟動基因之表現載體所轉形之微生物時，亦可於培養基中添加吲哚-3-乙酸 (IAA) 等。

於本發明之糖核苷酸之製造中，於使用二種以上微生物時，可將該微生物分別個別培養，並且利用該培養液使用於糖核苷酸之製造，且亦在一個培養器中同時植菌，且於混合培養後，利用該培養液使用於糖核苷酸之製造。又，亦可在其一之微生物培養中或培養終了時，植入剩餘的微

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

生物，並於培養後，利用該培養液使用於糖核苷酸之製造。再者，亦可將具有上述1)中記載性質之微生物和具有2)中記載性質之微生物分開培養，並利用各培養液使用於糖核苷酸之製造。

經由該培養所得之微生物培養液及該培養液經各種處理之培養液處理物可使用作為酵素源，且可使用於水性介質中糖核苷酸之生成。

培養液之處理物可列舉培養液之濃縮物、培養液之乾燥物、離心培養液所取得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、由培養上清液所得之酵素樣品、離心培養液所得之細胞(包含菌體)、該細胞之乾燥物、該細胞之冷凍乾燥物、該細胞之界面活性劑處理物、該細胞之超音波處理物、該細胞之機械性磨碎處理物、該細胞之溶劑處理物、該細胞之酵素處理物、該細胞之蛋白質分級物、該細胞之固定化物或由該細胞萃取所得之酵素樣品等。

糖核苷酸生成中所使用之酵素源份量，以濕菌體而言，以1~500g/l，較佳為5~300g/l。又，於同時使用二種以上之微生物於水性介質中進行反應之情形中，水性介質中之該微生物的全濕菌體量為2~500g/l，較佳為5~400g/l。

糖核苷酸生成中所使用之水性介質可列舉水、磷酸鹽、碳酸鹽、醋酸鹽、硼酸鹽、檸檬酸鹽、Tris等緩衝液、甲醇、乙醇等之醇類、醋酸乙酯等之酯類、丙酮等之酮類、乙醯胺等之醯胺類等。又，使用作為酵素源之微生物的培養液，可使用作為水性介質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

糖核苷酸生成中所使用之核苷酸之前驅物質可列舉乳清酸、尿嘧啶、乳清酸核苷、尿苷、胞嘧啶、胞苷、腺嘌呤、腺苷、鳥嘌呤、鳥苷、次黃嘌呤、肌苷、黃嘌呤、黃嘌呤核苷、肌苷-5'-單磷酸、黃嘌呤核苷-5'-單磷酸、鳥苷-5'-單磷酸、尿苷-5'-單磷酸及胞苷-5'-單磷酸等，較佳可列舉乳清酸及鳥苷-5'-單磷酸。該核苷酸之前驅物質為純品及該前驅物質之鹽且其夾雜物限於不阻礙反應，且可使用經由微生物發酵生產之含有該前驅物質之培養液及該培養液之該前驅物質粗略精製物。核苷酸之前驅物質為使用0.1mM~1.0M、較佳為0.01~0.3M之濃度。

糖核苷酸生成中所使用之糖可列舉葡萄糖、果糖、半乳糖、葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯半乳糖胺、甘露糖、岩藻糖、N-乙醯甘露糖胺、乙醯神經胺酸及其衍生物。該糖可使用純品，而若為含有其、且夾雜物不會阻礙反應者則均可使用。糖可在反應開始時一次添加，或於反應中分次、或連續添加亦可，且使用0.1mM~2.0M之濃度。

於糖核苷酸之生成中，視需要，亦可添加ATP再生所必須之能量供體，輔酶、磷酸離子、鎂離子、植酸等之嵌合劑、界面活性劑及有機溶劑。

能量供體可列舉葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麥芽糖、甘露糖醇、山梨糖醇等之碳水化合物、丙酮酸、乳酸、醋酸等之有機酸、甘胺酸、丙胺酸、天冬醯胺酸、麩胺酸等之胺基酸、糖蜜、澱粉水解物等，且可使用0.02~2.0M之濃度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

磷酸離子可列舉正磷酸、焦磷酸、三多磷酸、四多磷酸、多磷酸、多偏磷酸、磷酸鉀、磷酸氫二鉀、磷酸鈉、磷酸氫二鈉等之無機磷酸鹽等，且可使用 $1.0\text{mM} \sim 1.0\text{M}$ 之濃度。

鎂離子可列舉硫酸鎂、硝酸鎂、氯化鎂等之無機鎂鹽、檸檬酸鎂等之有機鎂鹽等，且通常為使用 $1 \sim 100\text{mM}$ 之濃度。

界面活性劑若為聚氧乙烯十八烷基胺(例如 Naimin S-215、日本油脂公司製)等之非離子界面活性劑、溴化鯨蠟基三甲基銨和氯化烷基二甲基苄基銨(例如 Cation F2-40E、日本油脂公司製)等之陽離子系界面活性劑、月桂醯替肌胺酸鹽等之陰離子系界面活性劑、烷基二甲基銨(例如三級胺 FB、日本油脂公司製)等之三級胺類等之促進各種糖核苷酸生成者則均可，且可使用1種或混合數種亦可。界面活性劑通常為使用 $0.1 \sim 50\text{g/l}$ 之濃度。

有機溶劑可列舉二甲苯、甲苯、脂族醇、丙酮、醋酸乙酯等，且通常為使用 $0.1 \sim 50\text{ml/l}$ 、較佳為 $1 \sim 20\text{ml/l}$ 之濃度。

糖核苷酸之生成反應為在水性介質中， $\text{pH}5 \sim 10$ 、較佳為 $\text{pH}6 \sim 9$ ， $20 \sim 50^\circ\text{C}$ 下 $2 \sim 96$ 小時之條件下進行。

經由該方法可生成糖核苷酸，且可列舉例如尿苷二磷酸化合物、鳥苷二磷酸及胞苷單磷酸化合物等。具體而言，可列舉 UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcNAc、UDP-GalNAc、UDP-GlcUA、GDP-Man、GDP-Fuc、CMP-NeuAc 及其衍生物所選出之糖核苷酸等。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 ()

水性介質中生成之糖核苷酸之定量，可依公知之方法進行，例如，UDP-Glc和UDP-Gal之分離定量可依據Anal. Biochem., 216, 188-194(1994)記載之高速液體層析(以下，簡稱HPLC)之方法進行。又，UDP-GlcNAc、GDP-Man、GDP-Fuc、CMP-NeuAc之分離定量可依據以下條件之HPLC進行。

溶出液：0.1M KH_2PO_4

(使用 H_3PO_4 調整 pH3.2)

流速：1毫升/分

柱：Partisil-10 SAX(Watoman公司製)

檢測：UV262nm

定量：經由標準吸光度值之比較而算出

反應液中所生成之糖核苷酸之精製可依據使用活性炭和離子交換樹脂等之通常方法予以進行，例如，於UDP-Gal及UDP-Glc可依據J. Org. Chem., 57, 152(1992)，於UDP-GlcNAc可依據J. Org. Chem., 57, 146(1992)記載之方法進行。

本發明複合糖質之製造中可使用之微生物或動物細胞或昆蟲細胞，若為具有由糖核苷酸和複合糖質前驅體生產複合糖質能力之微生物或動物細胞或昆蟲細胞則均可使用。可列舉例如具有葡萄糖基轉移酶、半乳糖基轉移酶、N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶、N-乙醯基半乳糖胺基轉移酶、葡萄糖醛酸基轉移酶、甘露糖基轉移酶、唾液酸基轉移酶及岩藻糖基轉移酶等活性之微生物或動物細胞或昆蟲細胞。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

又，與前述糖核苷酸之製造情形同樣地，亦可利用經由基因重組技術所作成之微生物或動物細胞或昆蟲細胞。可列舉例如表現來自人類黑色素瘤細胞 SK-Mel-28 細胞之神經醯胺葡萄糖基轉移酶基因之大腸桿菌 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 4638 (1996)]、產生 β 1,3-半乳糖基轉移酶之人類-黑色素瘤細胞 WM266-4 株 (ATCC CRL1676)、及含有來自人類-黑色素瘤細胞 WM266-4 之 β 1,3-半乳糖基轉移酶基因之 Namarva 細胞 KJM-1 株等重組株 (特開平 6-181759)、表現來自人類 Hela 細胞之 β 1,4-半乳糖基轉移酶基因之大腸桿菌 (EMBO J., 9, 3171 (1990)) 或釀酒酵母 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]、表現來自大鼠之 β 1,6-N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶基因之 COS-7 細胞 (ATCC, CRL1651) [J. Biol. Chem., 268, 15381 (1993)]、表現來自人類之 N-乙醯半乳糖胺基轉移酶基因之 Sf9 細胞 [J. Biochem., 118, 568 (1995)]、來自人類之表現葡萄糖醛酸轉移酶之大腸桿菌 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 473 (1993)]、表現來自人類之 α 1,3-岩藻糖基轉移酶之 Namarva 細胞 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)]、表現來自人類之 1,3/1,4-岩藻糖基轉移酶之 COS-1 細胞 [Genes Dev., 4, 1288 (1990)]、表現來自人類之 1,2-岩藻糖基轉移酶之 COS-1 細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 6674 (1990)]、表現來自雞之 α 2,6-唾液酸基轉移酶之 COS-7 細胞 [Eur. J. Biochem., 219, 375 (1994)]、表現來自人類之 α 2,8-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

唾液酸基轉移酶之CHO細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7952 (1994)]、表現來自奈瑟氏菌之 β 1,3-N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶或 β 1,4-半乳糖基轉移酶或 β 1,3-N-乙醯半乳糖胺基轉移酶或 α 1,4-半乳糖基轉移酶之大腸桿菌 (W096/10086)、表現來自奈瑟氏菌之 α 2,3-唾液酸基轉移酶之大腸桿菌 [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)]、表現來自 Helico bacterium pylori 之 α 1,3-岩藻糖基轉移酶之大腸桿菌 [J. Biol. Chem., 272, 21349及21357 (1997)]、表現來自酵母 α 1,2-甘露糖基轉移酶之大腸桿菌 [J. Org., Chem., 58, 3985 (1993)]等之微生物或動物細胞或昆蟲細胞。

於本發明複合糖質之製造上使用微生物之情形中，該微生物可依據上述具有由核苷酸之前驅物質和糖生產糖核苷酸能力之微生物培養同樣之培養基、培養條件進行培養。

於本發明複合糖質之製造上使用動物細胞之情形中，培養該動物細胞之培養基可使用一般所用之RPMI 1640培養基、衣格爾 (Eagle) 之MEM培養基或於此些培養基中添加胎牛血清等之培養基等。培養為在5% CO₂存在下等之條件下進行。培養溫度以20~40℃為佳，培養時間通常為3~14日。又，培養中視需要，亦可於培養基中添加抗生素。

於本發明複合糖質之製造上使用昆蟲細胞之情形中，該昆蟲細胞之培養可依據公知的方法 [J. Biol. Chem., 268, 12609 (1993)]進行。

經由該培養所得之微生物或動物細胞或昆蟲細胞培養液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

及該培養液經各種處理之培養液處理物可使用作為酵素源，且可使用於水性介質中糖核苷酸之生成。

培養液之處理物可列舉培養液之濃縮物、培養液之乾燥物、離心培養液所取得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、由培養上清液所得之酵素樣品、離心培養液所得之細胞(包含菌體)、該細胞之乾燥物、該細胞之冷凍乾燥物、該細胞之界面活性劑處理物、該細胞之超音波處理物、該細胞之機械性磨碎處理物、該細胞之溶劑處理物、該細胞之酵素處理物、該細胞之蛋白質分級物、該細胞之固定化物或由該細胞萃取所得之酵素樣品等。

複合糖質生成中所使用之酵素源份量，於視酵素活性於 37°C 、1分鐘可生成 $1\mu\text{mole}$ 複合糖質之活性為1單位(U)下，以 $0.1\text{mu/l}\sim 10000\text{U/l}$ ，較佳為 $1\text{mU/l}\sim 1000\text{U/l}$ 。

複合糖質生成中所使用之水性介質可列舉水、磷酸鹽、碳酸鹽、醋酸鹽、硼酸鹽、檸檬酸鹽、Tris等緩衝液、甲醇、乙醇等之醇類、醋酸乙酯等之酯類、丙酮等之酮類、乙醯胺等之醯胺類等。又，使用作為酵素源之微生物、動物細胞或昆蟲細胞的培養液，可使用作為水性介質。

於複合糖質之生成中，視需要，可添加植酸等之嵌合劑、 MnCl_2 等之無機鹽、 β -氫硫基乙醇等。

複合糖質生成中所使用之糖核苷酸，可使用上述糖核苷酸之生成中所得之反應液或由該反應液精製之糖核苷酸，且可使用 $0.01\text{mM}\sim 2.0\text{M}$ 之濃度。

又，於複合糖質之生成反應液中，亦可經由依據上述方

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

五、發明說明 ()

法令糖核苷酸生成，而供給糖核苷酸。

複合糖質之生成中所使用之複合糖質前驅物質，若為單糖、寡糖、結合至載體等之單糖及寡糖、蛋白質、胜肽、脂質、糖蛋白質、糖脂質、糖胜肽或類固醇化合物等可作為糖轉移酶基質者則均可使用。

具體而言，可例示葡萄糖、半乳糖、甘露糖、唾液酸、N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯半乳糖胺、乳糖、N-乙醯乳糖胺、乳醯-N-二碳醣、GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc、GlcNAc β 1-4 Gal β 1-4 Glc、球形三碳醣、Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc、2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖、3'-唾液酸基-N-乙醯乳糖胺、6'-唾液酸基-N-乙醯乳糖胺、唾液酸基乳醯-N-二碳醣、路易士X、路易士a、乳醯-N-四碳醣、乳醯-N-新四碳醣、乳糖基岩藻四碳醣、3'-唾液酸基-3-岩藻糖基乳糖、唾液酸基路易士X、唾液酸基路易士a、乳醯-N-岩藻五碳醣I、乳醯-N-岩藻五碳醣II、乳醯-N-岩藻五碳醣III、乳醯-N-岩藻五碳醣V、LS-四醣a、LS-四醣b、LS-四醣c、(α 2,3)唾液酸基乳醯-N-新四碳醣及其衍生物、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺及含有該胺基酸之胜肽及其衍生物、神經醯胺及其衍生物等。該複合糖質前驅物質可使用0.01m~2.0M之濃度。

本發明之複合糖質可列舉含有一種或以上之葡萄糖、半乳糖、N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯半乳糖胺、葡萄糖醛酸、甘露糖、N-乙醯甘露糖胺、岩藻糖、唾液酸、乳糖、N-乙

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

醯乳糖胺、乳醯-N-二碳醣、GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc
 、GlcNAc β 1-4 Gal β 1-4 Glc、球形三碳醣、Gal α
 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc、2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基
 乳糖、3'-唾液酸基乳糖、6'-唾液酸基乳糖、3'-唾液酸
 基-N-乙醯乳糖胺、6'-唾液酸基-N-乙醯乳糖胺、唾液酸
 基乳醯-N-二碳醣、路易士X、路易士a、乳醯-N-四碳醣、
 乳醯-N-新四碳醣、乳醯二岩藻四碳醣、3'-唾液酸基-3-
 岩藻糖基乳糖、唾液酸基路易士X、唾液酸基路易士a、乳
 醯-N-岩藻五碳醣I、乳醯-N-岩藻五碳醣II、乳醯-N-岩藻
 五碳醣III、乳醯-N-岩藻五碳醣V、LS-四醣a、LS-四醣b、
 LS-四醣c、(α 2,3)唾液酸基乳醯-N-新四碳醣、乳醯-N-
 二岩藻六碳醣I、乳醯-N-二岩藻六碳醣II、乳醯-N-六碳
 醣、乳醯-N-新六碳醣、二唾液酸基乳醯-N-四碳醣及其衍
 生物所選出之糖之複合糖質或含有該複合糖質的複合糖質
 ，可列舉例如 Gal β 1-3

Glc、Gal β 1-4 Glc、Gal β 1-3 GlcNAc、Gal β 1-4 Glc
 NAc、Gal β 1-3 Gal、Gal β 1-4 Gal、Gal β 1-3 GalNAc、
 Gal β 1-4 GalNAc、Gal α 1-3 Glc、Gal α 1-4 Glc、Gal
 α 1-3 GlcNAc、Gal α 1-4 GlcNAc、Gal α 1-3 Gal、Gal
 α 1-4 Gal、Gal α 1-3 GalNAc、Gal α 1-4 GalNAc、Glc
 NAc β 1-3 Gal、GlcNAc β 1-4 Gal、GlcNAc β 1-6 Gal、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

GlcNAc β 1-3 Glc、GlcNAc β 1-4 Glc、GlcNAc β 1-3 GlcNAc、GlcNAc β 1-4 GlcNAc、GlcNAc β 1-6 GalNAc、GlcNAc β 1-2 Man、GlcNAc β 1-4 Man、GlcNAc β 1-6 Man、GalNAc β 1-3 Gal、GalNAc β 1-4 Gal、GalNAc β 1-4 GlcNAc、GalNAc α 1-3 GalNAc、Man β 1-4 GlcNAc、Man α 1-6 Man、Man α 1-3 Man、Man α 1-2 Man、GlcUA β 1-4 GlcN、GlcUA β 1-3 Gal、GlcUA β 1-3 GlcNAc、GlcUA β 1-3 GalNAc、NeuAc α 2-3 Gal、NeuAc α 2-6 Gal、NeuAc α 2-3 GlcNAc、NeuAc α 2-6 GlcNAc、NeuAc α 2-3 GalNAc、NeuAc α 2-6 GalNAc、NeuAc α 2-8 NeuAc、Fuc α 1-3 Glc、Fuc α 1-4 Glc、Fuc α 1-3 GlcNAc、Fuc α 1-4 GlcNAc、Fuc α 1-2 Gal 及 Fuc α 1-6 GlcNAc

所選出之具有鏈結糖之複合糖質或含有該複合糖質之複合糖質。又，具有該糖之複合糖質中所含之糖數目可舉出10個以下或6個以下者。

具體的複合糖質製造方法可例舉

(1)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 β 1,4-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-Gal能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和葡萄糖生成乳糖。

(2)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 β -1,4-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-Gal能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和N-乙醯葡萄糖胺生成N-乙醯半

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

乳糖胺。

(3)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 α 2,3-唾液酸基轉移酶[J. Biol. Chem., 271, 28271(1996)]之微生物、具有由CTP之前驅物質生產CTP能力之微生物、具有由糖和CTP生產CMP-Neu AC能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和N-乙醯甘露糖胺和丙酮酸和乳糖生成3'-唾液酸基乳糖。

(4)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 α 2,3-唾液酸基轉移酶[J. Biol. Chem., 271, 28271(1996)]之微生物、具有由CTP之前驅物質生產CTP能力之微生物、具有由糖和CTP生產CMP-Neu AC能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和N-乙醯甘露糖胺和丙酮酸和N-乙醯乳糖胺生成3'-唾液酸基-N-乙醯乳糖胺。

(5)經由進行以表現來自雞之 α 2,6-唾液酸基轉移酶之COS-7細胞[Eur. J. Biochem., 219, 375 (1994)、具有由CTP之前驅物質生產CTP能力之微生物、具有由糖和CTP生產CMP-Neu Ac能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和N-乙醯甘露糖胺和丙酮酸和N-乙醯乳糖胺生成6'-唾液酸基-N-乙醯乳糖胺。

(6)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 β 1,3-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-GlcNAc能力之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和 N-乙醯葡萄糖胺和乳糖生成 $\text{GlcNAc } \beta \text{ 1-3 Gal } \beta \text{ 1-4 Glc}$ 。

(7)經由進行以產生 $\beta \text{ 1,3-半乳糖轉移酶}$ 之人類，黑色素瘤細胞 WM266-4 株 (ATCC CRL 1676)、或表現來自人類，黑色素瘤細胞 WM266-4 之 $\beta \text{ 1,3-半乳糖轉移酶}$ 基因之 Namarva 細胞 KJM-1 株等之轉形株 (特開平 6-181759)、具有由 UTP 之前驅物質生產 UTP 能力之微生物、具有由糖和 UTP 生產 UDP-Gal 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和 $\text{GlcNAc } \beta \text{ 1-3 Gal } \beta \text{ 1-4 Glc}$ 生成乳醯-N-四碳醣。

(8)經由進行以表現來自人類 Hela 細胞之 $\beta \text{ 1,4-半乳糖基轉移酶}$ 基因之大腸桿菌 [EMBO J., 9, 3171(1990)] 或釀酒酵母 [Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]，具有由 UTP 之前驅物質生產 UTP 能力之微生物、具有由糖和 UTP 生產 UDP-Gal 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和牛乳糖和 $\text{GlcNAc } \beta \text{ 1-3 Gal } \beta \text{ 1-4 Glc}$ 生成乳醯-N-新四碳醣。

(9)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 $\beta \text{ 1,4-半乳糖基轉移酶}$ (W096/10086) 之微生物、具有由 UTP 之前驅物質生產 UTP 能力之微生物、具有由糖和 UTP 生產 UDP-Gal 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和 $\text{GlcNAc } \beta \text{ 1-3 Gal } \beta \text{ 1-4}$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

Glc生成乳醯-N-新四碳醣。

(10)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 β 1,3-乙醯葡萄糖胺基轉移酶(WO 96/10086)之微生物、表現來自奈瑟氏菌之 β 1,4-半乳糖基轉移酶(WO96/10 86)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-GlcNAc能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-Gal能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和N-乙醯葡萄糖胺和半乳糖和乳糖生成乳醯-N-新四碳醣。

(11)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 α 2,3-唾液酸基轉移酶[J. Biol. Chem., 271, 28271(1996)]之微生物、具有由CTP之前驅物質生產CTP能力之微生物、具有由糖和CTP生產CMP-Neu AC能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和N-乙醯甘露糖胺和丙酮酸和乳醯-N-新四碳醣生成(α 2,3)唾液酸基乳醯-N-新四碳醣。

(12)經由進行以表現來自人類之 α 1,3-岩藻糖基轉移酶之Namarva細胞[J. Biol. Chem. 269, 14730(1994)]、具有由GTP之前驅物質生產GTP能力之微生物、具有由糖和GTP生產GDP-Fuc能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由GMP和甘露糖和乳醯-N-新四碳醣生成乳醯-N-岩藻五碳醣Ⅲ。

(13)經由進行以表現來自Helicobacter pylori之 α 1,3-岩藻糖基轉移酶[J. Biol. Chem., 272, 21349及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()

21357(1997)]之微生物、具有由GTP之前驅物質生產GTP能力之微生物、具有由糖和GTP生產GDP-Fuc能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由GMP和甘露糖和乳醯-N-新四碳醣生成乳醯-N-岩藻五碳醣Ⅲ。

(14)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 α 1,4-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-Gal能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和乳糖生成球形三碳醣。

(15)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 β 1,4-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、表現來自奈瑟氏菌之 α 1,4-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-Gal能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和葡萄糖生成球形三碳醣。

(16)經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 α 1,4-半乳糖基轉移酶(W096/10086)之微生物、具有由UTP之前驅物質生產UTP能力之微生物、具有由糖和UTP生產UDP-Gal能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和N-乙醯乳糖胺生成Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc。

(17)經由進行以表現來自人類之 β 1,3-半乳糖基轉移

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

五、發明說明()

酶 (特開平 6-181759) 之動物細胞，具有由 UTP 之前驅物質生產 CTP 能力之微生物、具有由糖和 UTP 生產 UDP-Gal 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和半乳糖和 N-乙醯葡萄糖胺生成乳醯-N-二碳醣。

(18) 經由進行以表現來自奈瑟氏菌之 α 2,3-唾液酸基轉移酶 [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] 之微生物、具有由 CTP 之前驅物質生產 CTP 能力之微生物、具有由糖和 CTP 生產 CMP-Neu Ac 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由乳清酸和 N-乙醯甘露糖胺和丙酮酸和乳醯-N-二碳醣生成唾液酸基乳醯-N-二碳醣。

(19) 經由進行以表現來自人類之 α 1,3-岩藻糖基轉移酶 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] 之微生物、具有由 GTP 之前驅物質生產 GTP 能力之微生物、具有由糖和 GTP 生產 GDP-Fuc 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由 GMP 和甘露糖和 3'-唾液酸基 N-乙醯乳糖胺生成唾液酸基路易士 X。

(20) 經由進行以表現來自人類之 α 1,3/1,4-岩藻糖基轉移酶 [Carbohydrate Research, 190, 1 (1989)] 之微生物、具有由 GTP 之前驅物質生產 GTP 能力之微生物、具有由糖和 GTP 生產 GDP-Fuc 能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由 GMP 和甘露糖和唾液酸基乳醯-N-二碳醣生成唾液酸基路易士 a。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

(21)經由進行以表現來自酵母之 α 1,2-甘露糖基轉移酶之大腸桿菌[J. Org. Chem., 58, 3985(1993)]、具有由GTP之前驅物質生產GTP能力之微生物、具有由糖和GTP生產GDP-Man能力之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之酵素反應，則可由GMP和甘露糖生成Man α 1-2 Man。

複合糖質之製造方法並不被限定於上述所記載者，且在可與本專利所記載之糖核苷酸製造方法組合之糖轉移酶，及該酵素所容許之受質專一性之範圍中，則何種糖鏈，均可僅以核苷酸之前驅物質、糖、複合糖質前驅物質作為原料，予以工業性地製造。

依據本發明之製造方法所製造之複合糖質可列舉例如，

- (1)參與病原性微生物和病毒感染之複合糖質類，例如，作為病原性微生物和病毒之受體而被辨識的複合糖質類、
- (2)作為病原性微生物和病毒所產生毒素之受體而被辨識的複合糖質類、

(3)於生體內，參與細胞接合、異物辨識、各種淋巴細胞活素結合等之複合糖質類等之含有單獨或複數、以化學性所容許之鏈結形式之葡萄糖、半乳糖、N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯半乳糖胺、葡萄糖醛酸、甘露糖、N-乙醯甘露糖胺、岩藻糖、唾液酸等糖之複合糖質，更具體而言，可列舉

- (1)人類和動物之乳中所含有之參與嬰幼兒之微生物感染防禦之複合糖質類，例如，乳醣-U-四碳醣、乳醣-N-新

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

五、發明說明 ()

四碳醣等之複合糖質。

(2)辨識 Escherichia coli、Propionibacterium granulosum、Mycobacterium tuberculosis、Moraxella catarahlis、Candida albicans、Staphylococcus saprophyticus、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus agalactiae、Pseudomonas aeruginosa、Actinomyces naeslundii、Neisseria gonorrhoeae、Helicobacter pylori、Haemophilus influenzae等微生物之受體複合糖質。

(3)流行感冒病毒、日冕形病毒、千代病毒、新城病毒、呼腸病毒、轉狀病毒、愛滋病毒等之病毒的受體複合糖質。

(4)隱孢子蟲、錐蟲等之原蟲的受體複合糖質。

(5)結合霍亂毒素、大腸桿菌易熱性毒素、肉毒桿菌毒素、梭狀芽胞桿菌 δ 毒素、梭狀芽胞桿菌A毒素、志賀毒素、舌毒素、志賀毒素類毒、腸炎弧菌耐熱性毒素、破傷風毒素等毒素之受體複合糖質。

(6)GD3、GM3等之神經節二脂和球形系糖脂質等之癌症關連性複合糖質。

(7)唾液酸基路易士X糖鏈等之參與白血球對於發炎部位之黏附和機能修飾之複合糖質類。

(8)參與慢性風濕性關節炎和IgA腎病等之自體免疫疾病之複合糖質類、

(9)參與異物辨識和癌細胞辨識之辨識各種類似外源凝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

集素物質之複合糖質類。

水性介質中所生成之複合糖質的定量，可依據公知之方法進行 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 3289 (1988) . Anal. Biochem. 174, 459 (1988)]。

反應液中所生成之複合糖質的採集，可依據使用活性炭和離子交換樹脂等之通常方法予以進行 (特開平 8-23993)，例如，於 N-乙醯乳糖胺可依據 J. Org. Chem., 47, 5416 (1982) 記載之方法進行。

以下示出本發明之實施例，但本發明不被此些實施例所限定。

實施發明之最佳形態

實施例 1 表現 gal U、ppa 之重組體質體之作成

以下敘述關於表現 gal U、ppa 之重組體質體 pNT 12 的作成方法 (圖 1、圖 2)。

1) 含有 P_L 啟動基因之表現載體的作成

依據以下所示之方法，作成含有 P_L 啟動基因之表現載體 pPA31 及 pPAC31 (圖 1)。

將具有含色胺酸啟動基因之質體 pTrS30 之大腸桿菌 JM 109/pTrS30 (FERM BP-5407) 及具有含 P_L 啟動基因之質體 pPA1 (特開昭 63-233798)、含 P_L 啟動基因及 cI857 抑制子之質體 pPAC1 (FERM BP-6054) 之大腸桿菌，分別於 LB 培養基 [Bactotrypton (Difco 公司製) 10 克/升、酵母萃取物 (Difco 公司製) 5 克/升、NaCl 5 克/升、pH 為 7.2] 中植菌，且於 30℃ 下培養 18 小時。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

由該培養所得之菌體，依據前述之公知方法，將 pTrS 30、pPA1及 pPAC1質體 DNA予以單離精製。

精製之 pTrS30 DNA 0.2微克以限制酶 Pst I及 Cla I切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA斷片，並以 Gene Clean II 套件 (Bio 101公司製)回收 3.4Kb之斷片。精製之 pPA1 DNA 0.5微克以限制酶 Pst I及 Cla I切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA斷片，且同樣地回收 1.0kb之斷片。

將該 3.4kb之斷片及 1.0kb之斷片使用連結套件 (TAKARA 連結套件、寶酒造公司製)，於 16℃ 下進行 16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM522株，並將該轉形體於含有安比西林 50微克/毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 37℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得經由 P_L 啟動基因之表現載體 pPA31。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 1)。

精製之 pPA31 DNA 0.2微克以限制酶 Pst I及 Cla I切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA斷片，並以 Gene Clean II 套件，回收 3.4kb之斷片。精製之 pPAC1 DNA 0.5微克以限制酶 Pst I及 Cla I切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA斷片，且同樣地回收 2.3kb之斷片。

將該 3.4kb之斷片及 2.3kb之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

NM522株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於37℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得含有cI857抑制子之經由P_L啟動基因之表現載體pPAC31。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖1)。

2) gal U表現質體之作成

將大腸桿菌W3110株之染色體DNA，依據公知之方法[例如，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc. (1994)予以單離精製。

將序列編號1記載之意義股DNA引子和序列編號2記載之反意義股DNA引子，使用Applied Biosystems公司製380A. DNA合成機予以合成。

以該合成之DNA作為引子、以W3110株之染色體DNA作為模板進行PCR。PCR為經由使用含有W3100染色體DNA0.04微克、引子各0.5 μM、TAKARA Ex Taq(寶酒造公司製)1.0單位、10x Ex Taq緩衝液(寶酒造公司製)4微升、脫氧NTP各200 μM之反應液40微升，重覆30回94℃-1分、42℃-2分、72℃-3分之工程而進行。

將該反應液之1/10量付以瓊脂糖膠電泳，確認目的之斷片被放大後，剩餘的反應液添加、混合等量之TE[10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)、1mM EDTA]飽和苯酚/氯仿(1體積/1體積)。將該混合液離心分離後，於所得之上層中加入2倍容量之冰酒精，並於-80℃中放置30分鐘。將該放置液離心取得DNA之沈澱。該沈澱以70%冰酒精洗淨，並予以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 ()

真空乾燥取得沈澱。以後，將添加TE飽和苯酚/氯仿，至以酒精洗淨取得DNA沈澱為止之操作，稱為酒精沈澱法。

將該DNA之沈澱溶於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶HindⅢ及Bam HI切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後，以Gene CleanⅡ套件回收0.9kb之斷片。將實施例1-1)所取得之pPA31 DNA 0.2微克以限制酶HindⅢ及Bam HI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收4.2kb之斷片。

將該0.9kb之斷片及4.2kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌KY8415株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得gal U表現質體之pNT9。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖2)。

3) gal U、ppa同時表現質體之作成

合成序列編號3記載之意義股DNA引子、和序列編號4記載之反意義股DNA引子，並以該合成DNA作為引子，以W3110株之染色體DNA作為模板，並於前述之相同條件下進行PCR。

PCR終了後，以酒精沈澱法，取得DNA之沈澱。將該沈澱溶解於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶Bam HI及Sal I切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

綠

五、發明說明 ()

，以 Gene Clean II 套件回收 1.0kb 之斷片。將實施例 1-2) 所取得之 pNT 9 DNA 0.2 微克以限制酶 BamHI 及 Sal I 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 4.9kb 之斷片。

將該 1.0kb 之斷片及 4.9kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 KY8415 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得 galU、ppa 同時表現質體 pNT12。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 2)。

將該 pNT12 DNA 0.5 微克以限制酶 Eco R I 及 Sal I 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並以 Gene Clean II 套件，回收 2.2kb 之斷片。另一方面，將 pSTV 28 DNA (寶酒造公司製) 0.2 微克以限制酶 Eco RI 及 Sal I 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 3.0kb 之斷片。

將該 2.2kb 之斷片及 3.0kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有氨黴素 10 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得 gal U、ppa 基因表現質體之 pNT32。該質體之構造以限制酶切開

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

予以確認(圖2)。

實施例2 UDP-Glc之生產

將實施例1所得之大腸桿菌 KY8415/pNT12，接種至裝入含有安比西林 50 微克/毫升之 LB 培養基 125 毫升之 1 公升容積附有折流板之三角燒瓶中，並於 30℃ 下 220rpm 之條件下培養 17 小時。將該培養液 125 毫升，接種至裝入葡萄糖 10 克/升、Bactotrypton(Difco 公司製) 12 克/升、酵母萃取物(Difco 公司製) 24 克/升、 KH_2PO_4 2.3 克/升(另外殺菌)、 K_2HPO_4 12.5 克/升(另外殺菌)、安比西林 50 微克/毫升之組成所構成之液體培養基(pH 無調整) 2.5 公升之 5 公升容積培養槽中，並於 30℃ 下 4 小時，再於 40℃ 下 3 小時、600rpm、通氣量 2.5 公升/分之條件下進行培養。

該培養中，使用 28% 氨水，將培養液之 pH 維持於 7.0。又，於培養途中視需要，添加葡萄糖。將該培養液離心分離，取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20℃ 下保存，且可在使用前解凍供使用。

將產氨棒狀桿菌 ATCC 21170 株。接種至裝入葡萄糖 50 克/升、聚蛋白腴(日本製藥公司製) 10 克/升、酵母萃取物(Oriental 酵母公司製) 10 克/升、尿素 5 克/升、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 克/升、 KH_2PO_4 1 克/升、 K_2HPO_4 3 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 克/升、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克/升、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克/升、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6 \text{H}_2\text{O}$ 20 毫克/升、L-半胱胺酸 20 毫克/升、D-泛酸鈣 10 毫克/升、維生素 B1 5 毫克/升、菸鹼酸 5 毫克/升、及生物素 30 微克/升(

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明()

以 10N NaOH 調整至 pH7.2) 之組成所構成之液體培養基 20 毫升之 300 毫升容積附有折流板之三角燒瓶中，並於 28℃、220rpm 之條件下，培養 24 小時。

將該培養液 20 毫升，接種至裝入與上述相同組成之液體培養基 250 毫升之 2 公升容積附有折流板之三角燒瓶中，並於 28℃、220rpm 之條件下，培養 24 小時。所得之培養液使用作為一種培養液。

將該培養液 250 毫升，接種至裝入葡萄糖 150 克/升、肉萃取物(極東製藥公司製)5 克/升、 KH_2PO_4 10 克/升、 K_2HPO_4 10 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 克/升、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 毫克/升、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克/升、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20 毫克/升(另外殺菌)、 β -丙胺酸 15 毫克/升(另外殺菌)、L-半胱胺酸 20 毫克/升、生物素 100 微克/升、尿素 2 克/升、及維生素 B1 5 毫克/升(另外殺菌)(以 10N NaOH 調整至 pH7.2)之組成所構成之液體培養基 2.25 公升之 5 公升容積培養槽中，並於 32℃、600rpm、通氣量 2.5 公升/分之條件下進行 24 小時培養。培養中，使用 28% 氨水，將培養液之 pH 維持於 6.8。

將該培養液離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20℃ 下保存，且可在使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 KY8415/pNT12 株濕菌體 40 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克/升、葡萄糖 100 克/升、 KH_2PO_4 20 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克/升、植酸 5 克/升、乳清酸(鉀鹽)21.2 克/升、Naimin S-215 4 克/升、二甲苯 10 毫升/升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明()

積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌(900rpm)，並於32℃下進行21小時反應。

反應中，使用4N NaOH，將該反應液之pH維持於7.2，且視需要，添加葡萄糖、KH₂PO₄。

經由該反應，於反應液中生成43.9克/升之UDP-Glc(2Na鹽)。

實施例3 表現galT、galK之重組體質體之作成

以下敘述關於表現galT、galK之重組體質體pNT25的作成方法(圖3)。

合成序列編號5記載之意義股DNA引子、和序列編號6記載之反意義股DNA引子，並以該合成DNA作為引子，以W3110株之染色體DNA作為模板，並於前述之相同條件下進行PCR。

PCR終了後，以酒精沈澱法，取得DNA之沈澱。將該沈澱溶解於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶HindⅢ及HincⅡ切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後，以Gene CleanⅡ套件回收2.3kb之斷片。將pBlue scriptⅡSK+DNA 0.2微克，以限制酶HindⅢ及EcoRV切斷，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收3.0kb之斷片。

將該2.3kb之斷片及3.0kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌NM52株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 ()

洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得含有galT、galK基因之質體pNT19。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖3)。

將該pNT19 DNA 0.5微克以限制酶Cla I及Bam HI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，同樣地回收2.3kb之斷片。將實施例1-1)所得之pPAC 31DNA 0.2微克以限制酶Cla I及Bam HI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收5.5kb之斷片。

將該2.3kb之斷片及5.5kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌NM52株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得galT、galK同時表現質體之pNT25。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖3)。

實施例 4 UDP-Gal之生產

1) galT、galK、galU、ppa表現株之作成

使用實施例1-3)所得之pNT32DNA、依常法轉形大腸桿菌NM522/pNT25株，該轉形體於含有安比西林50微克/毫升及氯黴素10微克/毫升之LB洋菜培養基塗布後，於30℃下培養一晚。經由選取可生長之轉形體，則可取得galT、galK、galU、ppa表現株之大腸桿菌NM522/pNT25/pNT32株。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

綠

五、發明說明()

2) UDP-Gal之生產

將實施例4-1)所得之大腸桿菌NM522/pNT25/pNT32株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心，取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌ATCC21170株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之培養物離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要可於-20℃下保存，且可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌NM522/pNT25/pNT32株濕菌體50克/升、產氨棒狀桿菌ATCC21170株濕菌體150克/升、葡萄糖80克/升、半乳糖20克/升、 KH_2PO_4 15克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5克/升、植酸5克/升、乳清酸(鉀鹽)21.2克/升、Naimin S-2154克/升、二甲苯10毫升/升之組成所構成之反應液2公升，放入5公升容積培養槽，該反應液以600rpm攪拌，且以1公升/分通氣，並於32℃下進行26小時反應。

反應中，使用4N NaOH，將該反應液之pH維持於7.2，且視需要，添加葡萄糖、 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成47.4克/升之UDP-Gal(2Na鹽)。

實施例5 galT, galK於產氨棒狀桿菌中表現之重組體質體的作成

以下敘述關於來自大腸桿菌之galT、galK於產氨棒狀桿菌中表現之重組質體pTK7的作成方法(圖4)。

1) pCG116之作成

如下述製造可在產氨棒狀桿菌中複製之質體pCG116。

五、發明說明 ()

質體 pCG11 (特公平 6-91827) DNA 0.5 微克，以限制酶 Pst I 及 Stu I 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並以 Gene Clean II 套件回收 6.5kb 之斷片。

另一方面，將質體 pUC 19 DNA 1.0 微克，以限制酶 Eco R I 切斷後，以 DNA Blunting kit (寶酒造公司製) 予以平滑末端化。將平滑末端化之該 DNA 以 Pst I 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並以 MERmaid kit (Bio 101 公司製) 回收 43bp 之斷片。

將該 6.5kb 之斷片及 43bp 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液，依電穿孔法 [FEMS Microbiol. Lett., 65, 299 (1989)] 轉形產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株，並將該轉形體於含有壯觀黴素 (spectinomycin) 100 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養 2 日。

由可生長之轉形體菌落，依公知之方法 [J. Bacteriol., 159 306 (1984)]，萃取質體，取得質體 pCG116。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 4)。

2) 表現 galT、galK 之質體 pTK7 的作成

將實施例 3 所作成之表現 galT、galK 之質體 pNT25 DNA 1.0 微克，以限制酶 Xho I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並以 Gene Clean II 套件回收 3.5kb 之斷片。

另一方面，將實施例 5-1) 所作成之質體 pCG 116 DNA 0.5 微克，以限制酶 Sal I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 ()

泳分離出DNA斷片，並同樣地回收6.5kb之斷片。

將該3.5kb之斷片及6.5kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液，依電穿孔法轉形產氨棒狀桿菌ATCC 21170株，並將該轉形體於含有壯觀黴素100微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養2日。

可生長之轉形體菌落，依公知之方法，萃取質體，取得galT、galK同時表現質體pTK7。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖4)。

實施例 6 UDP-Gal 之生產

將實施例5所得之產氨棒狀桿菌ATCC 21170/pTK7株，以實施例2同樣之方法於32℃培養20小時後，於40℃下培養4小時，將所得之培養物離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要可於-20℃下保存，且可於使用前解凍供使用。

將產氨棒狀桿菌ATCC21170/pTK7株濕菌體150克/升、果糖40克/升、半乳糖20克/升、KH₂PO₄ 15克/升、MgSO₄·7H₂O 5克/升、植酸5克/升、乳清酸(鉀鹽) 10.6克/升、Naimin S-215 4克/升、二甲苯10毫升/升之組成所構成之反應液30毫升，放入200毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌(900rpm)，並於32℃下進行22小時反應。

反應中，使用4N NaOH，將該反應液之pH維持於7.2，且視需要，添加果糖、半乳糖、KH₂PO₄。

經由該反應，於反應液中生成7.2克/升之UDP-Gal (2Na鹽)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

實施例 7 glmU、ppa、pgm、glmM、glk、pfkB表現質體之作成

合成序列編號7記載之意義股DNA引子、和序列編號8記載之反意義股DNA引子，並以該合成DNA作為引子，以W3110株之染色體DNA作為模板，並於前述之相同條件下進行PCR。

PCR終了後，以酒精沈澱法，取得DNA之沈澱。將該DNA沈澱溶解於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶HindⅢ及BamHI切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後，以Gene Clean II套件回收1.4kb之斷片。將實施例1-1)所取得之pPA31 DNA 0.5微克以限制酶HindⅢ及BamHI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收4.2kb之斷片。

將該1.4kb之斷片及4.2kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌KY8415株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得glmU表現質體pNT10。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖5)。

將實施例1-3)所取得之pNT12 DNA 0.5微克以限制酶BamHI及Sal I切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，同樣地回收1.0kb之斷片。將上述pNT 10 DNA 0.2微克，以限制

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

酶 BamHI及 Sal I切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收5.3kb之斷片。

將該1.0kb之斷片及5.3kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌KY 8415株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得glmU、ppa同時表現質體pNT14。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖5)。

2) pgm表現質體之作成

合成序列編號9記載之意義股DNA引子、和序列編號10記載之反意義股DNA引子，並以該合成DNA作為引子，以W 3110株之染色體DNA作為模板，並於前述之相同條件下進行PCR。

PCR終了後，以酒精沈澱法，取得DNA之沈澱。將該沈澱溶解於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶 Cla I及 Bam HI切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後，以Gene Clean II套件回收1.8kb之斷片。將實施例1-1)所取得之pPAC DNA 0.2微克以限制酶 Cla I及 Bam HI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收5.5kb之斷片。

將該1.8kb之斷片及5.5kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。使用該連結反應液依前述公知之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

方法，轉形大腸桿菌 NM522株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得 p_{gm}表現質體 pNT24。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖 6)。

3) glmM表現質體之作成

合成序列編號 11 記載之意義股 DNA 引子、和序列編號 12 記載之反意義股 DNA 引子，並以該合成 DNA 作為引子，以大腸桿菌 W3110 株之染色體 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 Cla I 及 Bam HI 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片後，以 Gene Clean II 套件回收 1.6kb 之斷片。將實施例 1-1) 所取得之 pPAC DNA 0.2 微克以限制酶 Cla I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 5.5kb 之斷片。

將該 1.6kb 之斷片及 5.5kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

，取得 *glmM* 表現質體 pNT44。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 7)。

4) *glk* 表現質體之作成

合成序列編號 13 記載之意義股 DNA 引子、和序列編號 14 記載之反意義股 DNA 引子，並以該合成 DNA 作為引子，以大腸桿菌 W3110 株之染色體 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 Hind III 及 Bam HI 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片後，以 Gene Clean II 套件回收 0.5kb 之斷片。將實施例 1-1) 所取得之 pPA 31 DNA 0.2 微克以限制酶 Hind III 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 4.2kb 之斷片。

將該 0.5kb 之斷片及 4.2kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM 522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得具有 *glk* 之一部份之質體 pNT45。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 8)。

以上述相同條件下進行 PCR，使用所得之 DNA 溶解液 5 微升，將 DNA 以限制酶 Hind III 切斷後，並以瓊脂糖膠電泳分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

離出DNA斷片，且同樣地回收0.5kb之斷片。將上述方法所取得之pNT45 DNA 0.2微克以限制酶HindⅢ切斷後，以鹼性磷酸酯酶進行脫磷酸化處理，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收4.7kb之斷片。

將該0.5kb之斷片及4.7kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌NM522株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質取，取得表現g1k之質體pNT46。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖8)。

5) pfkB表現質體之作成

合成序列編號15記載之意義股DNA引子、和序列編號16記載之反意義股DNA引子，並以該合成DNA作為引子，以W3110株之染色體DNA作為模板，並於前述之相同條件下進行PCR。

PCR終了後，以酒精沈澱法，取得DNA之沈澱。將該沈澱溶解於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶HindⅢ及EcoRV切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後，以Gene CleanⅡ套件回收1.3kb之斷片。將pBluescriptⅡ Sk+ DNA 0.2微克以限制酶HindⅢ及EcoRV切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收3.0kb之斷片。

將該1.3kb之斷片及3.0kb之斷片使用連結套件，於16℃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM522株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得具有pfkB基因之質體pNT43。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖9)。

使用pNT43 DNA 0.5微克，將DNA以限制酶ClaI及SacI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收1.3kb之斷片。

將實施例1-1)所取得之pPAC31 DNA 0.2微克以限制酶ClaI及SacI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收5.7kb之斷片。

將該1.3kb之斷片及5.7kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM522株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得pfkB表現質體pNT43。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖9)。

實施例 8 UDP-GlcNAc之生產

將實施例7所得之大腸桿菌 KY8415/pNT14株、NM522/pNT24株、NM522/pNT44株、NM522/pNT47株以實施例2同樣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

之方法培養，將所得之各培養物離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要，於 -20°C 保存，且可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT24株濕菌體 6克/升、NM522/pNT47株濕菌體 6克/升、100mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)、6mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10mM葡萄糖-6-磷酸、2.6mM果糖-6-磷酸、2.5mM ATP、Naimin S-215 4克/升之組成所構成之反應液 0.1毫升，於入 1.5毫升容積之試管中，並於 37°C 下進行 1 小時反應。反應液於 65°C 下處理 5分鐘後，添加如大腸桿菌 KY8415/pNT14株濕菌體 0.3克/升、NM522/pNT44株濕菌體 6克/升、5mM葡萄糖胺-6-磷酸、5mM乙醯CoA、5mM UTP 般之菌體及受質，再於 37°C 下反應 30分鐘，則於反應液中生成 2.5mM (1.6克/升)之 UDP-GlcNAc (2Na 鹽)。此時，未添加大腸桿菌 NM522/pNT24株濕菌體或 NM522/pNT47株濕菌體時之 UDP-GlcNAc 產量分別為 0.8mM、0.16mM。

此顯示，經由 pgm 表現株和 pfkB 表現株之組合，則可供給 glm M 活性表現上所必須之 Glc-1,6-P2。

實施例 7 UDP-GlcNAc 之生產

將實施例 7 所得之大腸桿菌 KY8415/pNT14株、NM522/pNT24株、NM522/pNT44株、NM522/pNT46株、NM522/pNT47株以實施例 2 同樣之方法培養，將所得之各培養物離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要於 -20°C 保存，且可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 KY8415/pNT14株、NM522/pNT24株、NM522/pNT44株、NM522/pNT47株、NM522/pNT46株濕菌體各 10克

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

綠

五、發明說明 ()

/升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克 / 升、果糖 50 克 / 升、葡萄糖胺鹽酸鹽 80 克 / 升、 KH_2PO_4 15 克 / 升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克 / 升、植酸 5 克 / 升、乳清酸 (鉀鹽) 10 克 / 升、Naimin S-215 4 克 / 升、二甲苯 10 毫升 / 升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌 (900rpm)，並於 32℃ 下進行 10 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加果糖、 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 6.2 克 / 升之 UDP-GlcNAc (2Na 鹽)。

實施例 10 galK 表現質體之作成

將實施例 3-1) 所取得之 pNT 25 DNA 0.5 微克以限制酶 ClaI 及 EcoRV 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並以 Gene Clean II 套件回收 6.7kb 之斷片。回收之 DNA 以 DNA Blunting kit 平滑末端化後，使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得 galK 表現質體 pNT54。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 10)。

實施例 11 UDP-GlcNAc 之生產

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

將實施例 10 所得之大腸桿菌 NM522/pNT54 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可於 -20°C 下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT54 株濕菌體 50 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克/升、果糖 40 克/升、N-乙醯葡萄糖胺 67 克/升、 KH_2PO_4 15 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克/升、植酸 5 克/升、乳清酸（鉀鹽）10 克/升、Naimin S-215 4 克/升、二甲苯 10 毫升/升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌（900rpm），並於 32°C 下進行 27 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加果糖、 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 17.1 克/升之 UDP-GlcNAc（2Na 鹽）。

實施例 12 UDP-GlcNAc 和 UDP-Gal 之同時生產

將實施例 3 所得之 NM522/pNT25 株以實施例 2 同樣之方法培養，將所得之培養物離心分離取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株以實施例 2 同樣之方法培養。將所得之培養液離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20°C 下保存，且可在使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT25 株濕菌體 25 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克/升、果糖 60 克/升、N-乙醯葡

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

綠

五、發明說明()

葡萄糖胺 50 克 / 升、半乳糖 40 克 / 升、 KH_2PO_4 15 克 / 升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克 / 升、植酸 5 克 / 升、乳清酸 (鉀鹽) 10 克 / 升、Naimin S-215 4 克 / 升、二甲苯 10 毫升 / 升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌 (900rpm)，並於 32℃ 下進行 24 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 11.4 克 / 升之 UDP-GlcNAc (2Na 鹽) 及 18 克 / 升之 UDP-Gal (2Na 鹽)。

實施例 13 manB、manC、pgm、pfkB 表現質體之作成

1) manB、manC 表現質體之作成

合成序列編號 17 記載之意義股 DNA 引子、和序列編號 18 記載之反意義股 DNA 引子，並以該合成 DNA 作為引子，以大腸桿菌 W3110 株之染色體 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 Hind III 及 Bam HI 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片後，以 Gene Clean II 套件回收 3.0kb 之斷片。將 p Bluescript II Sk⁺ DNA 0.2 微克以限制酶 Hind III 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 3.0 kb 之斷片。

將該 3.0kb 之兩斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

時連結反應。使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌 NM522株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得含有 manC 及 manB 之質體 pNK6。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖 11)。

將該 pNK6 DNA 0.5 微克以限制酶 Cla I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並回收 3.0kb 之斷片。將實施例 1-1) 所得之 pPAC31 DNA 0.2 微克以限制酶 Cla I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 5.5kb 之斷片。

將該 3.0kb 之斷片及 5.5kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。使用該連結反應液依常法轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得 manC 及 manB 表現質體 pNK7。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖 11)。

2) pgm、pfkB 同時表現質體之作成

將實施例 7 所取得之 pNT24 DNA 0.5 微克以限制酶 Xho I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，並以 Gene Clean II 套件，回收 3.0kb 之斷片。另一方面，將 pSTV 28 DNA (寶酒造公司製) 0.2 微克以限制酶 Sal I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

綠

五、發明說明()

回收 3.0kb 之斷片。

將該 3.0kb 之兩斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有氨黴素 10 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得具有 *pgm* 基因之質體 pNT53。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 12)。

合成序列編號 19 記載之意義股 DNA 引子，使用該意義股 DNA 及序列編號 16 記載之反意義股 DNA 引子，以實施例 7 所取得之質體 pNT47 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 EcoRV 及 Bgl I 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 1.3kb 之斷片。將 pNT53 DNA 0.2 微克以限制酶 Sma I 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 6.0kb 之斷片。

將該 1.3kb 之斷片及 6.0kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有氨黴素 10 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 ()

，取得 *pgm* 及 *pfkB* 之表現質體 *pNT55*。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 12)。

實施例 14 GDP-Man 之生產

1) *manB*、*manC*、*pgm*、*pfkB* 表現株之作成

使用實施例 13-2) 所得之 *pNT55* DNA，依常法轉形大腸桿菌 NM522/*pNK7* 株，將該轉形體於含有安比西林 50 微克/毫升及氨基素 10 微克/毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。經由選取可生長之轉形體，則可取得 *manB*、*manC*、*pgm*、*pfkB* 之表現株大腸桿菌 NM522/*pNK7*/*pNT55* 株。

2) GDP-Man 之生產

將上述 1) 所得之大腸桿菌 NM522/*pNK7*/*pNT55* 株及實施例 7 所得之大腸桿菌 NM522/*pNT46*，以實施例 2 同樣之方法培養，且將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC 21170 株，以實施例 2 同樣之方法培養。且將所得之培養物離心，取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20℃ 下保存，且可在使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/*pNK7*/*pNT55* 株濕菌體、NM522/*pNT46* 株濕菌體 25 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克/升、果糖 60 克/升、甘露糖 50 克/升、 KH_2PO_4 15 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克/升、植酸 5 克/升、GMP (2Na, $7\text{H}_2\text{O}$ 鹽) 60 克/升、Naimin S-215 4 克/升、二甲苯 10 毫升/升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌 (900rpm)，並進行 24 小時反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

綠

五、發明說明()

應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 43.9 克 / 升之 UDP-Man (2Na, $1\text{H}_2\text{O}$ 鹽)。

實施例 15 gmd、wcaG 表現質體之作成

合成序列編號 20 記載之意義股 DNA 引子，和序列編號 21 記載反意義股 DNA 引子，並以該合成 DNA 作為引子，以大腸桿菌 W3110 株之染色體 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 Hind III 及 Xho I 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片後，以 Gene Clean II 套件回收 2.3kb 之斷片。

將實施例 1-1) 所取得之 pPA31 DNA 0.2 微克以限制酶 Hind III 及 Sal I 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 3.9kb 之斷片。

將該 2.3kb 之斷片及 3.9kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM 522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依前述公知之方法，萃取質體，取得含有 gmd 及 wcaG 之質體 pNK8。該質體之構造以限

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

制酶切開予以確認(圖13)。

實施例 16 GDP-FuC之生產

將實施例 14 所得之大腸桿菌 NM522/pNK7/pNT55 株、實施例 15 所得之 NM522/pNK8 株及實施例 7 所得之 NM522/pNT46 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20°C 下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNK7/pNT55 株濕菌體 25 克/升、大腸桿菌 NM522/pNK8 株濕菌體 25 克/升、大腸桿菌 NM522/pNT46 株濕菌體 25 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克/升、果糖 40 克/升、甘露糖 60 克/升、 KH_2PO_4 15 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克/升、植酸 5 克/升、GMP(2Na/7H₂O 鹽) 60 克/升、Naimin S-215 4 克/升、二甲苯 10 毫升/升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌(900rpm)，並於 32°C 下進行 24 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 1.0 克/升之 GDP-Fuc(2.5 Na, 1H₂O 鹽)。

實施例 17 neuA 表現質體之作成

以實施例 1 同樣之方法，調製大腸桿菌 K235 株

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

(ATCC13027)染色體 DNA。

合成序列編號 22 記載之意義股 DNA 引子、和序列編號 23 記載之反意義股 DNA 引子，並以該合成 DNA 作為引子，以大腸桿菌 K235 株 (ATCC13027) 染色體 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 EcoRI 及 BamHI 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片後，以 Gene Clean II 套件回收 1.3kb 之斷片。將 p Bluescript II Sk+ DNA 0.2 微克以限制酶 EcoRI 及 BamHI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 3.0 kb 之斷片。

將該 1.3kb 之斷片及 3.0kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。使用該連結反應液依常法轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克/毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得含有 neu A 基因之質體 pTA12。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 14)。

將該 pNT 12 DNA 0.5 微克以限制酶 Cla I 及 BamHI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，同樣地回收 1.3kb 之斷片。將實施例 1-1) 所取得之 pPAC31 DNA 0.2 微克以限制酶 Cla I 及 BamHI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 5.5kb 之斷片。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

將該 1.3kb 之斷片及 5.5kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克 / 毫升之 LB 洋菜培養基塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得 neuA 表現質體 pTA14。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 14)。

實施例 18 CMP-Neu Ac 之生產

將實施例 17 所得之大腸桿菌 NM 522/pTA14 株、C600/pNAL1 株 [Appl. Environ. Microbiol., 51 562 (1986)] 及 JF646/pMW5 株 [J. Biol. Chem., 261, 5568 (1986)]，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC 21170 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20℃ 下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pTA14 株濕菌體 50 克 / 升、大腸桿菌 C 600/pNAL 1 株濕菌體 15 克 / 升、大腸桿菌 JF 646/pMW5 株濕菌體 25 克 / 升、產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株濕菌體 150 克 / 升、乳清酸 (鉀鹽) 10 克 / 升、丙酮酸 (Na 鹽) 20 克 / 升、果糖 40 克 / 升、N-乙醯甘露糖胺 10 克 / 升、KH₂PO₄ 15 克 / 升、MgSO₄ · 7H₂O 5 克 / 升、植酸 5 克 / 升、Naimin S-215 4 克 / 升、二甲苯 10 毫升 / 升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

予以攪拌 (900rpm)，並於 32℃ 下進行 24 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 2.7 克 / 升之 CMP-NeuAc (Na 鹽)。

實施例 19 乳醯-N-四碳醣之生產

1) β 1,3-半乳糖基轉移酶之調製

令以含有編碼蛋白質 A 之 IgG 結合區域與 β 1,3-半乳糖基轉移酶融合蛋白質之基因之質體 pAM。ERSAW 1 (特開平 6-181759) 所轉形之 Namarva KJM-1 株，於含有 0.5 毫克 / 毫升 G418 (Gibco 公司製) 之 RPMI 640 · ITPSGF 培養基 30 毫升中，以 5×10^4 細胞 / 毫升懸浮，並於 CO_2 培養箱中，37℃、培養 8 日。

由該培養液離心除去細胞，回收上清液。該上清液視需要，可在 -80℃ 下保存，並於使用前解凍則可使用。

於生成該蛋白質 A 之 IgG 結合區域與 β 1,3-半乳糖基轉移酶融合蛋白質之培養上清液中，令疊氮化鈉以最終濃度 0.1% 添加後，添加 50 微升依據製品說明書前處理之 IgG Sepharose (Pharmacia 公司製)，並於 4℃ 下緩慢攪拌一晚。

攪拌後，經由離心回收 β 1,3-半乳糖基轉移酶所結合之 IgG Sepharose，並以 RPMI 640 · ITPSGF 培養基 1 毫升洗淨 3 回後，將該 IgG Sepharose 使用作為 β 1,3-半乳糖基轉移酶之酵素源。

2) 乳醯-N-四碳醣之生產

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

將乳醯-N-新四碳醣 (Oxford Glycosystems公司製) 依常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] 以胺基吡啶予以螢光標幟後，加入 0.1U 之 β -半乳糖苷酶 (生化學工業公司製) 並於 37℃ 下令其反應 16 小時，除去非還原終端之半乳糖。

該反應液於 100℃ 下加熱 5 分鐘，令 β -半乳糖苷酶失活。

經由該反應所得之 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc 使用作為複合糖質前驅體。

將該複合糖質前驅體 0.5mM，上述 1) 所得之 IgG Sepharose 結合之 β 1,3-半乳糖基轉移酶 0.5U、含有實施例 4 所得之 UDP-Gal 之反應液 6 微升 (5mM)、Tris-HCl (pH 7.9) 100mM、MnCl₂ 10mM、 β -氫硫基乙醇 2mM 之組成所構成之反應液 36 微升，於 32℃ 下放置 65 小時，進行反應。

反應終了後，該反應液中所蓄積之產物以下述條件使用 HPLC 予以定量。

柱：TSK gel ODS-80TM 柱 (4.6mm × 30cm，TOSOH 公司製)

液相：0.02M 醋酸銨緩衝液 (pH 4.0)

溫度：50℃

流速：1 毫升 / 分

檢測：螢光檢測器 (激發波長 320nm、放射波長 400nm)

產物之鑑定為經由比較胺基吡啶所標幟之乳醯-N-四碳醣和被標幟產物之溶出時間而進行。

經由該反應，生成 0.17mM (0.12 克 / 升) 之乳醯-N-四碳醣。

實施例 20 乳醯-N-新四碳醣之生產

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

綠

五、發明說明 ()

以實施例 19 同樣之方法，由乳醯-N-新四碳醣調製出 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc，並且使用作為複合糖質前驅體。

將該複合糖質前驅體 0.5mM、 β 1,4-半乳糖基轉移酶 (Sigma 公司製) 0.5U、含有實施例 4 所得之 UDP-Gal 之反應液 6 微升 (5mM)、100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.9) 10mM MnCl₂、2mM β -氫硫基乙醇之組成所構成之反應液 36 微升，於 32℃ 下放置 65 小時，進行反應。

反應終了後，該反應液中所蓄積之產物，以實施例 19-2) 同樣之條件下，使用 HPLC 予以定量。產物之鑑定為經由比較胺基吡啶所標幟之乳醯-N-新四碳醣與產物之溶出時間而進行。

經由該反應，生成 0.15mM (0.11 克 / 升) 之乳醯-N-新四碳醣。

實施例 21 乳醯-N-岩藻五碳醣 III 之生產

α 1,3-岩藻糖基轉移酶之結合 IgG Sepharose，為由含有編碼蛋白質 A 之 IgG 結合區域與 α 1,3-岩藻糖基轉移酶融合蛋白質之基因之質體 pAMOA-FT6 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] 所轉形之 Namarva KJM-1 株，以實施例 19-1) 同樣之方法所調製，並且使用作為 α 1,3-岩藻糖基轉移酶之酵素源。

將乳醯-N-新四碳醣 (Oxford Glycosystems 公司製) 0.25mM、IgG Sepharose 結合之 α 1,3-岩藻糖基轉移酶 1.0U、含有實施例 16 所得之 GDP-Fuc 之反應液 6 微升 (0.25

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

mM)、100mM Tris-HCl緩衝液(pH7.9)、10mM MnCl₂之組成所構成之反應液50微升，於37℃下放置24小時，進行反應。反應終了後，該反應液中所蓄積之產物，以Daionex公司製之糖分析裝置(DX-500)予以定量。尚，產物之鑑定為經由比較乳醯-N-岩藻五碳糖Ⅲ(Oxford Glycosystems公司製)與產物之溶出時間而進行。

經由該反應，生成0.21mM(0.18克/升)之乳醯-N-岩藻五碳糖Ⅲ。

實施例 22 α 1,4-半乳糖基轉移酶(IgtC)表現質體之作成

以實施例1同樣之方法調製淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrhoeae)(ATCC 33084株)染色體DNA。

合成序列編號24記載之意義股DNA引子、和序列編號25記載之反意義股DNA引子，並以該合成DNA作為引子，以淋病奈瑟氏菌(ATCC33084株)染色體DNA作為模板，並於前述之相同條件下進行PCR。

PCR終了後，以酒精沈澱法，取得DNA之沈澱。將該沈澱溶解於20微升之TE中。使用該溶解液5微升，以限制酶HindⅢ及BamHI切斷DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片後，以Gene CleanⅡ套件回收1.0kb之斷片。將實施例1-1)所取得之pPA31 DNA 0.2微克以限制酶HindⅢ及BamHI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收4.2kb之斷片。

將該1.0kb之斷片及4.2kb之斷片使用連結套件，於16℃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

下進行16小時連結反應。

使用該連結反應液依前述公知之方法，轉形大腸桿菌 NM522株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基上塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得lgt C表現質體pGT3。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖15)。

實施例 23 球形三碳醣之生產

將實施例4所得之大腸桿菌 NM522/pNT25/pNT32株、實施例22所得之 NM522/pGT3株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在-20℃下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT25/pNT32株濕菌體50克/升、大腸桿菌 NM522/pGT3株濕菌體50克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC 21170株濕菌體150克/升、果糖100克/升、半乳糖100克/升、乳糖100克/升、 KH_2PO_4 15克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5克/升、植酸5克/升、乳清酸(鉀鹽)10克/升、Naimin S-215 4克/升、二甲苯10毫升/升之組成所構成之反應液30毫升，放入200毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌(900rpm)，並於32℃下進行36小時反應。

反應中，使用4N NaOH，將該反應液之pH維持於7.2，且視需要，添加半乳糖、乳糖、果糖、 KH_2PO_4 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

經由該反應，於反應液中生成188克/升之球形三碳醣。

將該反應液離心除去菌體，並由所得之上清液10毫升，經由使用活性炭之方法進行精製，取得球形三碳醣之白色粉末1.5克。

實施例 24 Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc之生產

將實施例 4 所得之大腸桿菌 NM552/pNT25/pNT32 株、實施例 22 所得之 NM522/pGT3 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20℃ 下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT25/pNT32 株濕菌體 50 克/升、大腸桿菌 NM522/pGT3 株濕菌體 50 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC 21170 株濕菌體 150 克/升、果糖 50 克/升、半乳糖 50 克/升、N-乙醯乳糖胺 96 克/升、KH₂PO₄ 15 克/升、MgSO₄·7H₂O 5 克/升、植酸(鉀鹽)10 克/升、Naimin-S-215 4 克/升、二甲苯 10 毫升/升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌 (900rpm)，並於 32℃ 下進行 36 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加半乳糖、果糖、KH₂PO₄。

經由該反應，於反應液中生成 10 克/升之 Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc。

將該反應液離心除去菌體，並由所得之上清液 30 毫升，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

經由使用活性炭之方法精製產物，取得 Gal α 1-4 Gal β 1-4 Glc NAc之白色粉末0.2克。

實施例 25 β 1,4-半乳糖基轉移酶 (lgt B) 表現質體之作成

合成序列編號 26 記載之意義股 DNA 引子、和序列編號 27 記載之反意義股 DNA 引子，並以該合成 DNA 作為引子，以淋病奈瑟氏菌 (ATCC33084 株) 之染色體 DNA 作為模板，並於前述之相同條件下進行 PCR。

PCR 終了後，以酒精沈澱法，取得 DNA 之沈澱。將該沈澱溶解於 20 微升之 TE 中。使用該溶解液 5 微升，以限制酶 Hind III 及 Bam HI 切斷 DNA，並以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片後，以 Gene Clean II 套件回收 0.8kb 之斷片。將 p Bluescript II Sk + DNA 0.2 微克以限制酶 Hind III 及 Bam HI 切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出 DNA 斷片，且同樣地回收 3.0kb 之斷片。

將該 0.8kb 之斷片及 3.0kb 之斷片使用連結套件，於 16℃ 下進行 16 小時連結反應。

使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌 NM522 株，並將該轉形體於含有安比西林 50 微克/毫升之 LB 洋菜培養基上塗布後，於 30℃ 下培養一晚。

由可生長之轉形體菌落，依常法萃取質體，取得含有 lgt B 基因之質體 pNT 60P。該質體之構造以限制酶切開予以確認 (圖 16)。

將該 pNT 60P DNA 0.5 微克以限制酶 Cla I 及 Bam HI 切斷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，並回收0.8kb之斷片。將實施例1-1)所取得之pPAC31 DNA 0.2微克以限制酶Cla I及BamHI切斷後，以瓊脂糖膠電泳分離出DNA斷片，且同樣地回收5.5kb之斷片。

將該0.8kb之斷片及5.5kb之斷片使用連結套件，於16℃下進行16小時連結反應。使用該連結反應液依常法，轉形大腸桿菌NM522株，並將該轉形體於含有安比西林50微克/毫升之LB洋菜培養基塗布後，於30℃下培養一晚。

由可生長之轉形體，依常法萃取質體，取得lgt B表現質體pNT60。該質體之構造以限制酶切開予以確認(圖16)。

實施例 26 N-乙醯乳糖胺之生產

將實施例25所得之大腸桿菌NM522/pNT60株、實施例3所得之大腸桿菌NM522/pNT25株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌ATCC21170株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在-20℃下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌NM522/pNT25株濕菌體50克/升、大腸桿菌NM522/pNT60株濕菌體50克/升、產氨棒狀桿菌ATCC 21170株濕菌體150克/升、乳清酸(鉀鹽)10克/升、果糖100克/升、N-乙醯葡萄糖胺100克/升、半乳糖100克/升、KH₂PO₄ 15克/升、MgSO₄·7H₂O 5克/升、植酸5克/升、Naimin S-215 4克/升、二甲苯10毫升/升之組成所構成之反應液30毫升，放入200毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

器予以攪拌(900rpm)，並於32℃下進行34小時反應。

反應中，使用4N NaOH，將該反應液之pH維持於7.2，且視需要，添加半乳糖、果糖、 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成114克/升之N-乙醯乳糖胺。

實施例 27 乳糖之生產

將實施例 25 所得之大腸桿菌 NM522/pNT60 株、實施例 3 所得之大腸桿菌 NM522/pNT25 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170 株，以實施例 2 同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在-20℃下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT25 株濕菌體 50 克/升、大腸桿菌 NM522/pNT60 株濕菌體 50 克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC 21170 株濕菌體 150 克/升、乳清酸(鉀鹽)10 克/升、葡萄糖 115 克/升、乳糖 115 克/升、 KH_2PO_4 15 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克/升、植酸 5 克/升、Naimin S-215 4 克/升、二甲苯 10 毫升/升之組成所構成之反應液 30 毫升，放入 200 毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌(900rpm)，並於 32℃ 下進行 15 小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH 維持於 7.2，且視需要，添加 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 49 克/升之乳糖。

實施例 28 球形三碳醣之生產

將實施例 25 所得之大腸桿菌 NM522/pNT60 株、實施例 3 所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

得之大腸桿菌 NM522/pNT25株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之各培養物離心取得濕菌體。又，將產氨棒狀桿菌 ATCC21170株，以實施例2同樣之方法培養，並將所得之培養物離心取得濕菌體。該濕菌體視需要可在 -20°C 下保存，並可於使用前解凍供使用。

將大腸桿菌 NM522/pNT25株濕菌體 50克/升、大腸桿菌 NM522/pNT60株濕菌體 50克/升、產氨棒狀桿菌 ATCC 21170株濕菌體 150克/升、乳清酸(鉀鹽) 10克/升、葡萄糖 115克/升、半乳糖 115克/升、 KH_2PO_4 15克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5克/升、植酸 5克/升、Naimin S-215 4克/升、二甲苯 10毫升/升之組成所構成之反應液 30毫升，放入 200毫升容積燒杯中，該反應液以磁性攪拌器予以攪拌(900rpm)，並於 32°C 下進行 13小時反應。

反應中，使用 4N NaOH，將該反應液之 pH維持於 7.2，且視需要，添加 KH_2PO_4 。

經由該反應，於反應液中生成 5克/升之球形三碳酶。

產業上之可利用性

依據本發明，則可僅以核苷酸之前驅物質及糖作為原料，以工業上良好效率地製造糖核苷酸，且由該核苷酸及複合糖質前驅物質，可以工業上良好效率地製造複合糖質。

序列表

序列編號：1

序列長度：31

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

GGAGAAAGCT TATGGCTGCC ATTAATACGA A-

21

序列編號：2

序列長度：30

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

AACACGGATC CGGATGTTAC TTCTTAATGC

30

序列編號：3

序列長度：28

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

ATGGAGGATC CTGCTCTGTA TACCGTCT

28

序列編號：4

序列長度：20

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TGCTGGTCGA CCTGCGCTTG

20

序列編號：5

序列長度：31

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

AAGGAAAGCT TATGACGCAA TTAAATCCCG T

31

序列編號：6

序列長度：20

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

GCAAAGTTAA CAGTCGGTAC

20

序列編號：7

序列長度：31

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TCAGGAAGCT TATGTTGAAT AATGCTATGA G

31

序列編號：8

序列長度：27

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TCTCCGGATC CCATGTGACC GGGTTAG

27

序列編號：9

序列長度：28

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TCTAAACGA TGCAGACAAA GGACAAAG

28

序列編號：10

序列長度：27

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TTGCAGGATC CTCGTAGGCC TGATAAG

27

序列編號：11

序列長度：20

序列類型：核酸

拓撲學：單鏈

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TGATATCCGC TCCCTTTCCG

20

序列編號：12

序列長度：26

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

ACAGCGGATC CGATGTGTTC GCTGAG

26

序列編號：13

序列長度：29

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

ACAGCAAGCT TTTGACTTTA GCGGAGCAG

29

序列編號：14

序列長度：29

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

GAGTTGGATC CCGATATAAA AGGAAGGAT

29

序列編號：15

序列長度：25

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TTTTTAAGCT TCATTTATCA AGAGT

28

序列編號：16

序列長度：31

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TTTTTGATAT CCCCAATGCT GGGGGTTTTT G

31

序列編號：17

序列長度：31

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

CGTCAAAGCT TAAATGATAT TCGGGGATAA T

31

序列編號：18

序列長度：25

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

AGGGAGGATC CGACATTACT CGTTC

25

序列編號：19

序列長度：33

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

CCGCAAGATC TCGTAAAAAG GGTATCGATA AGC

33

序列編號：20

序列長度：27

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TTGGGAAGCT TCCGGCAAAT GTGGTTT

27

序列編號：21

序列長度：25

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

ATAAACTCGA GAGAGACAAG CGGAG

25

序列編號：22

序列長度：27

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

TATTATCGAT GAATTAATAA TTCATAG

27

序列編號：23

序列長度：25

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

CTCTGGATCC AGTTACGTAT AATAT

25

序列編號：24

序列長度：30

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

CGGCAAGCTT ATTGTGCCTT TCCAATAAAA

30

序列編號：25

序列長度：28

序列類型：核酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

ACTTGGATCC CCGTCAATAA ATCTTGCG

28

序列編號：26

序列長度：30

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

GGTAAA GCTT ATGCAAAACC ACGTTATCAG

30

序列編號：27

序列長度：29

序列類型：核酸

拓撲學：單股

序列種類：其他之核酸、合成DNA

序列

AAACGGATCC TTATTGGAAA GGCACAATA

29

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

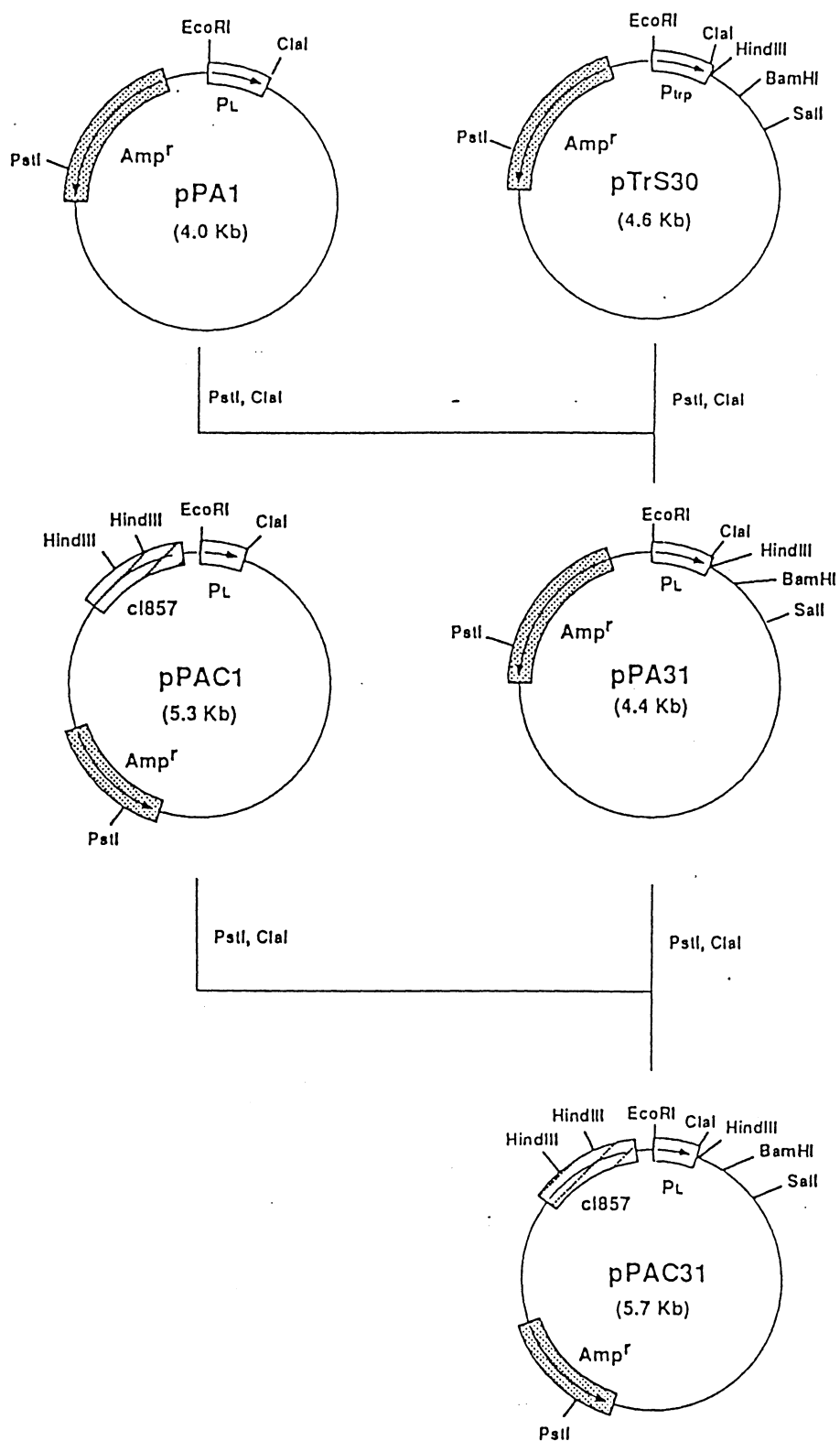
裝

訂

線

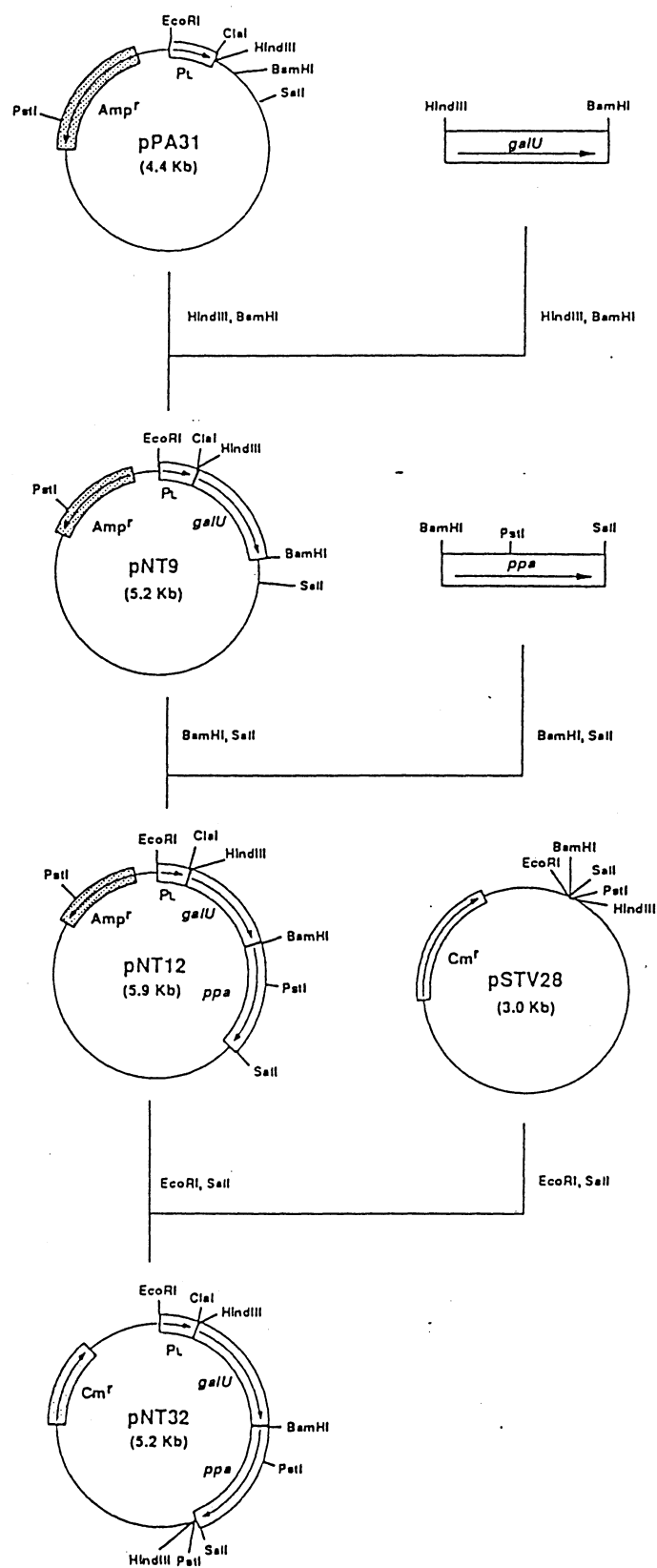


1



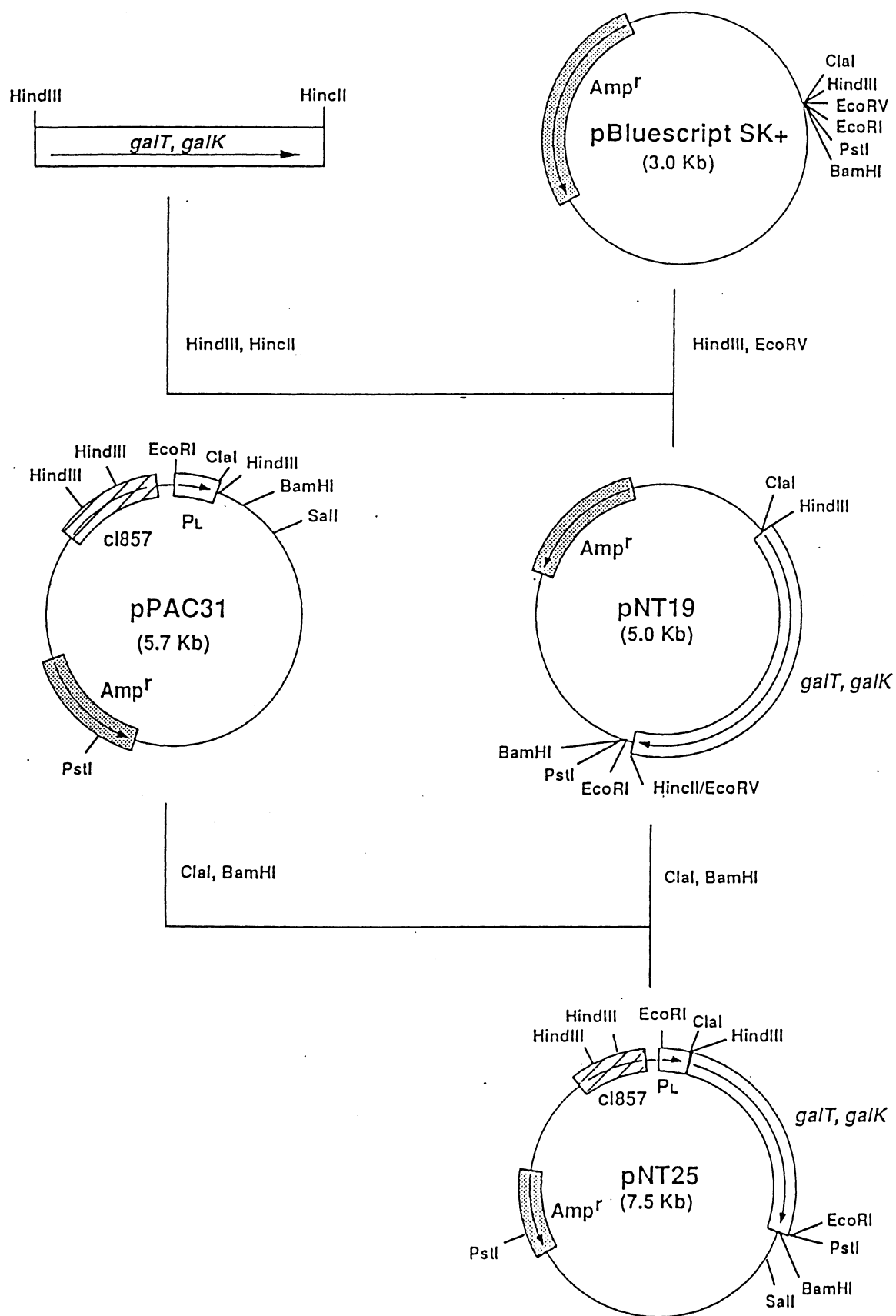


2



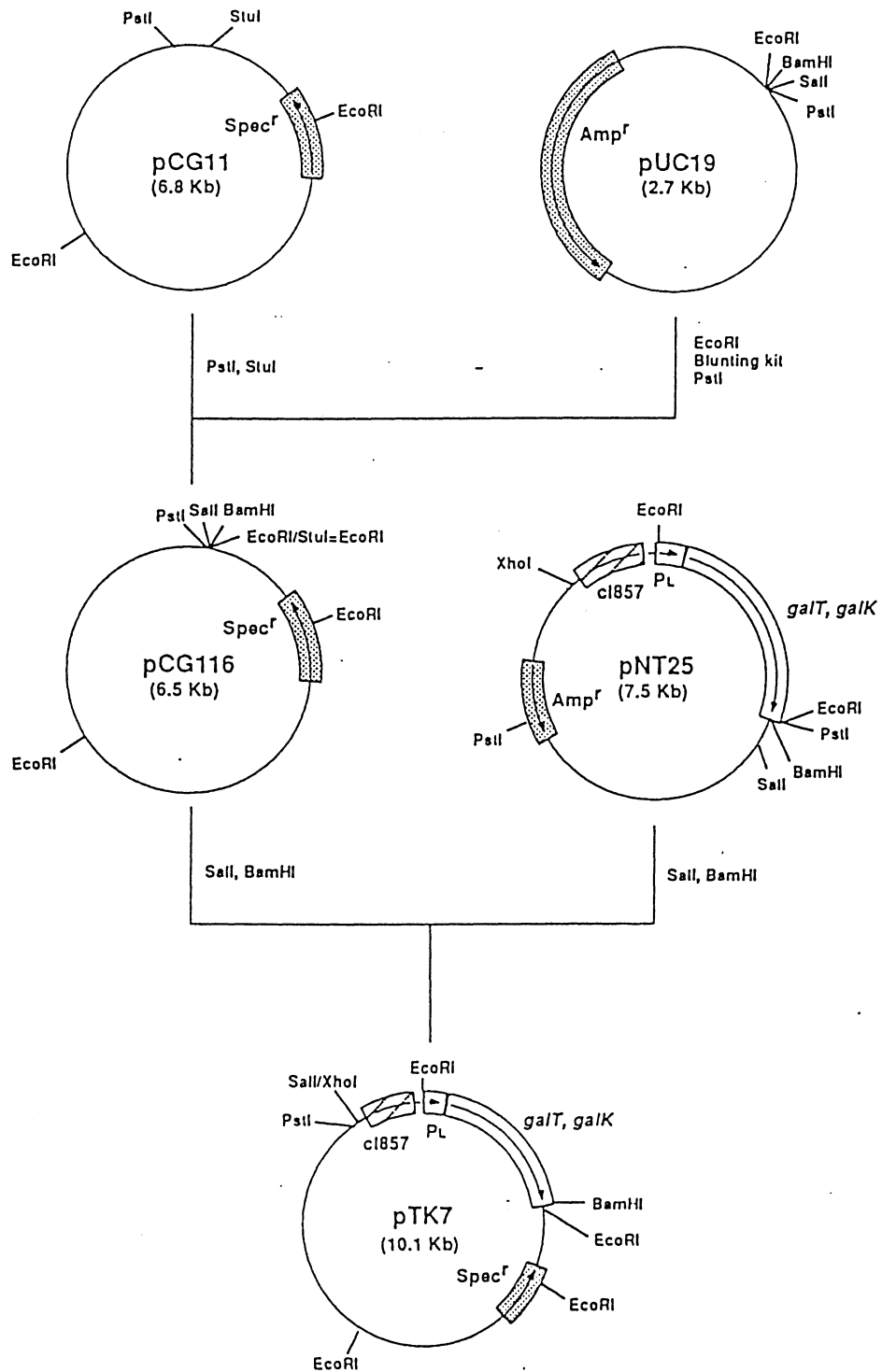


3





4





5

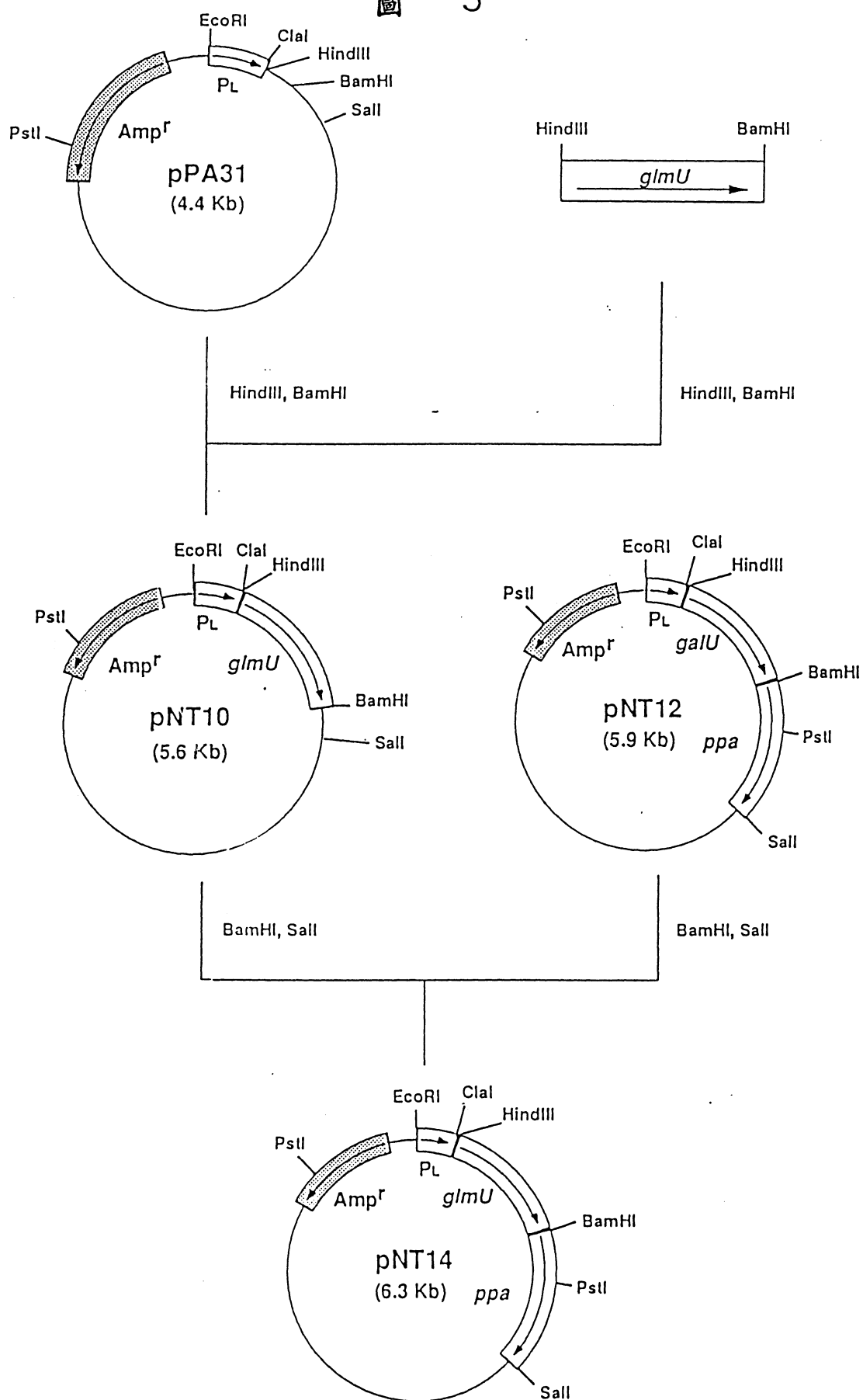
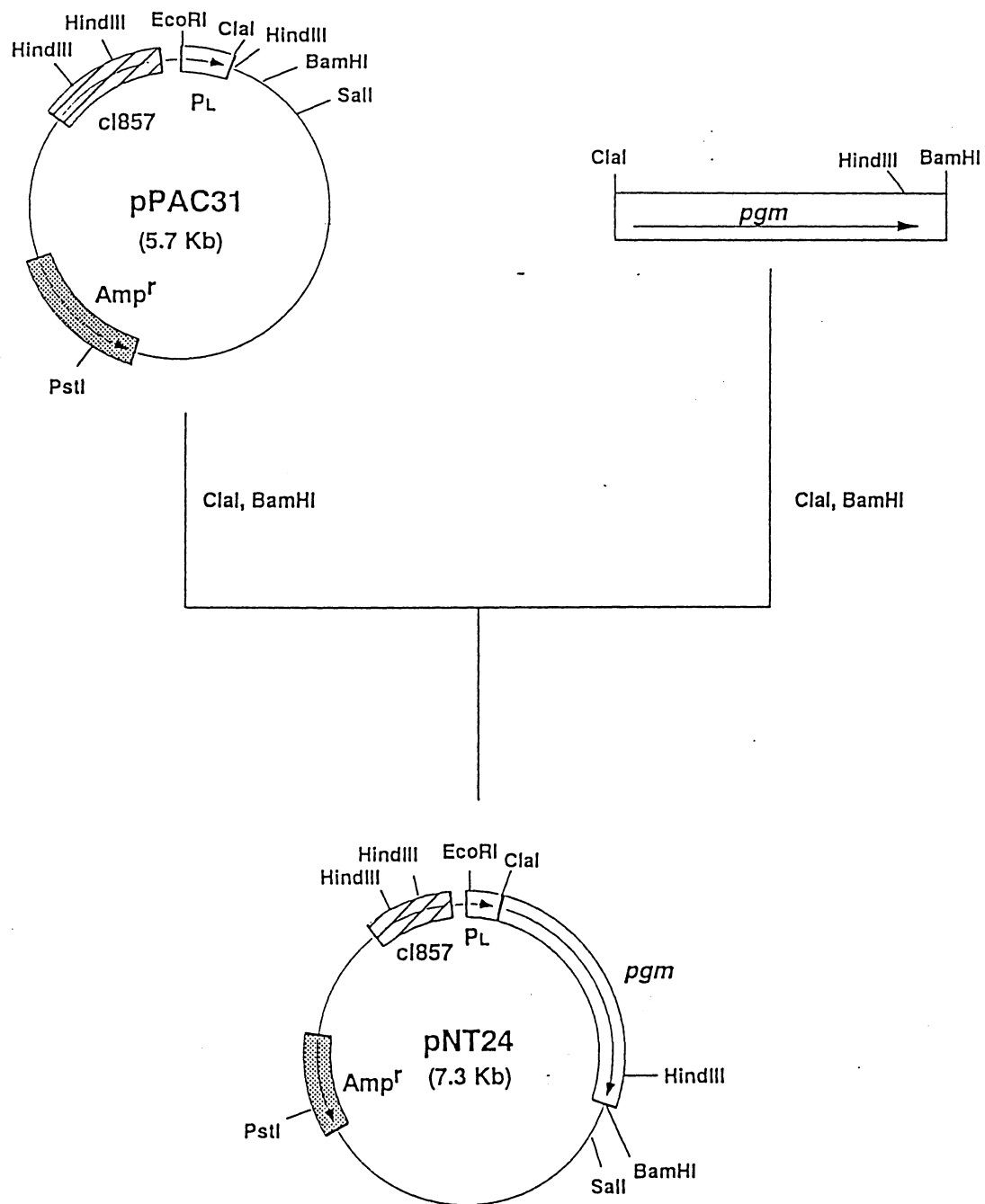
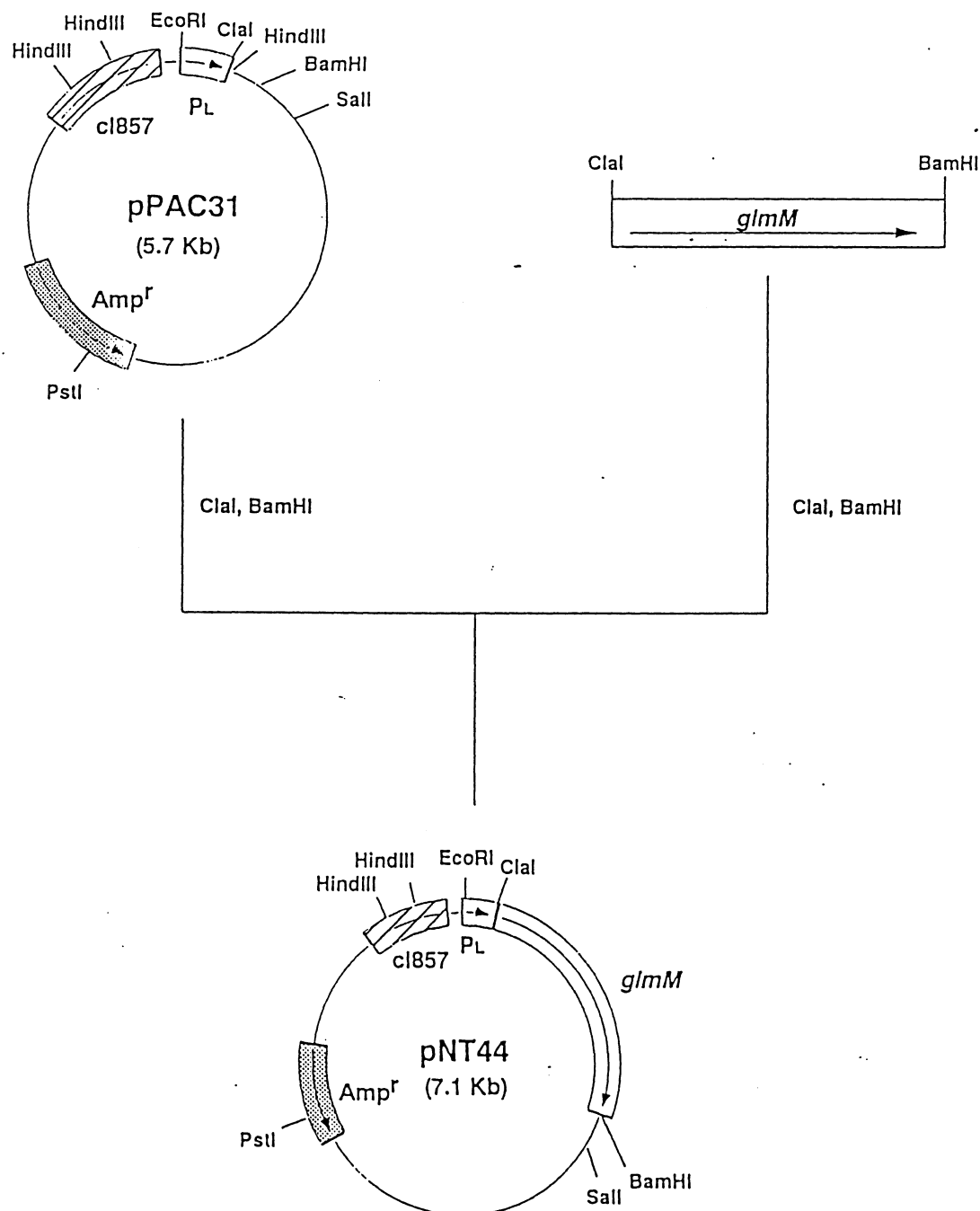


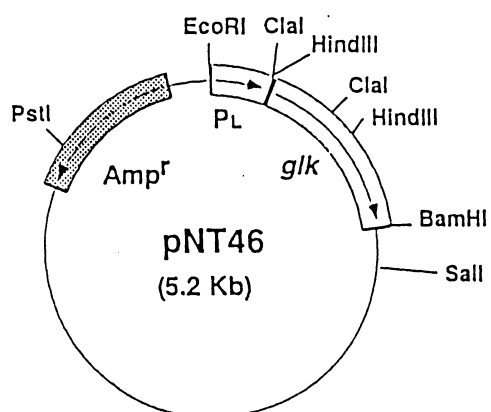
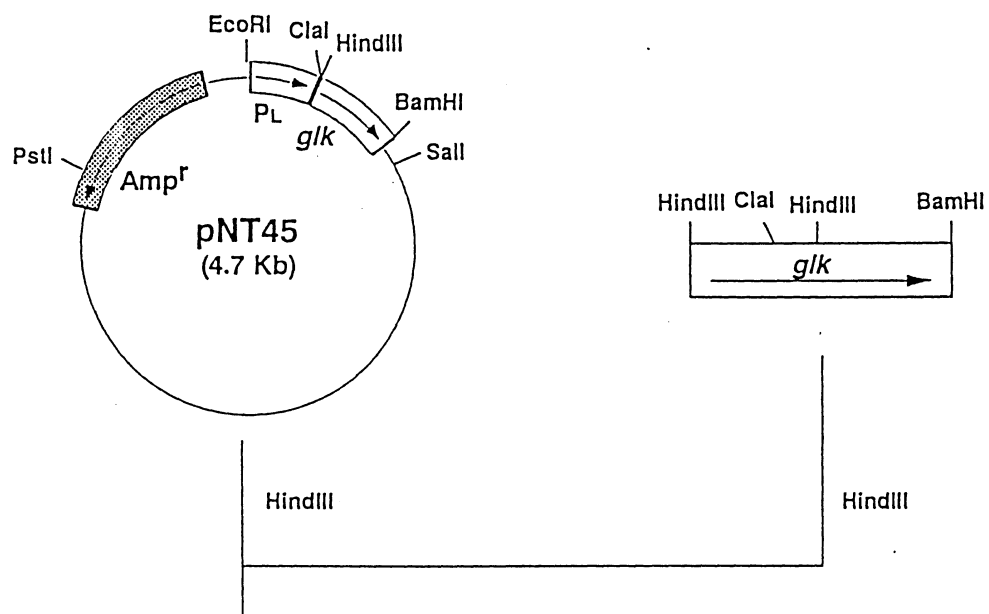
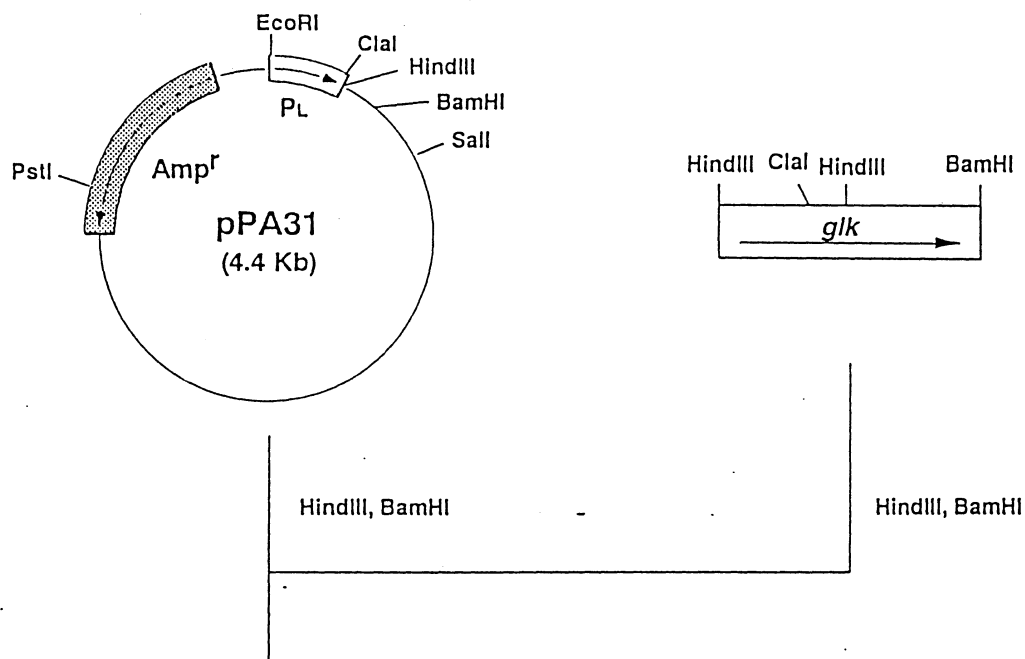
圖 6





7





圖

9

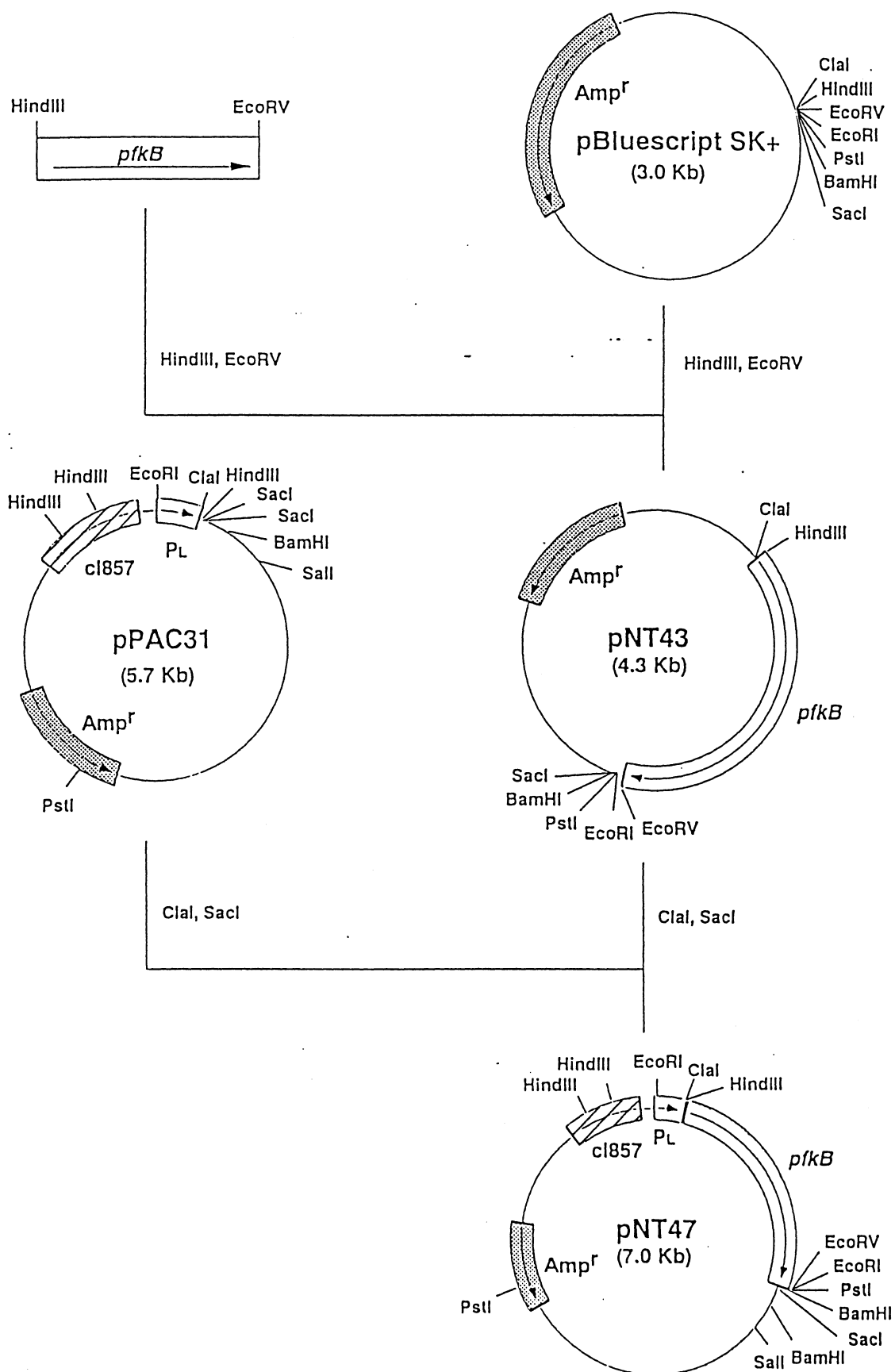


圖 10

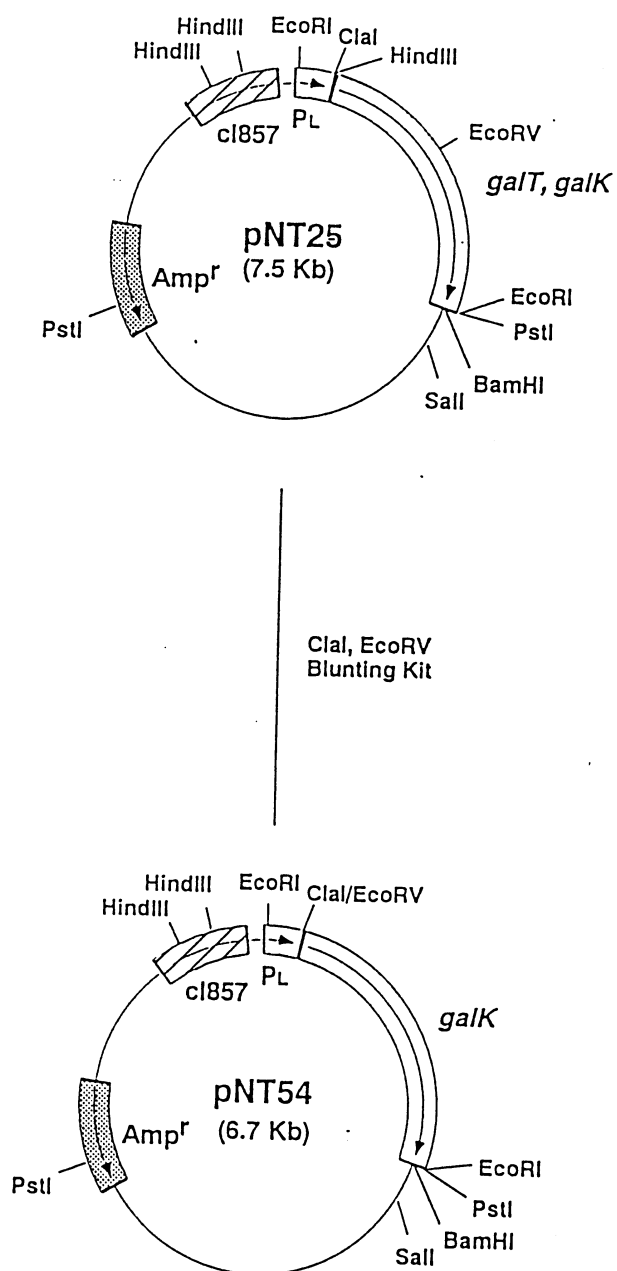


圖 11

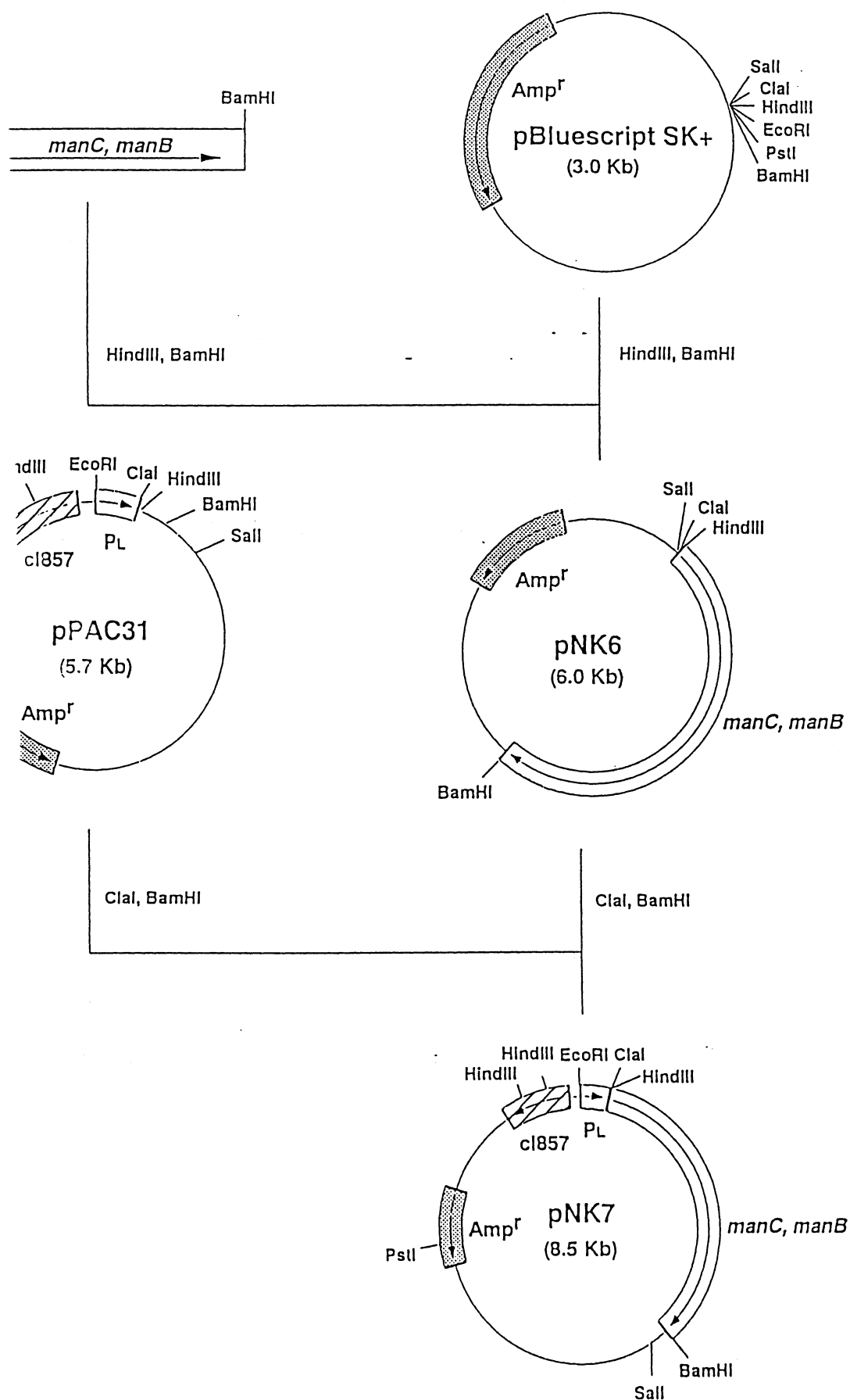


圖 12

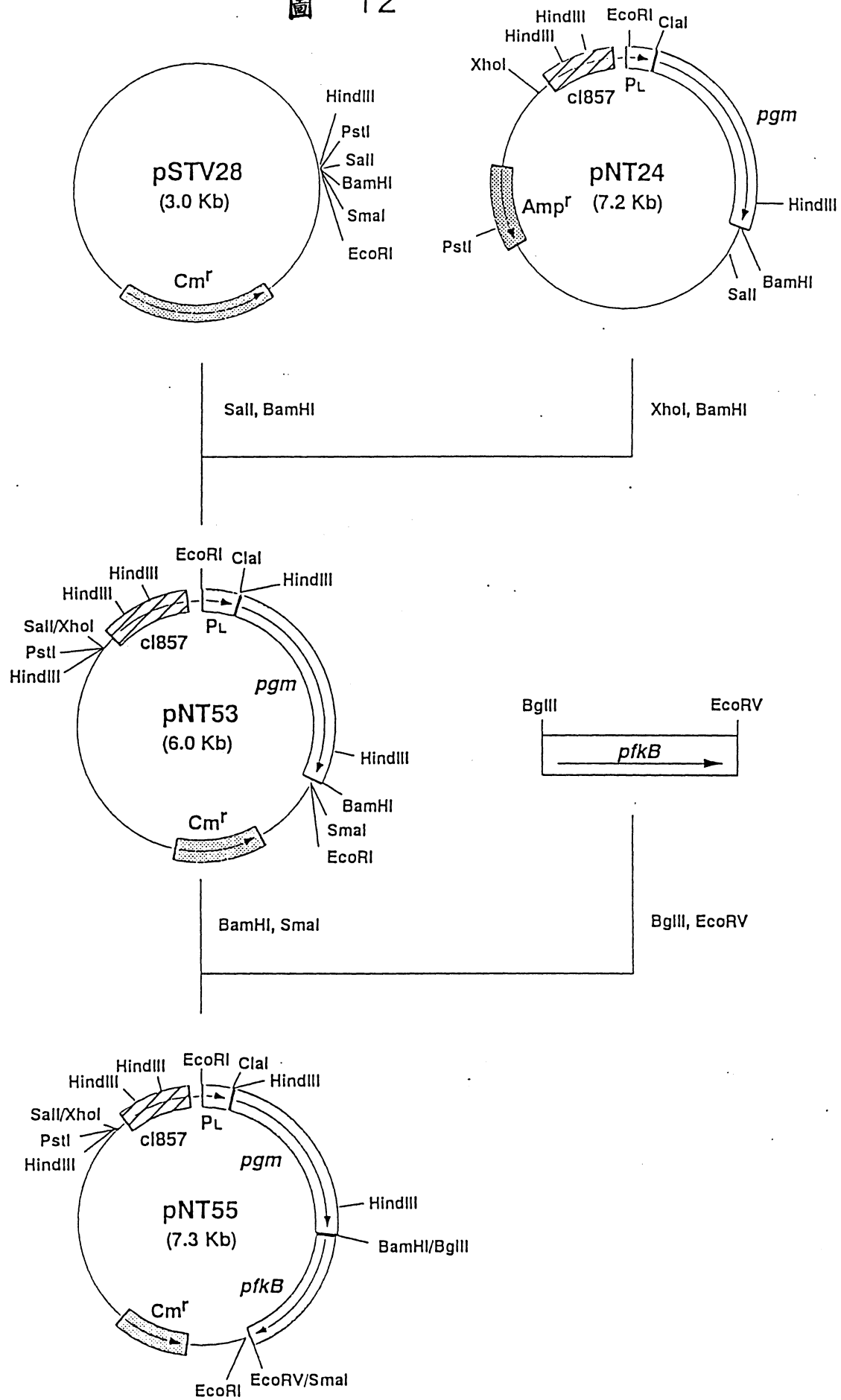


圖 13

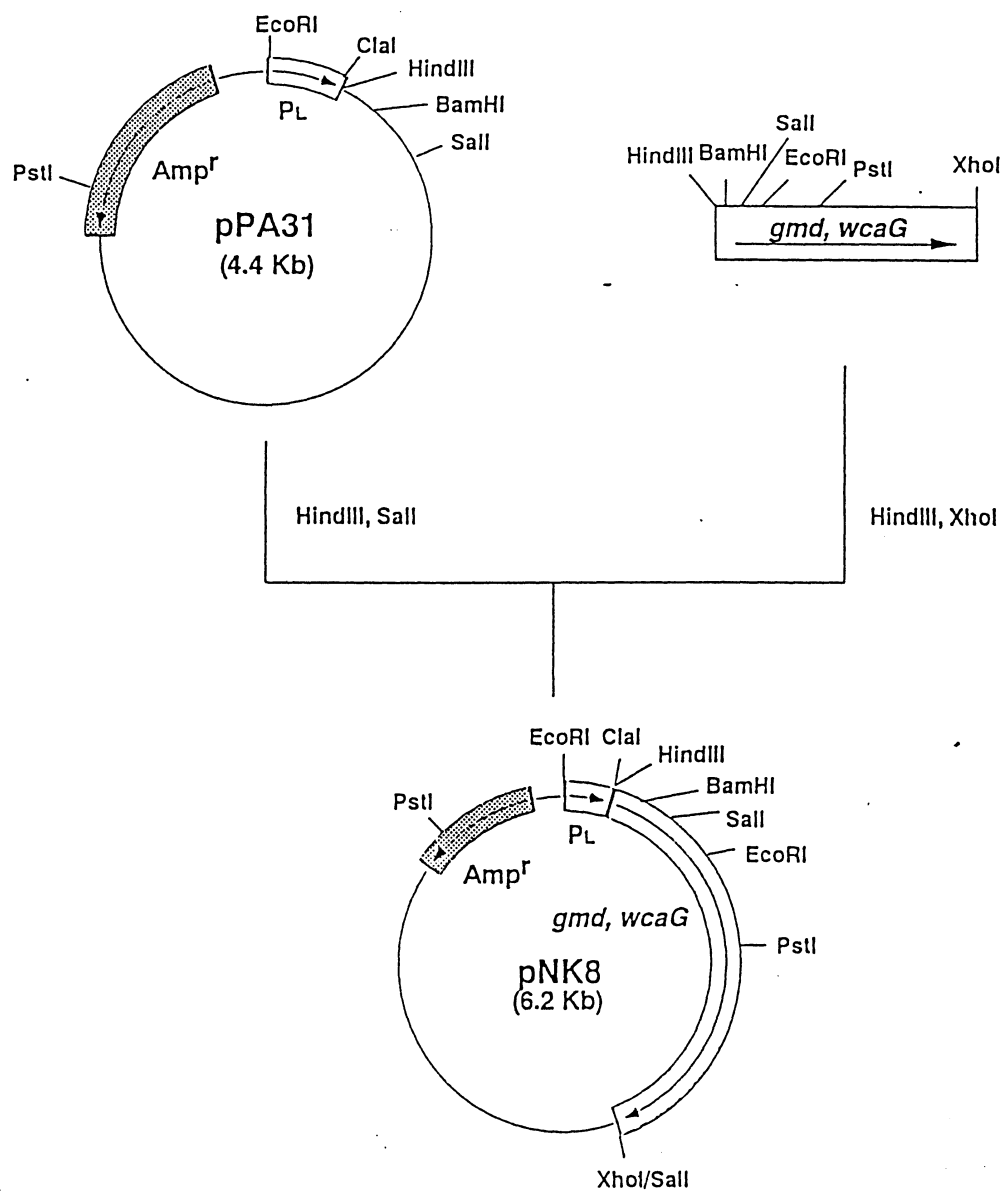
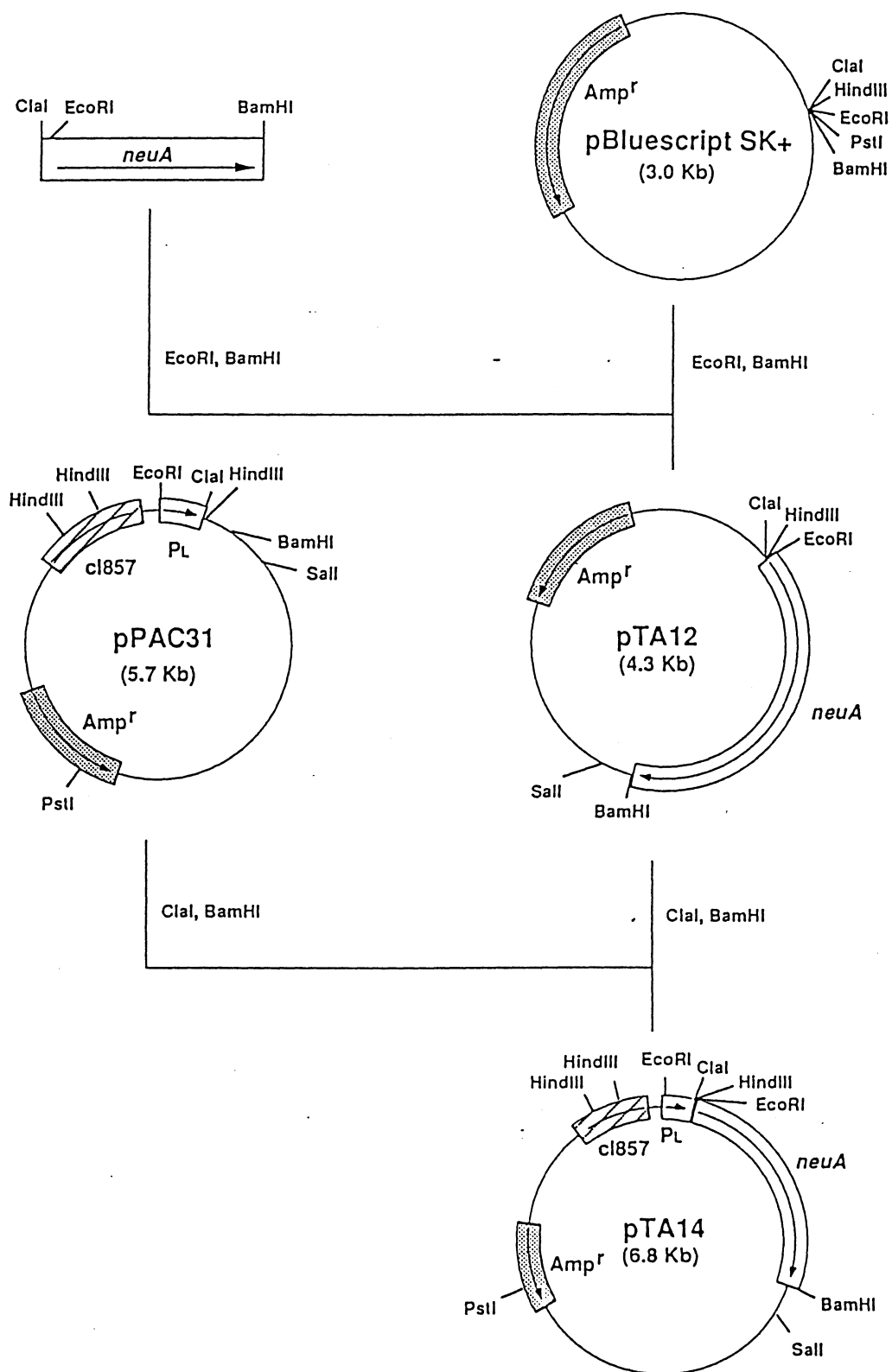
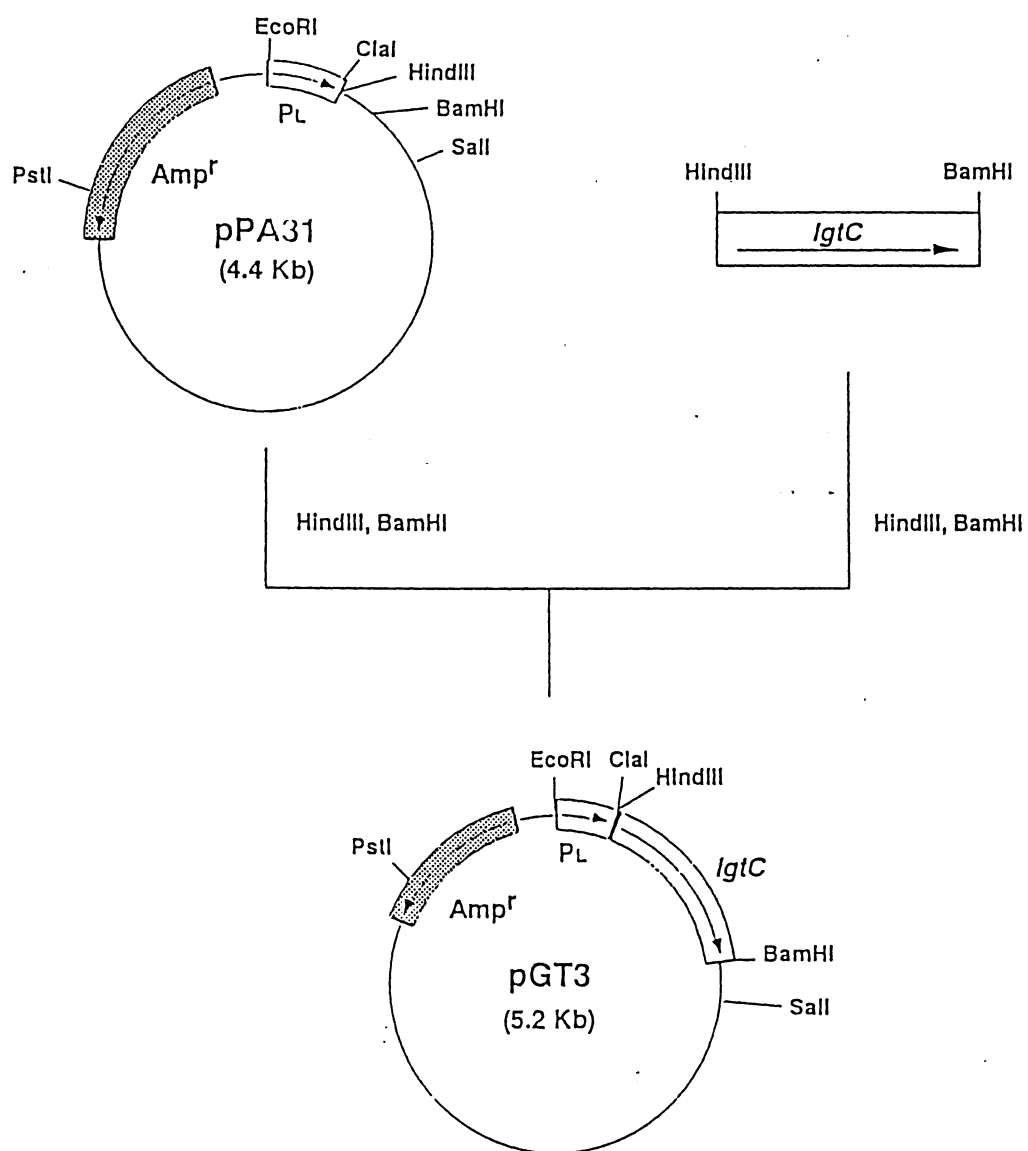
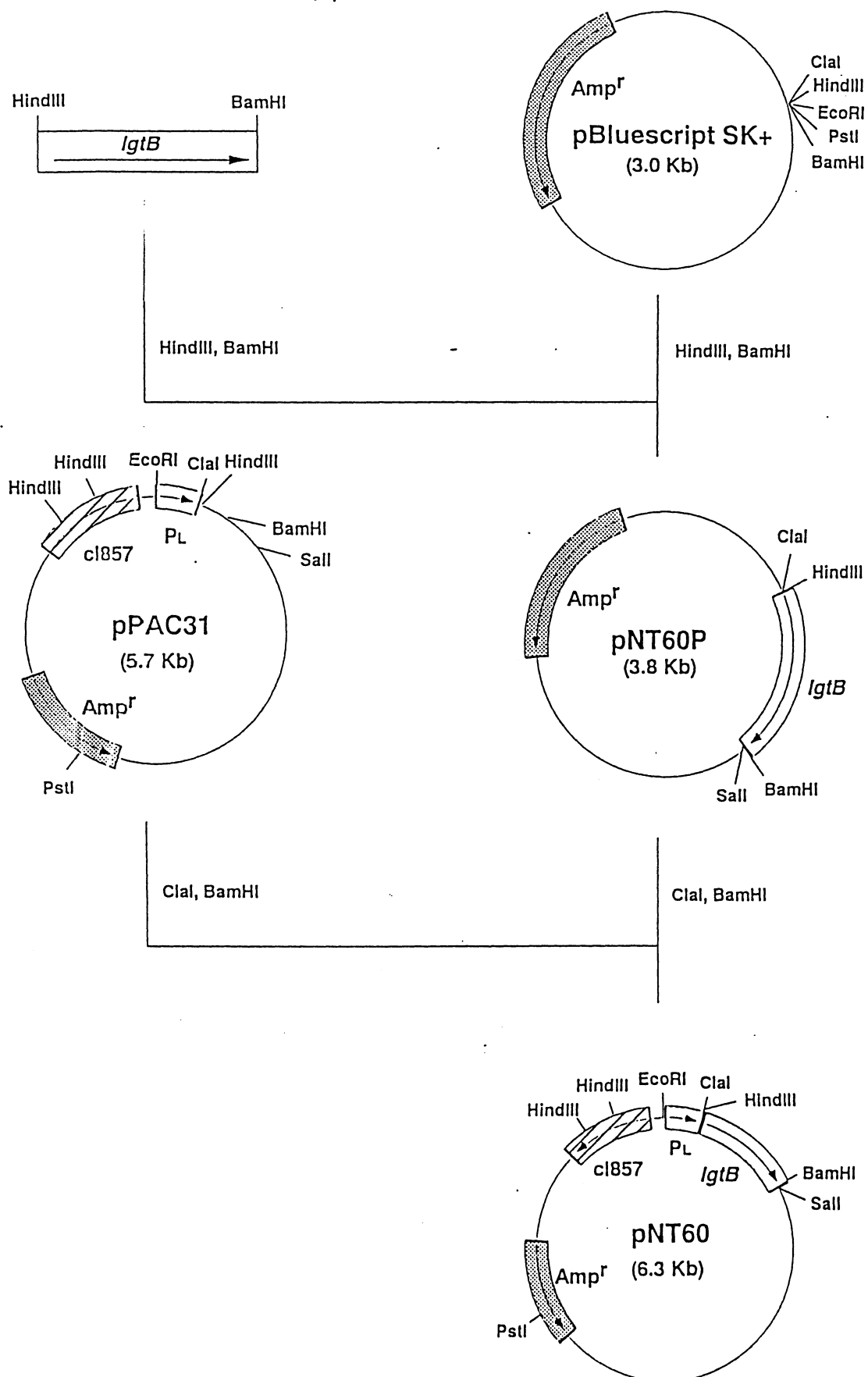


圖 14



15





公告本

申請日期	87.3.16
案 號	87103820
類 別	C12P19/26. C12N1/21. 15/34. 5/16

(以上各欄由本局填註)

修正

C4

本 年 月 日

補充 90.3.20

發 明 專 利 說 明 書

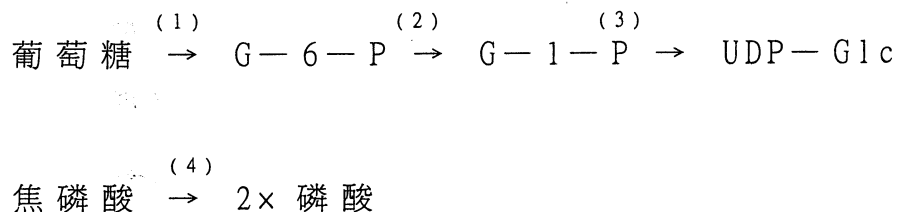
一、發明 名稱	中 文	糖核苷酸類及複合糖質之製造方法
	英 文	PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES
二、發明 創作人	姓 名	(1)小 泉 聰 司 (2)佐 佐 木 克 敏 (佐々木克敏) (3)遠 藤 徹 夫 (4)田 畑 和 彦 (5)尾 崎 明 夫
	國 籍	日 本
三、申請人	住、居所	(1)日本國東京都町田市中町 3-9-10 (2)日本國東京都町田市本町田 1171-3-201 (3)日本國東京都町田市森野 4-17-17 (4)日本國東京都町田市森野 4-17-9 (5)日本國東京都町田市中町 3-9-13
	姓 名 (名稱)	協和醱酵工業股份有限公司 (協和醱酵工業株式會社)
三、申請人	國 籍	日 本
	住、居所 (事務所)	日本國東京都千代田區大手町 1 丁目 6 番 1 號
三、申請人	代 表 人 姓 名	平 田 正

五、發明說明(9)

用，例如，關於 2)-① UDP-Glc 之生產，則以使用下述式 1 所示之(1)至(4)之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬之微生物及屬於棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

又，亦可使用(1)、(2)、(3)及(4)所選出一個以上酵素之活性經由基因重組技術而增強之轉形株。該轉形株之具體例可列舉具有含來自大腸桿菌之 galU 及 ppa 基因之重組體 DNA(pNT12)的大腸桿菌 KY8415(FERM BP-408)株等。



(式 1)

(1)：己糖激酶(EC2.7.1.1)或葡萄糖激酶(EC2.7.1.2)

(2)：磷酸葡萄糖變位酶(EC2.7.5.1)

(3)：葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶(EC2.7.7.9)

(4)：(Innorganic)焦磷酸酶(EC3.6.1.1)

關於 2)-② UDP-Gal 之生產，則以使用具有下述式 2 所示之(5)及(6)之酵素活性強的微生物、較佳為亦合併具有式 1 所示之(1)至(4)之酵素活性強的微生物為較佳。

具體而言，可列舉屬於埃希氏桿菌屬之微生物及屬於棒狀桿菌屬之微生物，較佳具體例可列舉大腸桿菌或產氨棒狀桿菌。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

修正
補充
四、中文發明摘要(發明之名稱: 糖核苷酸類及複合糖質之製造方法)

本發明為關於使用 a) 具有由核苷酸之前驅物質生產 NTP 能力之微生物培養液或該培養液之處理物及 b) 具有由糖和 NTP 生產糖核苷酸能力之微生物培養液或該培養液之處理物作為酵素源之糖核苷酸的製造方法、使用具有由上述 a)、上述 b) 及 c) 糖核苷酸和複合糖質前驅物質生產複合糖質能力之微生物、動物細胞或昆蟲細胞之培養液或該培養液之處理物作為酵素源之複合糖質的製造方法、使用具有由糖核苷酸和複合糖質前驅物質生產複合糖質能力之微生物、動物細胞或昆蟲細胞之培養液或該培養液之處理物作為酵素源之複合糖質的製造方法及使用半乳糖激酶活性強之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源之 N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸的製造方法。

英文發明摘要(發明之名稱: PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES)

A process for producing sugar nucleotides with the use of, as enzyme sources, a) an optionally treated culture of a microorganism capable of producing NTP from a nucleotide precursor, and b) an optionally treated culture of a microorganism capable of producing a sugar nucleotide from a sugar and NTP; a process for producing complex carbohydrates with the use of, as enzyme sources, the above-mentioned cultures a) and b), and c) an optionally treated culture of a microorganism, animal cells or insect cells capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor; a process for producing complex carbohydrates with the use of; as an enzyme source, an optionally treated culture of a microorganism, animal cells or insect cells capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor; and a process for producing N-acetylglucosamine-1-phosphate with the use of, as an enzyme source, an optionally treated culture of a microorganism having a potent galactokinase activity.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種 UDP-葡萄糖之製法，其特徵為：

a) 使用屬於產氨棒狀桿菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) 之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從乳清酸中生產尿苷-5'-三磷酸 (以下簡稱 UTP) 之能力；以及

b) 使用屬於大腸桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌為從葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶以及焦磷酸酶中所選出之一個以上酵素活性強，且具有從葡萄糖和 UTP 生產尿苷二磷酸葡萄糖 (以下簡稱 UDP-葡萄糖) 之能力，

藉此俾使該酵素源、乳清酸及葡萄糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 UDP-葡萄糖，以自該水性介質中採集 UDP-葡萄糖。

2. 一種 UDP-半乳糖之製法，其特徵為：

a) 使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從乳清酸中生產 UTP 之能力；及

b) 使用屬於大腸桿菌或產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌或產氨棒狀桿菌為從半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶、葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶以及焦磷酸酶中所選出之一個以上酵素活性強，且具有從選自葡萄糖、果糖及半乳糖所組成之群組中的糖與 UTP 生產尿苷二磷酸半乳糖 (以下簡稱 UDP-半乳糖) 之能力，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

藉此俾使選自該酵素源乳清酸、及選自葡萄糖、半乳糖及果糖所組成之群組中的糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 UDP-半乳糖，以自該水性介質中採集 UDP-半乳糖。

3. 一種 UDP-N-乙醯葡萄糖胺之製法，其特徵為：

a) 使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從乳清酸中生產 UTP 之能力；及

b) 使用屬於大腸桿菌或產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌或產氨棒狀桿菌為由葡萄糖激酶、磷酸葡萄糖胺變位酶、葡萄糖胺-1-磷酸乙醯轉移酶、N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸尿苷醯轉酶、焦磷酸酶、磷酸葡萄糖胺變位酶及磷酸果糖激酶中所選出之一種以上酵素活性強，且具有從選自果糖、葡萄糖胺-6-磷酸及葡萄糖胺所組成之群組中的糖與 UTP 生產尿苷二磷酸-N-乙醯葡萄糖胺（以下簡稱 UDP-N-乙醯葡萄糖胺）之能力，

藉此俾使該酵素源、乳清酸及選自果糖、葡萄糖胺-6-磷酸及葡萄糖胺所組成之群組中的糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 UDP-N-乙醯葡萄糖胺，以自該水性介質中採集 UDP-N-乙醯葡萄糖胺。

4. 一種 UDP-N-乙醯葡萄糖胺之製法，其特徵為：

a) 使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從乳清酸中生

六、申請專利範圍

產 UTP 之能力；及

b)使用屬於大腸桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌為由半乳糖激酶、N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸尿苷醯轉移酶及焦磷酸酶中所選出之一種以上酵素活性強，且具有從選自果糖及 N-乙醯葡萄糖胺所組成之群組中的糖與 UTP 生產 UDP-N-乙醯葡萄糖胺之能力，

藉此俾使該酵素源、乳清酸及選自果糖及 N-乙醯葡萄糖胺所組成之群組中的糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 UDP-N-乙醯葡萄糖胺，以自該水性介質中採集 UDP-N-乙醯葡萄糖胺。

5.一種 CMP-N-乙醯神經胺酸之製法，其特徵為：

a)使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從乳清酸中生產 UTP 之能力；及

b)使用屬於大腸桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌為由 CMP-NeuAc 合成酶、NeuAc 醛縮酶及 CTP 合成酶中所選出之一種以上酵素活性強，且具有從選自果糖、N-乙醯甘露糖胺及 N-乙醯神經胺酸所組成之群組中的糖與 UTP 生產 CMP-N-乙醯神經胺酸之能力，

藉此俾使該酵素源、乳清酸及選自果糖、N-乙醯甘露糖胺及 N-乙醯神經胺酸所組成之群組中的糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 CMP-N-乙醯神經胺酸，以自該水性介質中採集 CMP-N-乙醯神經胺酸。

6.一種 GDP-甘露糖之製法，其特徵為：

六、申請專利範圍

a)使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從鳥苷-5'-單磷酸(以下簡稱 GMP)中生產鳥苷-5'-三磷酸(以下簡稱 GTP)之能力；及

b)使用屬於大腸桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌為由磷酸甘露糖變位酶、甘露糖-1-磷酸鳥苷醯轉移酶、磷酸葡萄糖變位酶及磷酸果糖激酶中所選出之一種以上酵素活性強，且具有從選自果糖及甘露糖所組成之群組中的糖與 GTP 生產鳥嘌呤核苷二磷酸甘露糖(以下簡稱 GDP-甘露糖)之能力，

藉此俾使該酵素源、GMP 及選自果糖與甘露糖所組成之群組中的糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 GDP-甘露糖，以自該水性介質中採集 GDP-甘露糖。

7.一種 GDP-海藻糖之製法，其特徵為：

a)使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從 GMP 中生產 GTP 之能力；及

b)使用屬於大腸桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌為由磷酸甘露糖變位酶、甘露糖-1-磷酸鳥苷醯轉移酶、GDP-甘露糖-4,6-脫水酶、GDP-4-酮基-6-脫氧甘露糖表異構酶/還原酶、磷酸葡萄糖變位酶及磷酸果糖激酶中所選出之一種以上酵素活性強，且具有從選自果糖及甘露糖所組成之群組中的糖與 GTP 生產鳥嘌呤核苷二磷酸海藻糖(以下簡稱 GDP-海藻糖)之能力，

六、申請專利範圍

藉此俾使該酵素源、GMP 及選自果糖與甘露糖所組成之群組中的糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積 GDP-海藻糖，以自該水性介質中採集 GDP-海藻糖。

8. 一種複合糖質之製法，其特徵為：

a) 使用屬於產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該產氨棒狀桿菌具有從乳清酸中生產 UTP 之能力；

b) 使用屬於大腸桿菌或產氨棒狀桿菌之微生物的培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌或產氨棒狀桿菌具有從選自葡萄糖、果糖及半乳糖所組成之群組中的糖與 UTP 生產 UDP-半乳糖之能力；以及

c) 使用屬於大腸桿菌之微生物之培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌之培養液具有從選自 UDP-半乳糖及、 $\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、乳糖、N-乙醯乳糖胺、N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖所組成之群組中之複合糖質前驅體來生產選自乳醯-N-四碳糖、乳醯-N-新四碳糖、球形三碳糖、 $\text{Gal } \alpha 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、N-乙醯乳糖胺及乳糖所組成群組中的複合糖質之能力，

藉此俾使選自該等酵素源、乳清酸、葡萄糖、果糖、半乳糖及甘露糖所組成之群組中的糖，與選自 $\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、乳糖、N-乙醯乳糖胺、N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖所組成之群組中選出之複合糖質前驅體存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積該複合糖質，以自該水性介質中採集複合糖質。

六、申請專利範圍

9. 一種複合糖質之製法，其特徵為：

使用屬於大腸桿菌之微生物之培養液或該培養液之處理物作為酵素源，該大腸桿菌之微生物之培養液具有從 UDP-半乳糖與選自 $\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ 、乳糖、N-乙醯乳糖胺、N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖所組成之群組中的複合糖質前驅體來生產選自乳醯-N-四碳糖、乳醯-N-新四碳糖、球形三碳糖、 $\text{Gal } \alpha 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、N-乙醯乳糖胺及乳糖所組成之群組中的複合糖質之能力，藉此使該酵素源、該複合糖質前驅體及藉申請專利範圍第 2 項之製法得到 UDP-半乳糖存在於水性介質中，並於該水性介質中生成及蓄積該複合糖質，以自該水性介質中採集該複合糖質。

10. 如申請專利範圍第 1 項之製法，其中，培養液之處理物為：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

11. 如申請專利範圍第 2 項之製法，其中，培養液之處理物為：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

12. 如申請專利範圍第 3 項之製法，其中，培養液之處理

六、申請專利範圍

物 為：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

13.如申請專利範圍第4項之製法，其中，培養液之處理物為：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

14.如申請專利範圍第5項之製法，其中，培養液之處理物為：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

15.如申請專利範圍第6項之製法，其中，培養液之處理物為：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

16.如申請專利範圍第7項之製法，其中，培養液之處理

六、申請專利範圍

物 爲：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

17.如申請專利範圍第 8 項之製法，其中，培養液之處理物爲：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

18.如申請專利範圍第 9 項之製法，其中，培養液之處理物爲：

培養液之濃縮物、將培養液經離心所得之培養上清液、該培養上清液之濃縮物、從該培養上清液得到之酵素樣品、將培養液經離心所得之細胞、或該細胞之界面活性劑處理物。

19.如申請專利範圍第 1 項之製法，其中，屬於具有生產 UDP-葡萄糖之能力之大腸桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

20.如申請專利範圍第 2 項之製法，其中，屬於具有生產 UDP-半乳糖之能力之大腸桿菌或產氨棒狀桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

21.如申請專利範圍第 3 項之製法，其中，屬於具有生產

六、申請專利範圍

UDP-N-乙醯葡萄糖胺之能力之大腸桿菌或產氨棒狀桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

22.如申請專利範圍第4項之製法，其中，屬於具有生產UDP-N-乙醯葡萄糖胺之能力之大腸桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

23.如申請專利範圍第5項之製法，其中，屬於具有生產CMP-N-乙醯神經胺酸之能力之大腸桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

24.如申請專利範圍第6項之製法，其中，屬於具有生產GDP-甘露糖之能力之大腸桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

25.如申請專利範圍第7項之製法，其中，屬於具有生產GDP-海藻糖之能力之大腸桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

26.如申請專利範圍第8項之製法，其中，屬於具有生產UDP-半乳糖之能力之大腸桿菌或產氨棒狀桿菌之微生物，係由一個以上的微生物所構成。

27.如申請專利範圍第3項之製法，其中，藉著供應葡萄糖-1,6-二磷酸給屬於磷酸葡萄糖變位酶及磷酸果糖激酶活性強之大腸桿菌之微生物，以增強磷酸葡萄糖胺變位酶之活性。

28.如申請專利範圍第6項之製法，其中，藉著供應葡萄糖-1,6-二磷酸給屬於磷酸葡萄糖變位酶及磷酸果糖激酶活性強之大腸桿菌之微生物，以增強磷酸甘露糖變位酶之

六、申請專利範圍

活性。

29.如申請專利範圍第 7 項之製法，其中，藉著供應葡萄糖-1,6-二磷酸給屬於磷酸葡萄糖變位酶及磷酸果糖激酶活性強之大腸桿菌之微生物，以增強磷酸甘露糖變位酶之活性。

30.如申請專利範圍第 8 項之製法，其中，屬於具有生產 UDP-半乳糖之能力之大腸桿菌或產氨棒狀桿菌的微生物，係由半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶、葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶以及焦磷酸酶中所選出之一個以上酵素活性強之微生物。

31.如申請專利範圍第 8 項之製法，其中，屬於具有從 UDP-半乳糖及複合糖質前驅物質來生產複合糖質之能力之大腸桿菌的微生物，係半乳糖轉移酵素活性強之微生物。

32.如申請專利範圍第 9 項之製法，其中，屬於具有從 UDP-半乳糖及複合糖質前驅物質來生產複合糖質之能力之大腸桿菌的微生物，係半乳糖轉移酵素活性強之微生物。

33.如申請專利範圍第 1 項之製法，其中，葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下簡稱為 galU)及焦磷酸酶(以下簡稱 ppa)中所選出之一個以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有一種以上從編碼 galU 之基因及編碼 ppa 之基因中所選出之基因。

34.如申請專利範圍第 33 項之製法，其中，編碼 galU 之基因及編碼 ppa 之基因為來自大腸桿菌之基因。

六、申請專利範圍

35.如申請專利範圍第2項之製法，其中，半乳糖激酶(以下簡稱 galK)、半乳糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下簡稱 galT)、葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下簡稱為 galU)及焦磷酸酶(以下簡稱 ppa)中所選出之一個以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由DNA片段與載體所組成之重組體DNA之微生物構成，且其中該DNA片段含有一種以上從編碼 galK之基因、編碼 galT之基因、編碼 galU之基因及編碼 ppa之基因中所選出之基因。

36.如申請專利範圍第35項之製法，其中，編碼 galK之基因、編碼 galT之基因、編碼 galU之基因及編碼 ppa之基因為來自大腸桿菌之基因。

37.如申請專利範圍第3項之製法，其中，由葡萄糖激酶(以下簡稱 glk)、磷酸葡萄糖胺變位酶(以下簡稱 glmM)、葡萄糖胺-1-磷酸乙醯轉移酶及N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下兩者合併簡稱 glmU)、焦磷酸酶(以下簡稱 ppa)、磷酸葡萄糖胺變位酶(以下簡稱 pgm)及磷酸果糖激酶(以下簡稱 pfkB)中所選出之一種以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由DNA片段與載體所組成之重組體DNA之微生物構成，且其中該DNA片段含有一種以上從編碼 glk之基因、編碼 glmM之基因、編碼 glmU之基因、編碼 ppa之基因、編碼 pgm之基因及編碼 pfkB之基因中所選出之基因。

38.如申請專利範圍第37項之製法，其中，編碼 glk之基因、編碼 glmM之基因、編碼 glmU之基因、編碼 ppa之

六、申請專利範圍

基因、編碼 *pgm* 之基因及編碼 *pfkB* 之基因為來自大腸桿菌之基因。

39.如申請專利範圍第 4 項之製法，其中，由半乳糖激酶(以下簡稱 *galK*)、N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下簡稱 *glmU*)及焦磷酸酶(以下簡稱 *ppa*)中所選出之一種以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有一種以上從編碼 *galK* 之基因、編碼 *glmU* 之基因及編碼 *ppa* 之基因中所選出之基因。

40.如申請專利範圍第 39 項之製法，其中，編碼 *galK* 之基因、編碼 *glmU* 之基因及編碼 *ppa* 之基因為來自大腸桿菌之基因。

41.如申請專利範圍第 5 項之製法，其中，由 CMP-NeuAc 合成酶(以下簡稱 *neuA*)、NeuAc 醛縮酶(以下簡稱 *nanA*)及 CTP 合成酶(以下簡稱 *pyrG*)中所選出之一種以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有一種以上從編碼 *neuA* 之基因、編碼 *nanA* 之基因及編碼 *pyrG* 之基因中所選出之基因。

42.如申請專利範圍第 41 項之製法，其中，編碼 *neuA* 之基因、編碼 *nanA* 之基因及編碼 *pyrG* 之基因為來自大腸桿菌之基因。

43.如申請專利範圍第 6 項之製法，其中，由磷酸甘露糖變位酶(以下簡稱 *manB*)、甘露糖-1-磷酸鳥苷醯轉移酶(以

六、申請專利範圍

下簡稱 manC)、磷酸葡萄糖變位酶(以下簡稱 pgm)及磷酸果糖激酶(以下簡稱 pfkB)中所選出之一種以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有一種以上從編碼 manB 之基因、編碼 manC 之基因、編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因中所選出之基因。

44.如申請專利範圍第 43 項之製法，其中，編碼 manB 之基因、編碼 manC 之基因、編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因為來自大腸桿菌之基因。

45.如申請專利範圍第 7 項之製法，其中，由磷酸甘露糖變位酶(以下簡稱 manB)、甘露糖-1-磷酸鳥苷醯轉移酶(以下簡稱 manC)、GDP-甘露糖-4,6-脫水酶(以下簡稱 gmd)、GDP-4-酮基-6-脫氧甘露糖表異構酶/還原酶(以下簡稱 wcaG)、磷酸葡萄糖變位酶(以下簡稱 pgm)及磷酸果糖激酶(以下簡稱 pfkB)中所選出之一種以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有一種以上從編碼 manB 之基因、編碼 manC 之基因、編碼 gmd 之基因、編碼 wcaG 之基因、編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因中所選出之基因。

46.如申請專利範圍第 45 項之製法，其中，編碼 manB 之基因、編碼 manC 之基因、編碼 gmd 之基因、編碼 wcaG 之基因、編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因為來自大腸桿菌之基因。

六、申請專利範圍

47.如申請專利範圍第 27 項之製法，其中，屬於磷酸葡萄糖變位酶(以下簡稱 pgm)及磷酸果糖激酶(以下簡稱 pfkB)活性強之大腸桿菌之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有編碼 pgm 之基因或編碼 pfkB 之基因。

48.如申請專利範圍第 47 項之製法，其中，編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因為來自大腸桿菌之基因。

49.如申請專利範圍第 28 項之製法，其中，屬於磷酸葡萄糖變位酶(以下簡稱 pgm)及磷酸果糖激酶(以下簡稱 pfkB)活性強之大腸桿菌之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有編碼 pgm 之基因或編碼 pfkB 之基因。

50.如申請專利範圍第 49 項之製法，其中，編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因為來自大腸桿菌之基因。

51.如申請專利範圍第 29 項之製法，其中，屬於磷酸葡萄糖變位酶(以下簡稱 pgm)及磷酸果糖激酶(以下簡稱 pfkB)活性強之大腸桿菌之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有編碼 pgm 之基因或編碼 pfkB 之基因。

52.如申請專利範圍第 51 項之製法，其中，編碼 pgm 之基因及編碼 pfkB 之基因為來自大腸桿菌之基因。

53.如申請專利範圍第 30 項之製法，其中，由半乳糖激酶(以下簡稱 galK)、半乳糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下簡稱 galT)、葡萄糖-1-磷酸尿苷醯轉移酶(以下簡稱 galU)

表

訂

線

六、申請專利範圍

及焦磷酸酶(以下簡稱 ppa)中所選出之一個以上酵素活性強之微生物，係由一種以上具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物構成，且其中該 DNA 片段含有一種以上從編碼 galK 之基因、編碼 galT 之基因、編碼 galU 之基因及編碼 ppa 之基因中所選出之基因。

54.如申請專利範圍第 53 項之製法，其中，編碼 galK 之基因、編碼 galT 之基因、編碼 galU 之基因及編碼 ppa 之基因為來自大腸桿菌之基因。

55.如申請專利範圍第 31 項之製法，其中，半乳糖轉移酵素活性強之微生物，係為具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物，且其中該 DNA 片段含有半乳糖轉移酵素基因。

56.如申請專利範圍第 55 項之製法，其中，半乳糖轉移酵素基因為來自淋病奈瑟氏菌之基因。

57.如申請專利範圍第 32 項之製法，其中，半乳糖轉移酵素活性強之微生物，係為具有由 DNA 片段與載體所組成之重組體 DNA 之微生物，且其中該 DNA 片段含有半乳糖轉移酵素基因。

58.如申請專利範圍第 57 項之製法，其中，半乳糖轉移酵素基因為來自淋病奈瑟氏菌之基因。