

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3560968号
(P3560968)

(45) 発行日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(24) 登録日 平成16年6月4日(2004.6.4)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 2 3 L 1/05

A 2 3 L 1/04

C 0 8 B 37/00

C 0 8 B 37/00

B

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 19/06

C 1 2 P 19/06

C 1 2 N 15/00

Z N A A

請求項の数 11 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平2-195073	(73) 特許権者	590004567
(22) 出願日	平成2年7月25日(1990.7.25)		ファルマシア・コーポレーション
(65) 公開番号	特開平3-164143		アメリカ合衆国63141ミズーリ州セン
(43) 公開日	平成3年7月16日(1991.7.16)		トルイス、メリビル・センター・ドライブ
審査請求日	平成9年7月24日(1997.7.24)		575
審査番号	不服2000-20405(P2000-20405/J1)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成12年12月25日(2000.12.25)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	384621	(72) 発明者	ダニエル エッチ・ドハーティ
(32) 優先日	平成1年7月25日(1989.7.25)		アメリカ合衆国、コロラド 80303,
(33) 優先権主張国	米国(US)		ボールダー、イサカ ドライブ 719
微生物の受託番号	ATCC 68033	(72) 発明者	ランダル エー・ハスラー
微生物の受託番号	ATCC 68034		アメリカ合衆国、コロラド 80026,
微生物の受託番号	ATCC 68035		ラファイエット、ミロ サークル 102
微生物の受託番号	ATCC 68036		O-ビー
微生物の受託番号	ATCC 68037		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キサンタンガムのアセチル化及びビルビル化の遺伝子調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

約2:2:1のD - グルコース:D - マンノース:D - グルクロン酸比を有する繰り返しペンタマー単位を含み、2つのD - グルコース部分はβ - [1,4]配置で結合し、内部D - マンノース部分はいずれかのグルコース部分にα - [1,3]配置で結合し、D - グルクロン酸部分は前記内部マンノース部分にβ - [1,2]配置で結合し、外部マンノース部分は前記グルクロン酸部分にβ - [1,4]配置で結合しており、前記内部マンノース部分はアセチル化されておらずかつ前記外部マンノース部分の一部はアセチル化されている、多糖ポリマー。

【請求項2】

前記外部マンノース部分の一部がビルビル化されている、請求項1記載の多糖ポリマー。

【請求項3】

前記外部マンノース部分がビルビル化されていない、請求項1記載の多糖ポリマー。

【請求項4】

約2:2:1のD - グルコース:D - マンノース:D - グルクロン酸比を有する繰り返しペンタマー単位を含み、2つのD - グルコース部分はβ - [1,4]配置で結合し、内部D - マンノース部分はいずれかのグルコース部分にα - [1,3]配置で結合し、D - グルクロン酸部分は前記内部マンノース部分にβ - [1,2]配置で結合し、外部マンノース部分は前記グルクロン酸部分にβ - [1,4]配置で結合しており、前記内部マンノース部分はアセチル化されておらずかつ前記外部マンノース部分の一部はアセチル化されている、多糖ポリマー

10

20

一の製造方法であって、

(a) キサンタンガム遺伝子クラスターの機能的遺伝子Fたんぱく質を発現することのできないキサントモナス (*Xanthomonas*) を得ること、

(b) 前記多糖ポリマーを形成するに十分な条件において前記キサントモナスを培養すること、

を含む方法。

【請求項5】

前記外部マンノース部分の一部がピルビル化されている、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記外部マンノース部分がピルビル化されていない、請求項4記載の方法。

10

【請求項7】

前記キサントモナスがキサントモナスカンペストリス (*Xanthomonas campestris*) である、請求項4記載の方法。

【請求項8】

前記キサントモナスがキサントモナスのアセチラーゼI欠損ミュータントである、請求項4記載の方法。

【請求項9】

前記キサントモナスがキサントモナスのアセチラーゼI及びケタラーゼ欠損ミュータントである、請求項4記載の方法。

【請求項10】

20

キサントモナスのアセチラーゼI欠損ミュータントである、請求項1記載の多糖ポリマーの製造可能なミュータントキサントモナス。

【請求項11】

キサントモナスのアセチラーゼI及びケタラーゼ欠損ミュータントである、請求項1記載の多糖ポリマーの製造可能なミュータントキサントモナス。

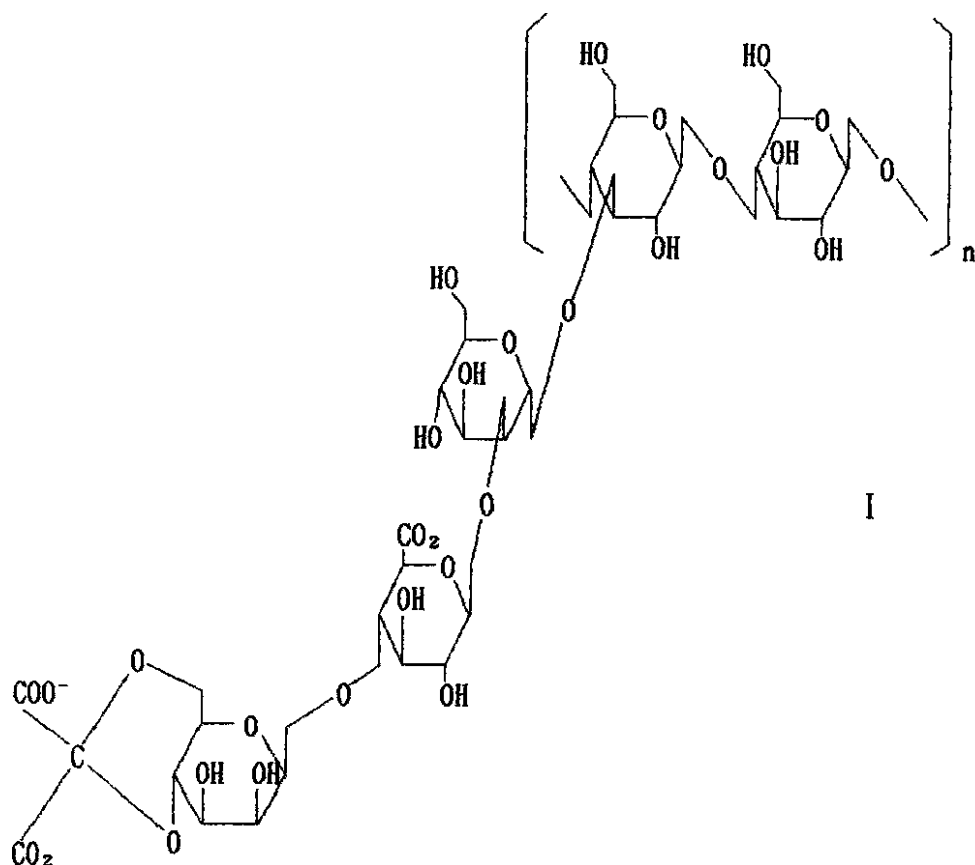
【発明の詳細な説明】

本発明は多糖ポリマーに関する。特に、本発明は、キサンタンガムと構造的に等しく、キサンタン合成経路の成分により形成されるポリマーと規定されるキサンタンベース多糖ポリマーに関し、外部マンノースが特にアセチル化されているがピルビル化されていない、ピルビル化されているがアセチル化されていないよう改良されているか、又は改良され 30

ていないが内部マンノースが独立にアセチル化されているかもしくは改良されていないキサンタンベースポリマーを含む。
キサンタンガムはキサントモナス (*Xanthomonas*) 属の細菌、特に*X.カンペストリス* (*X.campestris*) 種の微生物により製造される。キサンタンガムは、その特有の物理特性、すなわち高比粘度及び疑凝塑性のため広く用いられている製品である。それは通常増粘剤として食品に並びに流動性調節及び特性改良剤として二次もしくは三次油回収に、さらに石油掘削液に用いられる。

化学的に、キサンタンガムはアニオンヘテロ多糖である。ポリマーの繰返し単位は5個の糖部分、特に2個のグルコース、1個のグルクロン酸及び2個のマンノース部分からなる五量体である。これらの糖残基はグルコース部分がポリマー鎖の主鎖を形成し、マンノース-グルクロン酸-マンノース残基の側鎖がグルコース部分より交互に伸びているよう配列される。通常、この基本構造は、例えばJanson, P.E., Kenne, L., 及びLindberg, B.らのCarbohydrate Research, 45:275~282 (1975) 並びにMelton, L.D., Minot, L., Rees, D.A., 及びSanderson, G.R.らのCarbohydrate Research, 46:245~257 (1976) に記載されているようにアセチル化及びピルビル化される。アセチル化及びピルビル化の程度は様々であることが公知である。キサンタンガムの構造を下式Iに示す。

40



自然発生キサントガムの広範な有効性にもかかわらず、その物理特性が制限される状況がある。特に、二次もしくは三次油回収において、油溜中の温度及び溜中の塩濃度がキサント溶液の最適より高い場合一般的ではない。この状況が生じた場合、キサントは沈殿し、凝集し及び/又はその粘度を失う。従って、油回収の間遭遇する種々の条件、例えば高温及び高塩濃度においてうまく作用する新規増粘物質が望ましい。

本発明は、自然発生キサントガムとくらべ改良された特性を有するキサントベース多糖ポリマー族を開示する。キサントガムの改良はすでに記載された。例えば、Bradshawらは(Carbohydrate Polymers, 3:23~38 (1983))、脱アセチル化又は脱ピルビル化した化学的に改良したキサントガムの製造方法を記載している。Xanthomonas campestrisにより製造されたキサントガムを化学的に脱アセチル化する方法も米国特許第3,000,790号及び3,054,689号に記載されている。現在まで、この脱アセチル化法に用いられている主な方法はアセチル化されたキサントガムからのアセテート部分の化学的除去であった。キサントガムの化学的脱アセチル化法により多くの望ましくない副作用がおこり、グリコシド主鎖の加水分解をおこし、分子の配座に不可逆的变化をおこし、分子量を低下させる。

キサントガムは、Holzwarth及びOgletreeらのCarbo. Res., 76:277~280 (1979)に記載のようにして化学的に脱ピルビル化される。この化学的脱ピルビル化法もキサントポリマーユニットを変え及び/又はグリコシド主鎖を加水分解する。X. campestrisの株は米国特許第4,296,203号に記載されており、非ピルビル化キサントガムを製造するが、この非ピルビル化ガムは化学的手段を用いて完全にアセチル化又は脱アセチル化された。

本発明の目的は、内部マンノースがアセチル化されているかもしくは未改良であり、一方外部マンノースがアセチル化もしくはピルビル化されているか又は未改良である多糖キサントポリマーの族を提供することである。

また、この生成物を試験管内で得る方法及び生体内で多糖ポリマーの族を形成する能力を有する微生物を与えることも本発明の目的である。本発明の他の目的は、種々の多糖ポリマーを形成する能力を有する微生物を好気性発酵することによる多糖類の製造方法を提供することである。

本発明の他の目的及び利点を以下の記載に一部示し、一部はその記載より明らかであろう

。

この目的を達成するため及び本発明により、約2:2:1の比のD - グルコース:D - マンノース:D - グルクロン酸を有する多糖ポリマーを含む組成物が提供され、ここでD - グルコース部分はベーター〔1,4〕形状で結合し、内部D - マンノース部分は通常交互のグルコース部分にアルファ〔1,3〕形状で結合し、D - グルクロネート部分は内部マンノース部分にベーター〔1,2〕形状で結合し、外部マンノース部分はベーター〔1,4〕形状でD - グルクロネート部分に結合している。

本発明の目的を達成するため、内部マンノース部分が6 - 0位でアセチル化されているキサンタンガムを含む組成物が提供される。他の構造は内部及び外部マンノース部分の両方がアセチル化されている。他の構造は、外部マンノース部分の一部が4 - 6 - 位において10
ピルビル化され、一部がアセチル化されている。他の構造は外部マンノース部分が4 - 6位でピルビル化され、内部マンノース部分が6 - 0位でアセチル化されている。2つの追加構造が提供され、1つは4 - 6位でピルビル化された外部マンノース部分を有し、他はアセチル化された外部マンノース部分を有する。

また、本発明は上記多糖ポリマーの製造方法でもある。本発明の多糖ポリマーは、多糖を製造する微生物の生合成経路の遺伝子操作により製造される。特に、キサンタンガムを製造するための微生物経路は他のポリマー単位を製造するための生体内又は試験管内システムを作るため操作される。従って、システムは、特に異なる程度までアセチル化もしくはピルビル化された多糖を作り出すため突然変異したアセチラーゼI、アセチラーゼII及び10
ケターゼ遺伝子の使用により形成される。

以下の実施例と共に本発明の好ましい実施態様を参考にし、本発明の原理を説明する。

本発明の多糖ポリマーは上記に詳細に記載されている。この多糖ポリマーは無細胞酵素系で試験管内で製造され又は適当な突然変異株の細胞を培養することにより生体内で製造される。多糖ポリマーを製造する他の方法も以下に記載する。

試験管内多糖合成

非変異キサンタンガムを製造するための無細胞系の使用に関する基本的方法は、Ielpi, L., Couso, R.O., 及び Dankert, M.A. らのFEBS Letters 130:253~256 (1981)に記載されている。本発明の変異多糖を製造するため、この方法の改良法を用いてよいことがわかった。この新規改良法に対し、好適な緩衝剤、好ましくはEDTAの存在下遺伝子Xanthomonas、好ましくはXanthomonas campestrisの微生物の細胞を溶解させ、その後外因性付加構造を作10
製できる適当な生合成酵素を得ることにより試験管内無細胞系が形成される。Vanderslic eらの米国特許第4,717,449号に記載されているこの試験管内システムの一般的方法は特に本発明に組み込まれる。他の溶解方法も用いてよく、音波処理、フレンチ圧力セル、界面活性剤処理、酵素処理及びこれらの組み合わせを含む。

通常、本発明の変異多糖を製造するため、所望の多糖を構成するに必要な酵素を有する微生物の溶解産物が適当な基質とインキュベートされ、この基質は所望のガムにより異なり、UDP - グルコース、GDP - マンノース、UDP - グルクロン酸、アセチル - CoA及びホスホエノールピルビン酸を含む。基質の選択は所望の多糖により異なる。例えば、非アセチル化多糖は基質としてアセチル - CoAを除去することにより得られる。内在基質を除去するた10
めの細胞溶解産物の化学的及び/又は酵素処理は当業者に明らかであろう。

さらに、無細胞系は、キサンタン生合成経路の酵素を1種以上欠く突然変異生物体より形成される。そのような突然変異由来細胞溶解産物は、その変異のみのため又は基質と組み合わせた変異のため上記変異ガムを形成する。

一実施態様において、生合成プロセスはポリマー単位への放射ラベルした物質の導入により監視される。当業者に公知である生合成中間体を同定するため他の方法を用いてよい。特に、オリゴ糖中間体を分離及び同定するためクロマトグラフ法が開発された。これは薄層クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーを含む。

キサンタンの無細胞生合成は、特定のヌクレオチド3種すべての添加により異なる時間依存性逐次プロセスであることがわかった。ラベルした物質の非特異的導入のバックグラウンドは最小であり、ガム画分でのキサンタン特異的ポリマーの検出を妨害しない。10

多糖生合成経路の多くには脂質キャリアー、特にイソプレノイドピロホスフェートの発生が示された。さらに、キサンタン生合成におけるピロホスホリルに結合した脂質キャリアーの発生が示された。従って、キサンタン生合成中間体はこれらのキャリアー脂質により有機可溶性画分中に回収可能であることがわかった。回収されたオリゴ糖はその後穏やかな酸加水分解、例えばpH2、90 で20分間によりキャリアー脂質を除去され、分析用にアルカリホスファターゼにより脱リン酸化される。

中間体生成物を回収するためこの方法を用いることにより、試験管内条件において、*X. campestris*突然変異体のある溶解産物が非変異ガム合成に必要な基質すべての存在下でさえ非アセチル化又は非ピルビル化キサンタンガムを形成することがわかった。この方法は他の多糖を形成する細胞溶解産物を同定することができる。

10

生体内多糖合成

上記多糖の無細胞合成法の開発は、種々の*Xanthomonas campestris*細胞がアセチル化もしくはピルビル化された、又は非改良のマンノース残基を有するキサンタンベースポリマーの合成に必要な酵素をすべて有していることを示した。

さらに、非アセチル化キサンタンガムを合成するすべての細胞は、キサンタンガム合成の間内部又は外部マンノースのいずれかのアセチル化を止める手段が必要である。さらに、非アセチル化、非ピルビル化キサンタンガムを合成するすべての細胞は、アセチル化及びピルビル化工程の両方においてキサンタンガム合成を止める手段が必要である。本発明の一実施態様において、この種々の反応に应答する遺伝子のあるものを変えるため突然変異誘発が用いられる。

20

限定するものではないが、Tn10, TnK12 (Tn10 del 16 de 17KanR)、及びTn903を含むトランスポゾンが*Xanthomonas campestris*を突然変異させるため用いてよい。このトランスポゾンは、一実施態様において、テトラサイクリン又はカナマイシンに対する耐性を与える。トランスポゾンは遺伝子に入る能力を有し、コード配列を中断することにより突然変異をおこす。トランスポゾンは、いわゆる自殺ベクター、例えばpRK2013を含む種々のベクター上で*Xanthomonas campestris*に導入される。Ditta, G., Corbin, D. 及び Helinski, D. R. らのProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:7347 ~ 7351 (1980) に記載されているように、ベクターpRK2013はそれ自身を非腸内細菌、例えば*Xanthomonas campestris*に移す能力を有するが、その宿主内で複製できない。従って、自殺ベクターが*Xanthomonas campestris*細胞の集団に導入され、この集団がその後テトラサイクリンもしくはカナマイシンの攻撃をうけた場合、生存している各々はトランスポゾンの1つが*Xanthomonas campestris*のゲノムに入ったものである。そのような攻撃の生存者をキサンタンガム製造能を失ったものについてスクリーンする。そのような突然変異体は糸状菌タイプ*Xanthomonas campestris*よりムコイドが少ないと考えられる。

30

本発明の他の実施態様において、それが製造するガムをアセチル化及び/又はピルビル化しない突然変異体を発生するため他の突然変異誘発を用いてよい。そのような方法は当業者に明らかであり、限定するものではないが、輻射、組換えDNA法(特に、Capageらの米国特許出願番号第333,868号、「Recombinant - DNA Mediated Production of Xanthan Gum」、1989年4月3日出願、及び下記例1)及び化学突然変異誘発物質処理を含む。そのような突然変異誘発法の例はMiller, J.H.のExperiments in Molecular Genetics (1972); Davis, R.W., Bostein, D. 及び Roth, J.R. らのAdvanced Bacterial Genetics (1980); 及び Maniatis, T., Fritsch, E.F. 及び Sambrook, J. らのMolecular Cloning (1982) に記載された。この他に、適当な突然変異体は所望の多糖、例えばアセチル化されているがピルビル化されていない、ピルビル化されているがアセチル化されていない、ピルビル化及びアセチル化されている、又は内部マンノースはアセチル化されているかもしくは未改良であるが未改良である外部マンノースを有するキサンタンガムの存在に対し各突然変異体の培養プロセスをアッセイすることにより検出される。従って、突然変異体はキサンタンガム経路の種々の位置でブロックされることがわかった。内部マンノースでアセチル化され及び外部マンノースでアセチル化された(X1397)、内部マンノースでアセチル化され及び外部マンノースでピルビル化された(X1398)、内部マンノースでアセチル化され及び外部マンノ

40

50

ースで未改良の(X1399)、内部マンノースで未改良であり及び外部マンノース成分の一部がビルビル化されさらに一部がアセチル化されている(X1400)、内部マンノースで未改良であり及び外部マンノースでアセチル化されている(X1401)、内部マンノースで未改良であり及び外部マンノースでビルビル化されている(X1402)、並びに内部マンノースで未改良であり及び外部マンノースで未改良である(X1403)キサントガムを製造する *Xanthomonas campestris* の突然変異体はそれぞれNo.68033,68034,68035,68036,68037,68038及び68039としてアメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection),Rockville,Marylandに寄託されている。

同じ生成物を得るためアセチラーゼI、アセチラーゼII及びケタラーゼの酵素阻害剤を用いることは、本発明の範囲内ではない。この多糖族を製造する他の方法、例えば天然キサントガムの酵素及び化学分解も考えられている。

10

突然変異体は、野生タイプ *Xanthomonas campestris* の増殖について当該分野において公知の条件で増殖する。例えば、好適な同化性炭素源、例えばグルコース、スクロース、マルトース、スターチ、複炭水化物、例えば糖蜜又はコーンシロップ、種々の有機酸等上で増殖する。炭素源の混合物も用いてよい。供給される炭素源の濃度は10~60g/lである。通常約0.1~10.0g/lの有機もしくは無機窒素の同化性源並びにミネラルも増殖に必要であり、その選択は当業者において容易である。好適な窒素源の例は、アンモニア塩、硝酸塩、尿素、イースト抽出物、ペプトン、もしくは他の加水分解した蛋白様物質又はこれらの混合物である。好適なミネラルの例は、燐、硫黄、カリウム、ナトリウム、鉄、マグネシウムを含み、これらしばしばキレート化剤、例えばEDTAもしくはクエン酸と共に加えられる。

20

Xanthomonas campestris の増殖に最適の温度は18~35℃、好ましくは約27℃~30℃である。

Xanthomonas campestris 細胞は、適切なレベルの溶解した酸素、例えば飽和の約10%以上を保つよう空気もしくは酸素を供給することにより好氣的に増殖される。好ましくは、このレベルは約20%以上に保たれる。pHはしばしば約6.0~8.0、好ましくは約6.5~7.5に保たれる。

本発明の多糖は、好適な方法により発酵ブロスより回収される。イソプロパノール、エタノール、又は他の好適なアルコールによる沈殿により本発明の多糖が容易に得られる。通常、アルコールは、好ましくは塩化カリウム、塩化ナトリウム又は他の塩の存在下約50~75%(体積基準)の濃度に加えられる。この他に、ポリマーは超遠心によりブロスから回収される。

30

強化油回収に用いるための流動性調節溶液も種々の多糖ポリマーより製造される。約50~約3000ppmの濃度の多糖ポリマーの溶液がそのような流動性調節溶液に相当である。油回収をさらに高めるためこれらの溶液と共に他の公知の添加剤も用いてよい。そのような添加剤は、例えば、界面活性剤、アルカリ剤、又は金属もしくは有機架橋剤を含む。

キサントガム様の多糖ポリマーは、食品、化粧品、医薬配合物、糊、掘削液、印刷インク、等の増粘剤として及びゲル化剤として用いてよい。さらに、パイプ内の液体流の摩擦を低下させるために用いてもよい。

実施例

40

以下の例は、本発明の好ましい実施態様を説明する。

例 1

この例は、キサントガムのアセチル化を触媒する酵素をコード化する2種の *X.campestris* の存在を示す。

Capageらの米国特許出願第333,868号は、キサントガム生合成に必要な遺伝子クラスターを含む *X.campestris* DNAの16kbセグメントのヌクレオチド配列を記載している。突然変異はDNA配列により確認された各遺伝子の不活性化により同定された。この突然変異を担持する突然変異体株の遺伝表現型が決定された。トランスポゾン挿入により生じた遺伝子下での突然変異(第1a図参照)は、検出可能なアセテートを含まないキサントガムを形成した。遺伝子Gの挿入変異はキサントガム生合成に全く欠陥を形成しなかった。遺伝

50

子G欠損した突然変異体は高レベルのキサンタンガムを形成し、このガムはほぼ通常のモル比でキサンタンの通常の成分をすべて含んでいた。この最初の結果を基準として、遺伝子Gがキサンタンの内部マンノースの公知のアセチル化を触媒すると結論付けられたが、一方遺伝子G蛋白質の活性は未知のままである。

しかし、遺伝子F及びG (gpF及びgpG) の生成物のアミノ酸配列を予想するためDNA配列を用いる場合、この蛋白質が互いに広範な相同を有することがわかった。この発見はgpF及びgpGの機能が同じであることを示した。遺伝子Gを欠損した突然変異体の遺伝表現型はその後再調査され、この突然変異体により形成されたキサンタンの組成物は正確に定量された。このデータは野生タイプ*X.campestris*と比較してG⁻突然変異体により形成されたガムのアセテート含量がわずかに(5%~10%)であるが十分低下したことを示した。従って、キサンタンのアセチル化にgpGがどんな役割を果たすか調べるため他の実験を行った。

10

gpGが通常キサンタンガムのアセチル化の10%に関与するという仮説は、表面上は遺伝子Fのトランスポゾン挿入変異がアセチル化を排除する結果と矛盾する。明らかに、この突然変異体ガムは10%の通常のアセテート含量を保たなかった。しかし、遺伝子Fへの挿入によりいわゆる「極性」効果の結果として遺伝子Gの発現を低下させる又は排除することが可能であった。Tn10の挿入は通常、Kleckner, N.らのJ.Mol.Biol., 97:561~575 (1975) に報告されているように、挿入より、転写によって遺伝子の発現を低下させる。さらに、Oppenheim, D.S.及びYanofsky, C.のGenet. 95:785~795 (1980) に報告されているように、挿入変異を含む遺伝子に下流遺伝子が「翻訳結合」した場合、この低下は全く厳しい。翻訳結合は1つの遺伝子の翻訳停止シグナルが隣接する下流遺伝子の翻訳開始シグナルと重なっている現象である。そのような結合がおこるケースにおいて、下流遺伝子の翻訳の開始は結合部におこる上流遺伝子の翻訳の停止に依存している。従って、結合した遺伝子の上流での挿入は、この挿入が上流遺伝子の翻訳を早期に停止させ及びフレームシフトをおこすため下流遺伝子の発現を劇的に低下させ、又は排除する。

20

ガム遺伝子クラスターのDNA配列は、遺伝子Fの翻訳停止が遺伝子Gの翻訳開始と重なっていない、すなわちこの2つが「結合」していることを明らかにした(第1b図参照)。さらに、遺伝子Gに対する翻訳開始シグナルの配列はそれほど強くなく、これは翻訳結合が遺伝子Gの発現に十分な役割を果たすことを示唆している。この仮説をテストするため、遺伝子Fのコード化配列内で欠失変異を行った(第2図参照)。この欠失は遺伝子F内のC1a Iサイトの間の660ベースペアーを除去した。この欠失したDNAは遺伝子Fのコード化配列内に存在し、他のDNAは挿入されない。従って、この欠失は遺伝子の大部分(約60%)を除去するが、除去されるベースペアーの多くが3で均等に割ることができるので読取りフレームを変えない。この欠失変異により形成された変異gpF (gpFdel) は合計364個のアミノ酸から220個を失うが、遺伝子Fの翻訳開始及び遺伝子F翻訳停止は未変化のままである。gpFのアミノ酸残基の2/3の除去はすべての蛋白質活性を除去すると考えられる。従って、この突然変異体からの残留アセチラーゼ活性はすべてgpGの活性に起因するであろう。

30

このC1a I欠失変異は、プラスミドのベクター部位内に位置し、WayらのGene, 32:369~379 (1984) に記載されたトランスポゾンTn10 del 16 del 17の挿入及び他の野生タイプ遺伝子クラスターを有するプラスミドpRK290 - H336.13上で行なわれる(第3a図)。この欠失したプラスミド(p13delC1aと呼ぶ)は遺伝子Bを失った*X.campestris* Gum⁻欠失株X1231に転化され、得られる株X1231 (p13delC1a) により形成される多糖を分析した。このガムは低い十分な量のアセテートを含み、野生タイプキサンタンにみられる量の約10~15%であった。この結果はgpF及びgpGの両方がアセチラーゼであり、キサンタンのアセチル化体がgpGによりアセチル化されたキサンタンアセチル化の成分を少量含むgpFにより触媒されることを示した。しかし、gpGの活性からではなくgpFdelの残留活性より得られる変異体X1231 (p13delC1a) にみられるアセチル化は低レベルのままである。これを説明するため、プラスミドpRK290 - H336の重複変異誘導体を構成した。第3b図に示すように、この重複変異体は遺伝子G内で遺伝子F C1a I欠失変異及び挿入変異(KBml)を組み合せた。こ

40

50

の重複変異プラスミドpH336KBmIdeIClaを株X1231に転移し、形成された多糖を分析した。X1231 (p13deICla) により形成されるガムに見られる低レベルアセチル化がgpGの活性より得られる場合、重複変異体X1231 (pH336KBmIdeICla) は遺伝子G内の挿入変異によりgpG活性を排除すべきであり、アセチル化が見られない。しかし、X1231 (p13deICla) 中のアセチル化活性源が変異体gpFdelである場合、遺伝子G挿入はアセチル化に影響を与えず、X1231 (p13deICla) にみられる同じ10%レベルは重複変異株により形成されるガム中にみられるべきである。株X1231 (pH336KBmIdeICla) により形成される多糖はアセテートを含まないことがわかった。このことは、gpGがキサントンのアセチル化を触媒せず、野生タイプ株において、gpGが総アセチル化の約10%に関与することが証明された。

例 2

この例は、gpG (しかしgpFでない) によるアセチル化に対する標的残基がキサントン繰返し単位の外部マンノースであり、外部マンノースのピルビル化をブロックした際にこのアセチル化が高められることを示す。

キサントン生成遺伝子クラスターの遺伝子Lの突然変異 (第1a図) は外部マンノースのピルビル化を触媒するカタラーゼ酵素を不活性化するため前記に示された。gpL活性を欠く突然変異体はピルベートを欠くキサントンガムを形成する。しかし、そのような突然変異体の初期の研究は、この非ピルビル化ポリマーがアセテートを高レベル、通常0.8アセテート/マンノース含むことを明らかにした。従って、外部マンノースはピルビル化が遺伝学的にブロックされた場合に効果的にアセチル化され、他の研究はこのアセチル化がgpFではなくgpGにより触媒されることを示した。

2つのアセチラーゼ遺伝子とケタラーゼ遺伝子との及び互いの相互作用を調べるため、遺伝子F (アセチラーゼI)、遺伝子G (アセチラーゼII)、及び遺伝子L (ケタラーゼ) における突然変異のすべての組み合わせを含む8種の突然変異体株を構成した。ガム遺伝子クラスターを含むプラスミドpRK290-H336において突然変異の種々の組み合わせを構成した。

この構成に用いられる遺伝子F変異は、この遺伝子内でのフレーム内欠失である。上記のように、この欠失は遺伝子F内のCla Iサイトの間の660ベースペアーを除去する。欠失されたDNAは遺伝子Fのコード化配列内に存在し、他のDNAは挿入されない。従って、この欠失は遺伝子の多く (約66%) を除去するが、欠失されたベースペアーの多くが3で均等に割ることができるので読み取りフレームを変えない。この欠失変異により形成された変異体gpF (gpFdel) は合計364個のアミノ酸より220個を失うが、Fの翻訳開始及びGの開始に結合したその翻訳停止は未変化のままである。gpFのアミノ酸残基の2/3の除去は上記gpF活性の除去に示されている。

この突然変異体に用いられる遺伝子G変異は遺伝子Gのコード化配列を中断するBamH Iサイトでの遺伝子G内の挿入 (KBmI) である。挿入されたDNAはVieira, J. 及びMessing, J. らのGene, 19:259~268 (1982) に記載されているように、プラスミドpUC4-Kの1.3kb Kan^r DNAセグメントを含む制限フラグメントであり、これはトランスポゾンTn903のカナマイシン耐性遺伝子由来である。

用いた遺伝子L変異は2つのタイプである。1つは遺伝子Lのコード化部位でのトランスポゾンTnK12の挿入である。第2のタイプは、カナマイシン及びストレプトマイシンに対し遺伝子コード化耐性を有するTnK12の3kb Hind IIIの欠失によるこの挿入より得られる。このTnK12欠失変異において、TnK12 DNAの1kbの挿入は遺伝子Lコード化配列内に残っており、これは遺伝子L生成物を挿入不活性化する。

試験管内組換えDNA法を用いてプラスミドpRK290-H336上でこの突然変異の種々の組み合わせを行った。得た8種の変異プラスミドを、染色体からガム遺伝子クラスター全体を除去する欠失変異を含むX.campestris株X1231へE.Coliより移した。8種の得られた株X1396~X1403 (表1) をポリマー製造について分析した。

表 1

株	遺伝表現型		
	アセチラーゼ I	アセチラーゼ II	ケタラーゼ
X1396 ^a	+	+	+
X1397	+	+	— ^b
X1398	+	— ^c	+
X1399	+	— ^c	— ^d
X1400	— ^e	+	+
X1401	— ^e	+	— ^b
X1402	— ^e	— ^c	+
X1403	— ^e	— ^c	— ^d

^a 野生タイプ、プラスミドのpRK290部内にTnK12
挿入を有する

^b TnK12 挿入変異

^c Kan^r フラグメント挿入変異

^d TnK12 欠失誘導体挿入変異

^e フレーム内、非極性欠失変異

株はすべて300mlのじゃま板付振盪フラスコ内で

3.2 g / ℓ N - Z - アミン A S

1.7 g / ℓ MgSO₄ · 7 H₂O

0.7 g / ℓ KH₂PO₄

40 g / ℓ グルコース

19.5 g / ℓ (2 - (N - モルホリノ) エタン

スルホン酸)

5 ~ 10 mg / ℓ カナマイシン

1 mg / ℓ テトラサイクリン

を含む、pH7.0の50ml FXC - RAH - 1 培地で培養した。温度は30 に保った。約60時間のインキュベーション後、培養ブロスに2 ~ 4 体積の蒸留水で希釈し、10 における14,000 ~ 18,000gでの30分の遠心により細胞を除去した。2 ~ 3 体積の2 - プロパノールの添加により懸濁液よりガムを沈殿させ、前記条件を用いる遠心により集めた。この沈殿を100 ~ 300mlの20mM NaOH内に再び水和させ、沈殿を繰り返した。最後にガムを100mlの蒸留水に再び水和した。各サンプルをその後12,000 ~ 14,000カットオフセルコースチューブ内で4 lの蒸留水に対し、毎日水を換え4日間透析した。

各精製したガムの三組のサンプルを真空乾燥により3～4倍に濃縮し、120℃で2.5時間2Mトリフルオロ酢酸中で加水分解した。1.2M Na₂CO₃で中和後、この加水分解物を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析用に0.45minフィルターを通し濾過した。

分析は、Aminex HPX-87イオン交換カラム（300×7.8mm）を取り付けたベックマンHPLCを用いて行った。214nmでの紫外吸収により有機酸が検出された。中性糖を検出するため屈折率を用いた。移動相として0.01N H₂SO₄を用い45℃で0.6ml/分の流速でカラムを行った。

各加水分解物中の成分のモル比は、各糖及び有機酸に対するピークに基づく検量曲線を用いて計算した。

マンノースに対するアセテート及びピルベートのモル比を表2に示す。

表 2

マンノースに対するアセテート及びピルベートのモル比

株	アセチラーゼⅠ	アセチラーゼⅡ	ケタラーゼ	アセテート／マンノース	ピルベート／マンノース
X1396	+	+	+	0.66	0.43
X1397	+	+	—	1.01	0.00
X1398	+	—	+	0.63	0.36
X1399	+	—	—	0.51	0.00
X1400	—	+	+	0.10	0.39
X1401	—	+	—	0.47	0.00
X1402	—	—	+	0.00	0.37
X1403	—	—	—	0.00	0.00

表2に示したデータについて以下の観察を行なう。

1. 遺伝子F内の660bp欠失は遺伝子F蛋白質（アセチラーゼⅠ）を不活性化した。X1402対X1398参照。

2. 遺伝子G蛋白質（アセチラーゼⅡ）はキサントンをアセチル化し、カタラーゼが活性である場合野生タイプとくらべ低レベルである。例4に記載のX1400対X1396参照。

3. ケタラーゼが不活性化された場合、アセチラーゼⅡによるアセチル化は劇的に増す（X1400対X1401）

4. アセチラーゼⅠによるアセチル化の程度はケタラーゼの不活性化に対応して増加しない。例4のX1398対X1399参照。

5. ピルビル化はアセチル化の程度にかかわらずそれほど変わらない。例4のX1396, X1398, X1400、及びX1402参照。

このデータは、遺伝子G蛋白質（アセチラーゼⅡ）がキサントンの外部マンノースのアセチル化を触媒することを示している。これはケタラーゼが活性である場合限られた程度におこるがケタラーゼ変異体では劇的に増すと考えられる。このデータは、ピルビル化がアセチル化をブロックするが、アセチル化のレベルにかかわらずピルビル化が変化しないので逆は真でないことを示している。遺伝子F蛋白質（アセチラーゼⅠ）は内部マンノースのみのアセチル化を触媒し、米国特許第4,713,449号及び米国出願番号第844,335号のキサントンのポリトリマー及びトリテトラマー変異体に対するデータは、ケタラーゼが外部マンノースのみのピルビル化を触媒することを示している。

例 3

この例は、gpG (アセチラーゼII) がキサンタン繰り返し単位の内部マンノースのアセチル化を触媒しないことを示す。

ガム遺伝子クラスターの遺伝子IはトランスフェラーゼVをコード化し(第1図)、酵素はキサンタン生成においてマンノースを脂質結合した四糖中間体に加える。このシステムは米国特許第4,713,449号に記載されている。遺伝子Iを不活性化する変異は脂質結合した四糖を合成する。この四糖繰り返し単位は重合されポリテトラマーガムを与え、これはその通常の結合に内部マンノースを含むがキサンタンガムに通常みられる外部マンノースを欠いている(第4図)。遺伝子I内に挿入変異を及び遺伝子F内にCla I欠失変異を含む重複変異体プラスミド、pKBm2delIClaを構成した(第5図参照)。この重複変異体プラスミドpKBm2delIClaをその染色体中にガム遺伝子B及びCのみを含む*X.campestris*欠失株X1106に変えた。pRK290-HA3より得られる変異体プラスミドはBもしくはCを有しないが、残りのガム遺伝子、D~Mをすべて含むので遺伝子B及びCは染色体より提供される。得られる株、X1106(pKBm2delICla)又はX1419をポリマー組成について2回分析した。両方の分析ともポリマー中のアセテートを検出できなかった。この結果は、アセチラーゼIIがポリテトラマーの内部マンノースをアセチル化できないことを示している。この変異体株において、遺伝子Gが変異されておらず、遺伝子F変異が遺伝子Gの発現に影響を与えないと示された非極性Cla I欠失であるのでアセチラーゼIIは活性である。

例 4

この例は、キサンタンガムの五糖繰り返し単位のアセチル化及びピルビル化の遺伝子調節により形成される多糖族を含む繰り返し単位を説明する。この繰り返し単位の構造を第6図に示す。

(a) 野生タイプ(X1396); アセチラーゼI⁻、アセチラーゼII⁺、ケタラーゼ⁺

通常のキサンタンを内部マンノース残基において広くアセチル化し、外部マンノース残基においてピルビル化する。一般的な考えに反し、通常のキサンタンの十分な割合(10~20%)の外部マンノース残基がアセチル化される。従って、通常のキサンタン繰り返し単位は外部マンノースの改良に関し外生である。

(b) L⁻(X1397); アセチラーゼI⁺、アセチラーゼII⁺、ケタラーゼ⁻

このポリマーはピルベートを含まず、結果として外部マンノース残基においてかなりアセチル化されている。内部マンノース残基は野生タイプと同様かなりアセチル化されている。

(c) G⁻(X1398); アセチラーゼI⁺、アセチラーゼII⁻、ケタラーゼ⁺

このポリマーは野生タイプと同様内部マンノースにおいてかなりアセチル化されており、外部マンノースは野生タイプと同様ピルビル化されている。しかし、外部マンノースはアセチル化されていない。

(d) G⁻, L⁻(X1399); アセチラーゼI⁺、アセチラーゼII⁻、ケタラーゼ⁻

このポリマーは内部マンノースの高レベル野生タイプアセチル化を有するが、外部マンノースは未改良である。

(e) F⁻(X1400); アセチラーゼI⁻、アセチラーゼII⁺、ケタラーゼ⁺

このポリマーは内部マンノースは未改良であるが、外部マンノースは野生タイプと同様に改良されている。すなわち、外部マンノースはピルビル化されているが、外部マンノース残基の多くは十分アセチル化されている。

(f) F⁻, L⁻(X1401); アセチラーゼI⁻、アセチラーゼII⁺、ケタラーゼ⁻

このポリマーは未改良内部マンノースを含む。外部マンノースはピルビル化されていないが、かなりアセチル化されている。

(g) F⁻, G⁻(X1402); アセチラーゼI⁻、アセチラーゼII⁻、ケタラーゼ⁺

このポリマーは内部又は外部マンノース残基のいずれにおいてもアセチル化されていない。外部マンノースのピルビル化は通常野生タイプと同様におこる。

(h) F⁻, G⁻, L⁻(X1403); アセチラーゼI⁻、アセチラーゼII⁻、ケタラーゼ⁻

このポリマーはアセテート又はピルベートを含まない。内部又は外部マンノース残基のいずれも改良されていない。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

第1a図は、キサントンの生合成に必要な12個の遺伝子のクラスターを含む*X.campestris*の染色体の16kb部位のBamH I制限マップを示し、及びBamH I制限マップに対するこの12個の遺伝子の適当な位置を示す図である。

第1b図は遺伝子F及びG内の制限サイト、並びに遺伝子F及びGの接点におけるDNA配列を示す図である。

第2図は、ガム遺伝子クラスターの遺伝子F内の欠失変異 (delCln) の構成を示す図である。

第3a図はプラスミドpRK290 - H336由来のプラスミドp13delClnの構造を示す図である。

第3b図はプラスミドpH336KBm1delClnの構造を示す図である。

10

第4図は、キサントンガムのポリテトラマー変異体の繰り返し単位の化学構造を示す図である。

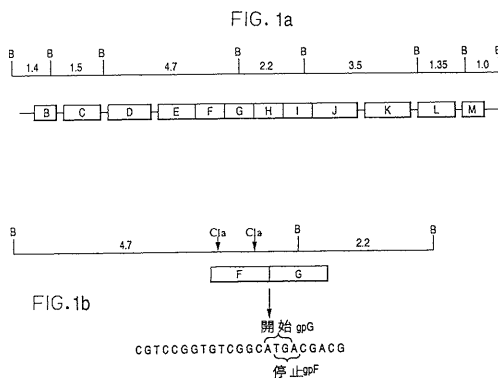
第5a図は、pRK290 - HA3由来のプラスミドpHA3KBm2delClnの構造を示す図である。

第5b図は*X.campestris*株X1106に存在する染色体欠失変異の程度を示す図である。

第6図は、野生タイプ*X.campestris*並びに遺伝子F、G、もしくはLの変異欠失及びこれらすべての可能な組み合わせにより形成された多糖の繰り返し単位の構造を示す図である。

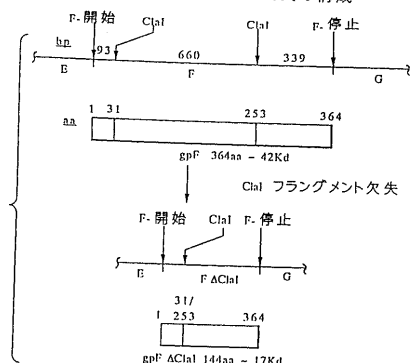
【図1】

ガム遺伝子クラスターの制限及び遺伝子マップ



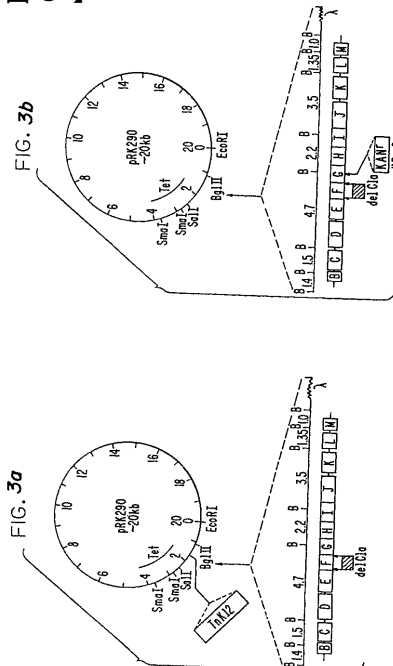
【図2】

遺伝子下内の欠失変異の構成

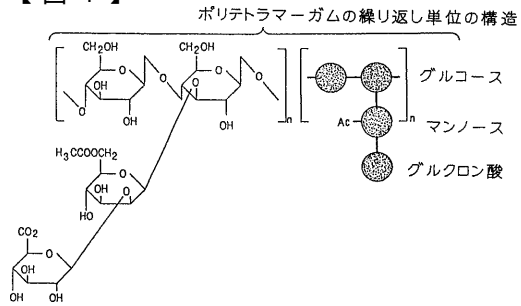


【図3】

変異プラスミドの構造

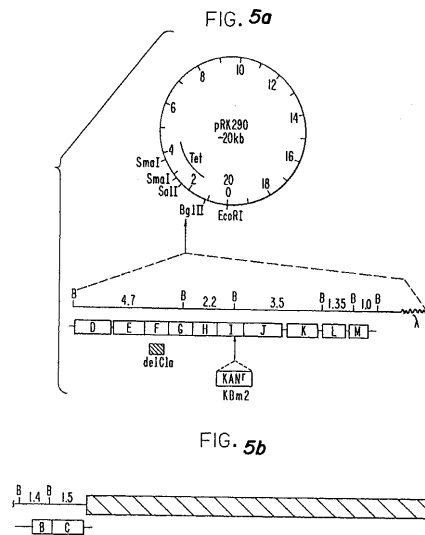


【図 4】



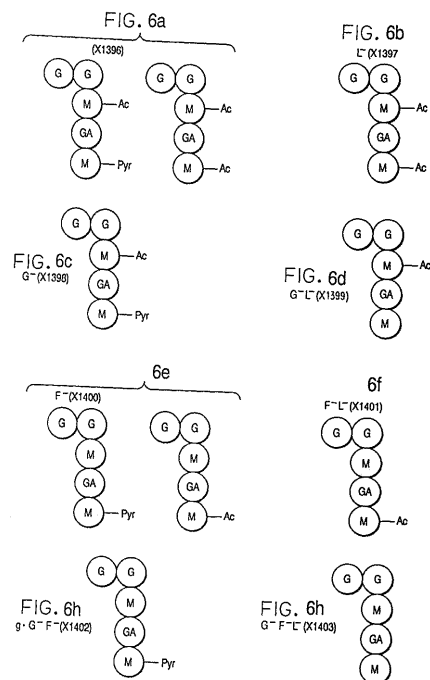
【図 5】

プラスミドpHA3KBm2delC1aの構造
及び株X1106の染色体欠失



【図 6】

変異体X1396-X1403により形成される
繰り返し単位



フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC 68038

微生物の受託番号 ATCC 68039

合議体

審判長 河野 直樹

審判官 鵜飼 健

審判官 田村 聖子

(56)参考文献 特開昭63-503198(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A23L 1/00

C12N 15/00

C08B 37/00