

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 13 日 (13.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/020929 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 9/78, 1/21, C12P 41/00 //
(C12N 15/55, C12R 1:07) (C12N 9/78, C12R 1:19)

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08654

(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 28 日 (28.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-257736 2001 年 8 月 28 日 (28.08.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱
レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒108-8506 東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号
Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 修
(KATO, Osamu) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県 横
浜市 鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン株式会

社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP). 秋山 卓理
(AKIYAMA, Takanori) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県
横浜市 鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン株式会
社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP). 中村 哲二
(NAKAMURA, Tetsuji) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県
横浜市 鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン株式会
社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5
森ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL AMIDE HYDROLASE GENE

(54) 発明の名称: 新規なアミド加水分解酵素遺伝子

(57) Abstract: An amide hydrolase which is excellent in heat stability and stereoselectively hydrolyzes an α -amino acid amide;
a gene encoding this enzyme protein; a novel recombinant vector containing the gene; a transformant containing the recombinant
vector; and a process for producing an L- α -amino acid using the transformant.

(57) 要約:

本発明は、熱安定性に優れ、かつ、 α -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解
するアミド加水分解酵素、該酵素タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含
む新規な組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を
利用した L- α -アミノ酸の製造方法に関する。

WO 03/020929 A1

明 細 書

新規なアミド加水分解酵素遺伝子

技術分野

本発明は、熱安定性に優れ、かつ、 α -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解するアミド加水分解酵素、該酵素タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む新規な組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を利用した L- α -アミノ酸の製造方法に関する。

背景技術

微生物あるいは微生物由来の酵素を α -アミノ酸アミドと接触させることにより光学活性 L- α -アミノ酸を製造する方法が知られている（特開昭 59-159789 号公報、特開昭 61-119199 号公報、特開昭 62-55097 号公報、特開平 1-277499 号公報、特開平 5-30992 号公報参照）。上記の方法は、いずれも微生物が有するアミド加水分解酵素による反応を利用するものである。アミド加水分解酵素は、アミダーゼとも称され、酸アミド基を加水分解してカルボン酸とアミン又はアンモニアを生ずる反応を触媒する加水分解酵素である。微生物由来のアミド加水分解酵素は、 α -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解して光学活性な L- α -アミノ酸を産生することを特徴とする。「光学活性な L- α -アミノ酸」とは、左旋性の鏡像異性体が他方の鏡像異性体より多く含まれているアミノ酸のこと、又は、左旋性の鏡像異性体のみからなるアミノ酸のことをいう。

しかしながら、これら微生物あるいは微生物由来の酵素を工業的物質生産に用いる場合、コスト面をクリアーするため、使用するアミド加水分解酵素の安定性および活性が十分に高められている必要がある。上記製法において使用される微生物は、何れも 55℃ 以上の高温では増殖できない中温菌であるため、これらの微生物が有するアミド加水分解酵素は、常温以上の温度域では安定性が低い。従って、高温で反応を行うと酵素が不安定となり反応速度が停止又は低下するという問題があった。

発明の開示

本発明の目的は、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を任意の宿主に導入した形質転換体を作製することによって、光学活性 L- α -アミノ酸の効率的な製造方法を提供することである。

本発明者らは、鋭意検討を行った結果、55℃以上で生育可能な微生物から、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素をコードする遺伝子を単離した。さらに、遺伝子組換え手法を用いて、任意の宿主に該遺伝子を多コピー存在させることにより、該酵素活性が向上した生体触媒を製造し得る技術の開発に成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつアミド加水分解酵素活性を有するタンパク質

(2) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードするアミド加水分解酵素遺伝子。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつアミド加水分解酵素活性を有するタンパク質

(3) 以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつアミド加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA

(4) (2) 又は (3) 記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

(5) (4) 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(6) (5) 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からアミド加水分解酵素タンパク質を採取することを特徴とするアミド加水分解酵素の製造方法。

(7) (5) 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物又はその処理物と α -アミノ酸アミドを接触させることを特徴とする光学活性 L- α -アミノ酸の製造方法。

(8) 55℃以上で生育可能で、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素を産生する、*Thermus* 属又は *Bacillus* 属に属する微生物。

(9) (8) に記載の微生物を培養し、得られる培養物又はその処理物と α -アミノ酸アミドを接触させることを特徴とする光学活性 L- α -アミノ酸の製造方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第 2001-257736 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

以下に、本発明を詳細に説明する。

1. 天然の好熱菌による光学活性 L- α -アミノ酸の製造

本発明者らは、55℃以上で生育可能で、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素を産生する微生物を培養し、得られる培養物又はその処理物と α -アミノ酸アミドを接触させることより光学活性 L- α -アミノ酸が効率的に製造できることを見出した。

この反応を媒介するアミド加水分解酵素は、生育上限温度が 55℃以上の好熱菌に属する微生物由来のものであり、 α -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解して光学活性 L- α -アミノ酸を生成する能力があれば特に制限されるものではない。そのような酵素は、自然界から分離された菌株又はタイプカルチャーコレクションから入手される菌株から広く見いだされる。例えば、バチルス属やサーマス属に属する細菌、具体的には、例えば、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) NCIMB8923 やサーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) NCIMB11243、が挙げられる。これらの菌株は、The National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) から容易に入手することができる。

本発明のアミド加水分解酵素は、 α -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解して、L- α -アミノ酸を生成する能力を有するものであり、その様な能力を有する

酵素としては、種々のアミダーゼあるいはアミノペプチダーゼ等が知られている。

上記微生物を培養するための培地組成としては、通常これらの微生物が生育するものであれば何れのものでも使用できる。炭素源としては、例えば、グルコース、シュクロースやマルトース等の糖類、酢酸やクエン酸等の有機酸あるいはその塩、エタノールやグリセロール等のアルコール類等を使用できる。窒素源としては、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキスやアミノ酸等の一般天然窒素源の他、各種無機、有機酸アンモニウム塩等が使用できる。その他、無機塩、微量金属塩、ビタミン等が必要に応じて適宜添加される。

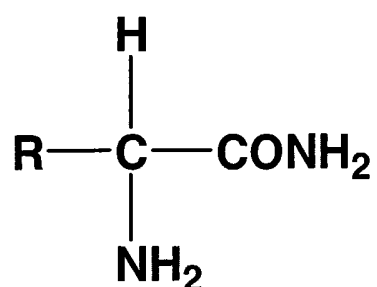
上記微生物の培養は常法によればよく、例えば、pH4～10、好ましくは pH5～9、温度 20～80℃、好ましくは 50～70℃の範囲にて 1～100 時間培養する。

本発明においては、上記微生物を培地中で培養して得られる培養物をそのままか、該培養物から遠心分離などの集菌操作によって得られる菌体、培養上清又はそれらの処理物を用いることができる。該処理物としては、菌体破碎物、菌体破碎物又は培養上清から調製した粗酵素、精製酵素等が挙げられる。また、常法により担体に固定化した菌体、該処理物、酵素等を用いることができる。

アミド加水分解反応は、通常、アミノ酸アミドを 0.5～50%（反応基質溶液はスラリー状であってもよい）の濃度になるように水性媒体・酵素源と混合して行う。酵素源である培養物、菌体、菌体処理物等の添加量は特に制限されないが、通常、乾燥菌体質量換算で 0.01～10%の範囲で添加すればよい。反応は通常、0～80℃、好ましくは 20～70℃において、pH4～11、好ましくは pH6～10 の範囲で行われる。

このようにして反応液中に生成、蓄積した L- α -アミノ酸は、イオン交換法、晶析法等、公知の方法を組み合わせで分離、精製し取得することができる。

本発明において、アミノ酸アミドとは、アミノ酸分子中のカルボキシル基が酸アミドになったもの意味し、式 I：



で表される。式中、R は、炭素数 1~4 の直鎖状もしくは分岐状のアルキル基、フェニル基又はハロゲンである。該アルキル基又はフェニル基は、メルカプト基、ヒドロキシル基、アミノ基、カルボキシル基、フェニル基、インドリル基、メチルチオ基、カルバモイル基、イミダゾリル基から選ばれる 1 個以上の基で置換されていてもよい。あるいは、R は NH_2 基と結合して環を形成していてもよい。 α -アミノ酸アミドの具体例としては、フェニルアラニンアミド、トリプトファンアミド、ロイシンアミド、tert-ロイシンアミド、バリンアミド、メチオニンアミド、セリンアミド、ヒスチジンアミド、プロリンアミド等を挙げるができる。

本発明において、産生される L- α -アミノ酸の具体例としては、例えば、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-ロイシン、L-tert-ロイシン、L-バリン、L-メチオニン、L-セリン、L-ヒスチジン、L-プロリン等を挙げるができる。また、反応に用いるアミノ酸アミドの光学純度に関しては特に制限はない。

2. アミド加水分解酵素遺伝子のクローニング

さらに本発明者らは、55℃以上で生育可能で、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素を産生する微生物のうち、岐阜県の温泉水よりサーマス属 (*Thermus* sp.) 0-3-1 株 (以下、0-3-1 株と称する) を単離し、該菌株からアミド加水分解酵素タンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子を単離した。本菌株は、ブタペスト条約に基づき、平成 14 年 8 月 5 日付けで、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に受託番号 FERM BP-8139 として寄託されている。0-3-1 株の菌学的な性質は以下に示される。

形態	桿菌 ($0.5 \times 2 \mu\text{m}$)、鎖状、伸長型あり
グラム染色	—
孢子	—
運動性	—
コロニー形態	円形、周縁糸状、低凸状、光沢有り、淡いクリーム色

生育の範囲

80℃	—
70℃	+
55℃	+
40℃	+ (weak)
30℃	—

酸素に対する態度

嫌氣的生育 —

カタラーゼ +

オキシダーゼ +

O/F 試験 —

炭水化物からの酸産生

グリセロール —

エリスリトール —

D-アラビノース ±

L-アラビノース —

リボース +

D-キシロース —

L-キシロース —

アドニトール —

β-メチル-D-キシロース —

ガラクトース —

グルコース —

フラクトース —

マンノース —

ソルボース —

ラムノース —

ズルシトール —

イノシトール —

マンニトール	—
ソルビトール	—
α -メチル-D-マンノース	—
α -メチル-D-グルコース	—
N-アセチルグルコサミン	—
アミグダリン	—
アルブチン	—
エスクリン	+
サリシン	—
セロビオース	—
マルトース	—
乳糖	—
メリビオース	—
白糖	—
トレハロース	—
イヌリン	—
メレチトース	—
ラフィノース	—
澱粉	—
グリコーゲン	—
キシリトール	—
ゲンチオビオース	—
D-ツラノース	—
D-リキソース	—
D-タガトース	—
D-フコース	—
L-フコース	—
D-アラビトール	—
L-アラビトール	—

グルコネート	—
2-ケトグルコン酸	—
5-ケトグルコン酸	+
培養的性質	
肉汁液体培養	皮膜形成
リトマスミルク	不変
生理学的性質	
硝酸塩還元	+
脱窒反応	—
MR テスト	—
VP テスト	—
インドールの生成	—
硫化水素の生成	—
でん粉加水分解	+
クエン酸の利用	
Koser	—
Christensen	—
無機窒素源の利用	
NaNO_3	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—
ウレアーゼ	—
加水分解性	
皮革末 (azure)	—
エラスチン	—
カゼイン	—
DNase	+
α -ガラクトシダーゼ	—
β -ガラクトシダーゼ	+
炭素源利用性	

酢酸ナトリウム	—
グルタミン酸ナトリウム	—
コハク酸ナトリウム	—
ピルビン酸ナトリウム	—
プロリン	—

(1) 0-3-1 株の培養

0-3-1 株を培養するための培地組成としては、通常これらの微生物が生育するものであれば何れのものでも使用できる。炭素源としては、例えば、グルコース、シュークロースやマルトース等の糖類、酢酸やクエン酸等の有機酸又はその塩、あるいはエタノールやグリセロール等のアルコール等を使用できる。窒素源としては、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキスやアミノ酸等の一般天然窒素源の他、各種無機、有機酸アンモニウム塩等が使用できる。その他、無機塩、微量金属塩、ビタミン等が必要に応じて適宜添加される。また、0-3-1 株の培養は常法に従えばよく、好気又は嫌気培養装置を用いて、例えば、pH4~10、好ましくは pH5~9、温度 20~80℃、好ましくは 50~70℃の範囲にて 1~100 時間培養する。

(2) 染色体 DNA の調製

0-3-1 株より染色体 DNA を分離、調製する。染色体 DNA の分離及び調製は、公知の方法の何れをも用いることができる。例えば、Saito and Miura の方法 (Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) が挙げられる。

(3) DNA ライブラリーの作製

工程 (2) で得られた 0-3-1 株染色体 DNA を適当な制限酵素 (例えば EcoRI、BamHI、Hind III、Sau3AI、MboI、PstI 等) で部分分解する。これを、制限酵素 (例えば BamHI、BglII 等) で切断し、アルカリホスファターゼ処理を行い脱リン酸化したベクターとライゲーションを行い、ライブラリーを作製する。用いることができるベクターとしては、宿主細胞で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド DNA、ファージ DNA、コスミド DNA 等が挙げられる。プラスミド DNA としては、例えば pBR322、pSC101、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pACYC117、

pBluescript II SK (+) 等が挙げられ、ファージ DNA としては、例えば λ gt10、Charon 4A、EMBL-、M13mp18、M13mp19 等が挙げられる。例えば大腸菌を宿主とする場合、大腸菌中での自律複製可能な領域を有している pBR322、pUC118、pUC18、pBluescript II SK (+) などが挙げられる。

(4) 形質転換体の作製

DNA 断片とベクター断片とを連結させるには、公知の DNA リガーゼを用いる。そして、DNA 断片とベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ、組換えベクターを作製する。形質転換の宿主は特に限定されるものではなく、例えば大腸菌を用いる場合、大腸菌 DH1 株、HB101 株、C600 株、MV1184 株、TH2 株、K12 株、JM109 株、XL1-Blue 株などを挙げるができる。宿主に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば大腸菌を宿主として用いる場合は、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 154 (1970)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1, 184 (1994)) を採用することができ、ファージの場合はインビトロ・パッケージング法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1, 571 (1994)) 等を採用することができる。

(5) アミド加水分解酵素遺伝子を含む組換え DNA の選別

工程 (4) で得られた形質転換体を α -アミノ酸アミドを唯一窒素源とする寒天培地上に接種する。 α -アミノ酸アミドとしては、上記式 I で表されるものを使用できる。該寒天培地上で大きく出現したコロニーを選択し、適切な培地で液体培養を行う。培養に用いる培地としては、特に制限されないが、形質転換体の宿主として大腸菌を用いる場合、例えば、酵母エキス、トリプトン、ポリペプトン、コーンステープリカー、大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の 1 種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第二鉄、硫酸第二鉄若しくは硫酸マンガン等の無機塩類の 1 種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。また、必要に応じて、ベクター DNA を安定に維持させるための抗生物質や、遺伝子発現のための誘導剤を添加する。なお、培地の初発 pH は 7~9 に調整するのが適当である。また、培養は、25~42℃で 6~24 時間、通気

攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施するのが好ましい。得られた培養物から遠心分離などによって集菌を行い、適当な緩衝液に懸濁する。この菌体懸濁液を α -アミノ酸アミド（例えば、DL-tert-ロイシンアミド等）を含む緩衝液に懸濁し、反応を行う。一定時間後、高速液体クロマトグラフィー等の分析手段により、対応する α -アミノ酸の生成量を定量する。 α -アミノ酸を生成していた形質転換体をアミド加水分解酵素遺伝子保有候補株として選別する。

(6) 制限酵素地図の作成とサブクローニング

工程(5)で選択された形質転換体より常法に従ってプラスミドを調製する。得られたプラスミドを種々の制限酵素を用いて切断し、電気泳動により分析を行う。泳動パターンから制限酵素地図を作成し、必要に応じて、より短い断片を有するサブクローンを作製する。

(7) サブクローンのアミド加水分解酵素活性確認

工程(6)で得られたサブクローンについて形質転換体を作製した後、工程(5)の培養および反応操作を行い、 α -アミノ酸生成の有無によってプラスミド中にアミド加水分解酵素遺伝子が含まれているかどうかを判別する。

(8) 塩基配列の決定とアミド加水分解酵素遺伝子の同定

得られたサブクローンのうち、なるべく挿入断片が小さく、かつ、アミド加水分解酵素活性を有する形質転換体よりプラスミドを調製し、該プラスミドの挿入断片について塩基配列を決定する。塩基配列の決定は、公知の方法、例えば、蛍光標識または放射標識を用いたジデオキシ法、マキシム・ギルバート法等により行うことができる。決定された塩基配列中からオープンリーディングフレームを検索し、適宜、公開されている塩基配列およびアミノ酸配列データベースとの比較を行う。

配列番号1に本発明のアミド加水分解酵素のアミノ酸配列を、配列番号2に本発明のアミド加水分解酵素遺伝子の塩基配列を例示するが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がアミド加水分解酵素活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは、10～20個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号1で表さ

れるアミノ酸配列に1個、好ましくは、10～20個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは、10～20個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。また、本発明のアミド加水分解酵素遺伝子の塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ、アミド加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も本発明の遺伝子に含まれる。ストリンジентな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、すなわち、本発明のアミド加水分解酵素遺伝子に対し高い相同性（相同性が90%以上、好ましくは95%以上）を有するDNAがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、このような条件は、0.5～1MのNaCl存在下42～68℃で、又は50%ホルムアミド存在下42℃で、又は水溶液中65～68℃で、ハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline sodium citrate) 溶液を用いて室温～68℃でフィルターを洗浄することにより達成できる。

ここで、「一部の配列」とは、上記アミド加水分解酵素遺伝子の塩基配列の一部を含むDNAの塩基配列であって、該DNAがアミド加水分解能を有するタンパク質をコードするものを指す。また「一部の配列」は、ストリンジентな条件下でハイブリダイズさせるのに十分な塩基配列の長さを有するもの、例えば、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも50塩基、より好ましくは少なくとも200塩基の配列である。

なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutan-K（TAKARA社製）、Mutan-G（TAKARA社製））などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて行うことができる。なお、上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

3. 組換えベクター及び形質転換体の作製

本発明の組換えベクターは本発明の遺伝子又はその一部を適当なベクターに連結することにより得ることができ、また、本発明の形質転換体は本発明の組換えベクターを本発明の遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。「一部」とは、宿主中に導入されて本発明のアミド加水分解酵素を発現することができるアミド加水分解酵素遺伝子の一部分を指す。

本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主細胞で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド DNA、ファージ DNA、コスミド DNA 等が挙げられる。プラスミド DNA としては、例えば pBR322、pSC101、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pACYC117、pBluescript II SK (+) 等が挙げられ、ファージ DNA としては、例えば λ gt10、Charon 4A、EMBL-、M13mp18、M13mp19 等が挙げられる。

宿主としては、目的とする遺伝子が発現できるものであれば特に限定されず、例えば、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) などのラルストニア属に属する細菌、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) などのシュードモナス属に属する細菌、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などのバチルス (*Bacillus*) 属に属する細菌、大腸菌 (*Escherichia coli*) などのエッシェリヒア属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などのサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属に属する酵母、カンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) などのカンジダ (*Candida*) 属に属する酵母、COS 細胞、CHO 細胞、マウス L 細胞、ラット GH3、ヒト FL 細胞などの動物細胞、SF9 細胞などの昆虫細胞などが挙げられる。

大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換えベクターが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、本発明の DNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持される RK2 複製起点を有する pLA2917 (ATCC 37355) や RSF1010 複製起点を有する pJRD215 (ATCC 37533) 等が挙げられる。

プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trp プロモーター、lac プロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7 プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが

用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばカルシウムイオンを用いる方法(Current Protocols in Molecular Biology, 1, 181 (1994)) やエレクトロポレーション法等が挙げられる。

酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えば YEp13、YCp50 等が挙げられる。プロモーターとしては、例えば gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、GAP プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 192, 9-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えば pcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社) 等が用いられる。プロモーターとしては、例えば、SR α プロモーター、SV40 プロモーター、CMV プロモーター等が挙げられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

4. アミド加水分解酵素の製造

本発明のアミド加水分解酵素は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養物（培養菌体又は培養上清）中に本発明のアミド加水分解酵素を生成蓄積させ、該培養物からアミド加水分解酵素を採取することにより行われる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌等の細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、完全培地又は合成培地、例えば LB 培地、M9 培地等が挙げられる。また、培養温度は 0～70℃の範囲で好氣的に 1～80 時間培養することによりアミド加水分解酵素を菌体内に蓄積させ、回収する。培養期間中 pH は 7 付近に保持する。pH の調整は、無機酸又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

炭素源は微生物の増殖に必要であり、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。窒素源としては、例えば、アン

モニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。また、無機物としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)、インドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加することができる。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば RPMI-1640、DMEM 培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常 5%CO₂ 存在下、30~40℃で 1~7 日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。アミド加水分解酵素の精製は、得られる培養物を遠心して回収し（細胞についてはソニケーターにて破碎する）、アフィニティークロマトグラフィー、陽イオン又は陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等を単独で又は適宜組み合わせることによって行うことができる。得られた精製物質が目的の酵素であることの確認は、通常の方法、例えば SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウエスタンブロットティング等により行う。

5. 形質転換体又はその処理物による光学活性 L-α-アミノ酸の製造

上記において得られた形質転換体の培養物から遠心分離などによって集菌を行い、適当な緩衝液に懸濁する。この菌体懸濁液を α-アミノ酸アミドを含む緩衝液に懸濁し、反応を行うことによって、光学活性 L-α-アミノ酸を製造することができる。反応の条件は、例えば、反応温度は 0~80℃、好ましくは 10~70℃、反応時間は 0.1~100 時間、好ましくは 0.5~80 時間、pH は 4~11 程度である。

また、該培養物の処理物を用いて反応を行うこともできる。該処理物としては、菌体破碎物、菌体破碎物又は培養上清から調製した粗酵素、精製酵素等が挙げら

れる。また、常法により担体に固定化した菌体、該処理物、酵素等を用いることができる。

生成した L- α -アミノ酸の細胞内含量及び光学純度は、遠心分離などの方法によって菌体又は酵素を除去した後、高速液体クロマトグラフィー、NMR などに供試することにより測定・分析することができる。

本発明の形質転換体又はアミド加水分解酵素は高温でもアミド加水分解活性が維持されるとともに、従来の微生物又は微生物由来酵素を用いる場合に比べ、効率的に光学活性 L- α -アミノ酸を合成できることが明らかとなった。

図面の簡単な説明

図 1 は、組換えプラスミド pM5 の制限酵素地図である。

図 2 は、組換えプラスミド pM501 の制限酵素地図である。

図 3 は、組換えプラスミド pM501KN の制限酵素地図である。

図 4 は、組換えプラスミド pM501PH の制限酵素地図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

〔実施例 1〕

ポリペプトン 0.8%、酵母エキス 0.4%、NaCl 0.2%、CaCl₂・2H₂O 0.005%、MgCl₂・6H₂O 0.008%からなる培地 (pH7.5) 100ml を三角フラスコ (500ml 容) に入れ、オートクレーブ滅菌した。この培地に *Thermus aquaticus* NCIMB11243 株を接種して、70℃にて 3 日間培養した。

培養終了後、培養物から菌体を遠心分離にて集菌し、培養物と同量の 50mM NH₄Cl-NH₄OH 緩衝液 (pH 9.0) にて 1 回菌体を洗浄した後、同緩衝液 5ml に菌体を懸濁した。

上記菌体懸濁液 1.5ml に 2%のフェニルアラニンアミド溶液 1.5ml を添加して、70℃にて 1 時間反応を行った。反応終了後、反応液から遠心分離にて菌体を除去

後、高速液体クロマトグラフィーにて定量、光学純度を分析した。

結果、0.28%のL-フェニルアラニンが生成していた。光学純度は100%eeであった。

〔HPLC 分析条件〕

(定量分析)

カラム； イナートシル ODS-3V (4.6φ×250mm)

移動層； 0.1% リン酸水溶液：アセトニトリル (80：20)

流速； 1ml/min

検出； UV (254nm)

(光学純度分析)

カラム； SUMICHIRAL OA-5000 (4.6φ×150mm)

移動層； 2mM 硫酸銅：メタノール (70：30)

流速； 1ml/min

検出； UV (254nm)

〔実施例 2〕

ポリペプトン 0.5%、肉エキス 0.3%、NaCl 0.8%からなる培地 (pH 7.3) 100ml を三角フラスコ(500ml 容)に入れ、オートクレーブ滅菌した。この培地に *Bacillus stearothermophilus* NCIMB8923 株を接種して、55℃にて3日間培養した。

培養終了後、培養物から菌体を遠心分離にて集菌し、培養物と同量の 50mM $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$ 緩衝液 (pH 9.0) にて1回菌体を洗浄した後、同緩衝液 5ml に菌体を懸濁した。

上記菌体懸濁液 1.5ml に 2%のフェニルアラニンアミド溶液 1.5ml を添加して、55℃にて1時間反応を行った。反応液から遠心分離にて菌体を除去後、実施例 1 と同一条件で、高速液体クロマトグラフィーにて分析したところ、0.49%の L-フェニルアラニンが生成していた。光学純度は 100%ee であった。

〔実施例 3〕

実施例 1 と同様に調製した菌体懸濁液 1.5ml に 2%の tert-ロイシンアミド溶液

1.5ml を添加して、70℃にて 70 時間反応を行った。反応液から遠心分離にて菌体を除去後、高速液体クロマトグラフィーにて分析したところ、0.38%の L-tert-ロイシンが生成していた。光学純度は 100%ee であった。

〔HPLC 分析条件〕

(定量分析)

カラム； イナートシル ODS-3V (4.6φ×250mm)

移動層； 0.1% リン酸水溶液

流速； 1ml/min

検出； RI

(光学純度分析)

カラム； SUMICHIRAL OA-5000 (4.6φ×150mm)

移動層； 2mM 硫酸銅：メタノール (85：15)

流速； 1ml/min

検出； UV (254nm)

〔実施例 4〕

実施例 2 と同様に調製した菌体懸濁液 1.5ml に 2%の tert-ロイシンアミド溶液 1.5ml を添加して、70℃にて 70 時間反応を行った。反応液から遠心分離にて菌体を除去後、高速液体クロマトグラフィーにて分析したところ、0.31%の L-tert-ロイシンが生成していた。光学純度は 100%ee であった。

〔実施例 5〕

(1) 0-3-1 株の培養

0-3-1 株を 100ml の栄養培地(0.2% ポリペプトン、0.1% 酵母エキス、0.2%NaCl、0.005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.008% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、pH7.5) に接種し、70℃にて 3 日間培養した。

(2) 染色体 DNA の調製

培養終了後、遠心分離により集菌し、滅菌蒸留水にて洗浄した後、Saline-EDTA 溶液 (0.1M EDTA、0.15M NaCl) 2ml に懸濁した。リゾチーム 10mg を加えて 37℃

で1時間振盪した後、10mlのTris-SDS液(1% SDS、0.1M NaCl、0.1M Tris、pH 9.0)を穏やかに振盪しながら加え、さらにプロテイナーゼK(メルク社製)を終濃度1mgとなるように加え、37℃で1時間振盪した。次に、等量のTE飽和フェノール(TE:10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0)を加えて攪拌後遠心し、上層を採り2倍量のエタノールを加えた後ガラス棒でDNAを巻きとり、90%、80%、70%のエタノールで順次フェノールを取り除いた。次に、DNAを5mlのTE緩衝液に溶解させ、リボヌクレアーゼA溶液(100℃、15分間の熱処理済み)を10mg/mlになるように加え37℃で30分間振盪した。さらにプロテイナーゼKを終濃度1mgとなるように加えて37℃で30分間振盪した後、等量のTE飽和フェノールを加え遠心し上層と下層に分離させ上層を採取した(以後この操作をフェノール抽出と呼ぶ)。フェノール抽出を2回繰り返した後、同量のクロロホルム(4% イソアミルアルコール含有)を加え同様の抽出操作を繰り返した(以後この操作をクロロホルム抽出と呼ぶ)。その後上層に2倍量のエタノールを加えガラス棒でDNAを巻き取り回収し、滅菌水1mlに溶解して染色体DNA標品を得た。

(3) DNAライブラリーの作製

工程(2)で得られた0-3-1株染色体DNA 200 μ lに10倍濃度制限酵素反応用緩衝液40 μ l、滅菌水160 μ l、制限酵素Sau3AI 2 μ lを加え、37℃にて2分間インキュベートした後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。アガロースゲル電気泳動を行い、約4~7kbのDNA断片をゲルから切り出し、DNA PREP(ダイアトロン社製)を用いて回収した。このDNA断片をDNA Ligation Kit Ver.1(宝酒造社製)を用いて大腸菌ベクターpUC118のBamHI部位に挿入し、組換えDNAライブラリーを作製した。ライゲーションに用いたpUC118断片は次のように作製した。pUC118保存液2 μ lに対し、10倍濃度制限酵素用緩衝液5 μ l、滅菌水40 μ l、制限酵素BamHI 3 μ lを加え、37℃で2時間反応後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿させた後乾燥して50 μ lの滅菌水に溶解させた。さらにアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)1 μ l、10倍濃度緩衝液10 μ l、滅菌水39 μ lを加え65℃で反応後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿後乾燥して滅菌水に溶解させた。

(4) 形質転換体の作製

大腸菌 JM109 株を LBamp 培地 (1% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、0.5% NaCl、0.01% アンピシリン) 1ml に接種し 37℃、5 時間好氣的に前培養し、この培養物 0.4ml を SOB 培地 40ml (2% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、10mM NaCl、2.5mM KCl、1mM MgSO₄、1mM MgCl₂) に加え、18℃で20時間培養した。この培養物を遠心分離により集菌した後、冷TF溶液(20mM PIPES-KOH (pH 6.0)、200mM KCl、10mM CaCl₂、40mM MnCl₂) を 13ml 加え、0℃で10分間放置後、再度遠心し、上澄を除いた後、沈殿した大腸菌を冷TF溶液 3.2ml に懸濁し、0.22ml のジメチルスルフォキシドを加え 0℃で10分間放置した。こうして作製したコンピテントセル 200 μl に工程 (3) で作製した組換えプラスミドを含有する溶液 (DNA ライブラリー) を 10 μl 加え、0℃で30分間放置後、42℃で30秒間ヒートショックを与え、0℃で2分間冷却後、SOC 培地 (20mM グルコース、2% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、10mM NaCl、2.5mM KCl、1mM MgSO₄、1mM MgCl₂) 1ml を添加して 37℃にて1時間振盪培養した。これを 200 μl ずつ LBamp 寒天培地 (1.5% 寒天を含む LBamp 培地) にまき、37℃で一晩培養し、形質転換体を得た。

(5) アミド加水分解酵素遺伝子を含む組換え DNA の選別

工程 (4) で得られた形質転換体コロニーを、乳酸アミド含有寒天培地に接種した。乳酸アミド含有寒天培地は、滅菌シャーレに 20ml ずつ固化させた寒天培地 (0.2% グリセロール、0.05% NaCl、0.002% チアミン塩酸塩、0.6% Na₂HPO₄、0.3% KH₂PO₄、0.001% ZnSO₄·7H₂O、0.0025% MgSO₄·7H₂O、0.001% MnSO₄·4~6H₂O、0.0001% CaCl₂·2H₂O、1.5% 寒天) に、フィルター除菌済みの 20% DL-ラクトアミド溶液をプレート一枚あたり 100 μl 塗布して作製した。37℃にて3日間培養した後、大きく出現したコロニー12個を 1mM IPTG 含有 LBamp 培地 1.5ml に接種し、37℃にて一晩培養した。培養後、遠心分離により集菌し、菌体を 50mM NH₄Cl-NH₄OH₄ 緩衝液 (pH9.0) で洗浄し、0.7ml の同緩衝液に懸濁した。この菌体懸濁液 0.5ml を 70℃で5~10分間前処理した後、2% DL-tert-ロイシンアミドを含む 50mM NH₄Cl-NH₄OH₄ 緩衝液 (pH9.0) 0.5ml と混合し、70℃で24時間インキュベートした。インキュベーション後、遠心分離により菌体を除去した後、高速液体クロマトグラフィーにて分析を行った。分析条件を下記に記す。

(定量分析)

カラム； イナートシル ODS-3V (4.6φ×250mm)

移動層； 0.1% リン酸水溶液：アセトニトリル (80：20)

流速； 1ml/min

検出； UV (254nm)

(光学純度分析)

カラム； SUMICHIRAL OA-5000 (4.6φ×150mm)

移動層； 2mM 硫酸銅：メタノール (70：30)

流速； 1ml/min

検出； UV (254nm)

その結果、5 クローンについて 0.47～0.63%の L-tert-ロイシンの生成が見られた。光学純度はいずれも 100%ee であった。

(6) 制限酵素地図の作成とサブクローニング

工程 (5) で選別された 5 クローンのうちのひとつ (M5 と命名する) より、Flexi Prep (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いてプラスミドを精製した。得られたプラスミド (pM5) を種々の制限酵素を用いて切断し、0.7% アガロースゲル電気泳動により解析を行った結果、図 1 に示される約 8kb の挿入断片の制限酵素地図が得られた。次いで、pM5 の挿入断片中、約 2kb の KpnI 断片、および約 3.5kb の HindIII 断片を取り除いて自己連結させたサブクローン pM501 (図 2) を作製した。さらに、挿入断片中の NcoI サイトおよび PstI サイトを利用してサブクローニングを行った。すなわち、pM501 を NcoI と挿入断片 C 末端側の HindIII で切断して、約 0.7kb の NcoI-HindIII 断片を除去した後、両切断末端を平滑化して自己連結させ、pM501KN とした (図 3)。また、PstI と挿入断片 N 末端側マルチクローニングサイトの EcoRI で切断して、約 1kb の EcoRI-PstI 断片を除去した後、両切断末端を平滑化して自己連結させたプラスミド pM501PH を作製した (図 4)。

(7) サブクローンのアミド加水分解酵素活性確認

工程 (6) にて作製されたプラスミド、pM501、pM501KN、pM501PH、およびポジティブコントロールとして pM5 を用い、工程 (4) の方法により大腸菌 JM109 株を形質転換した。得られた形質転換体 (JM109/pM501、JM109/pM501KN、JM109/pM501PH、

JM109/pM5) のコロニーを 1mM IPTG 含有 LBamp 培地 1.5ml に接種し、37℃にて一晚培養した。培養後、遠心分離により集菌し、菌体を 50mM NH_4Cl - NH_4OH 緩衝液 (pH9.0) で洗浄し、0.7ml の同緩衝液に懸濁した。この菌体懸濁液 0.5ml を 70℃で 5~10 分間前処理した後、2% DL-tert-ロイシンアミドを含む 50mM NH_4Cl - NH_4OH 緩衝液 (pH9.0) 0.5ml と混合し、70℃で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、遠心分離により菌体を除去した後、工程 (5) に記載の高速液体クロマトグラフィー条件にて分析を行った。その結果、JM109/pM501、JM109/pM501KN および JM109/pM5 では、それぞれ 0.14%、0.13%、0.14% の L-tert-ロイシンの生成が見られたが、JM109/pM501PH では L-tert-ロイシンの生成はまったく見られなかった。従って、pM501KN の約 1.2kb の挿入断片中に目的とするアミド加水分解酵素遺伝子が存在することが明らかになった。

(8) 塩基配列の決定

工程(6)で得られたプラスミド pM501KN 挿入断片中の KpnI-NcoI 断片(約 1.2kb) の塩基配列を、ジデオキシ法により蛍光シーケンサー ALFII (ファルマシア社製) を用いて決定した。その結果、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレーム (配列番号 2) が見出された。日本 DNA データバンクの BLAST (blastp) により、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列と相同性を持つ既知のアミノ酸配列を検索した結果、*Sulfolobus fataricus* の推定タンパク質 (pirB90458) と 41% の相同性、*Sulfolobus tokodaii* の推定アセトアミド加水分解酵素 (dadAP000981-165) と 42% の相同性、*Aeropyrum pernix* の推定アセトアミド加水分解酵素 (dadAP000059-268) と 36% の相同性をそれぞれ示したが、いずれもその相同性は低く、これら相同性を示したタンパク質はいずれもその機能が明らかになっていないこと、 α -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解する作用を有していないことなどから、本アミド加水分解酵素は熱安定性に優れた新規なアミド加水分解酵素であると考えられた。

〔実施例 6〕

(1) 大腸菌 JM109/pM501KN を用いた光学活性 L- α -アミノ酸の製造

pM501KN を保持する大腸菌形質転換体を用いて光学活性 L- α -アミノ酸の製造

を行った。すなわち、JM109/pM501KN を LBamp 培地 1.5ml に接種し、37℃にて 6 時間培養した。得られた培養物を 1mM IPTG 含有 LBamp 培地 40ml に接種し、37℃にて 17 時間振盪培養した。得られた培養物より 5ml を採取して遠心分離により集菌した後、菌体を 50mM NH_4Cl - NH_4OH 緩衝液 (pH9.0) で洗浄し、2ml の同緩衝液に懸濁した。この菌体懸濁液を 70℃で 30 分間熱処理した後 0.5ml を取り、2% DL-tert-ロイシンアミドを含む 50mM NH_4Cl - NH_4OH 緩衝液 (pH9.0) 0.5ml と混合して、70℃で 3 時間インキュベートした。インキュベーション後、遠心分離により菌体を除去した後、工程 (5) に記載の高速液体クロマトグラフィー条件にて分析を行った。その結果、0.55% の L-tert-ロイシンの生成が見られ、光学純度は 100%ee であった。なお、pM501KN は、ブタペスト条約に基づき、平成 14 年 8 月 5 日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に受託番号 FERM BP-8138 として寄託されている。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明によれば、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素を遺伝子組換えの手法によって宿主内に多数存在させることができるため、従来の方法に比較して飛躍的に熱安定性・活性を増大させた生体触媒の提供が可能となり、工業的に極めて効率的な光学活性 L- α -アミノ酸の製造方法を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : ペプチド

配列番号 2 : DNA

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつアミド加水分解酵素活性を有するタンパク質

2. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードするアミド加水分解酵素遺伝子。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつアミド加水分解酵素活性を有するタンパク質

3. 以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアミド加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA

4. 請求の範囲第 2 項又は第 3 項記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

5. 請求の範囲第 4 項記載の組換えベクターを含む形質転換体。

6. 請求の範囲第 5 項記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からアミド加水分解酵素タンパク質を採取することを特徴とするアミド加水分解酵素の製造方法。

7. 請求の範囲第 5 項記載の形質転換体を培養し、得られる培養物又はその処理物と α -アミノ酸アミドを接触させることを特徴とする光学活性 L- α -アミノ酸の製造方法。

8. 55℃ 以上で生育可能で、熱安定性に優れたアミド加水分解酵素を産生する、*Thermus* 属又は *Bacillus* 属に属する微生物。

9. 請求の範囲第 8 項に記載の微生物を培養し、得られる培養物又はその処理物と α -アミノ酸アミドを接触させることを特徴とする光学活性 L- α -アミノ酸の

製造方法。

Fig. 1

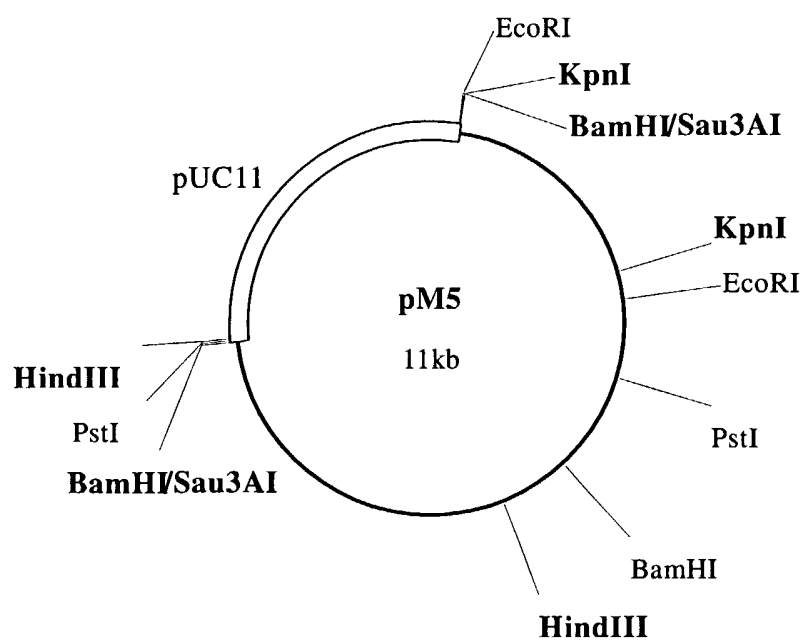


Fig. 2

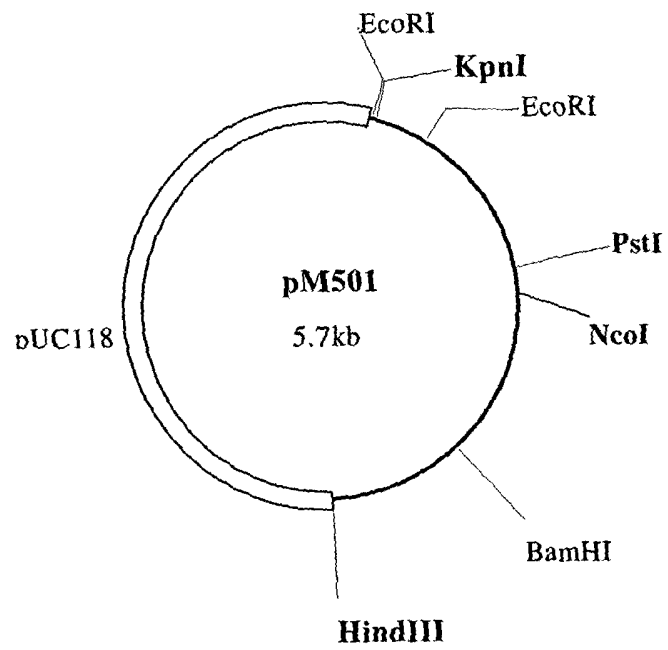


Fig. 3

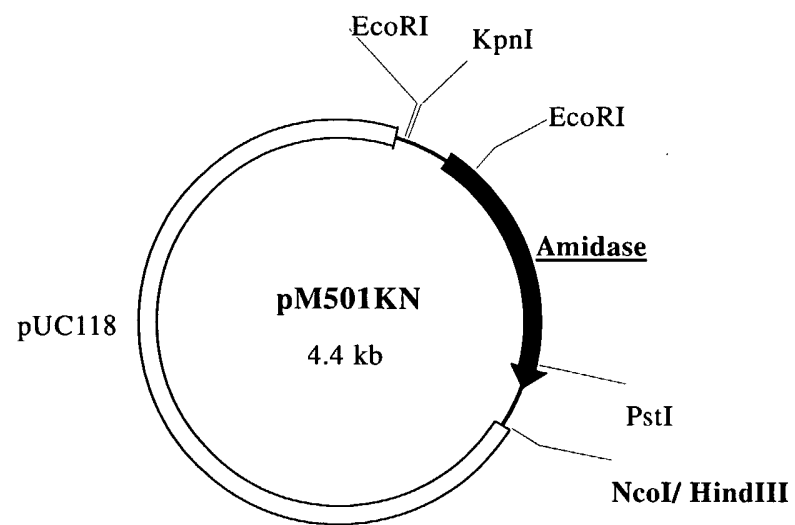
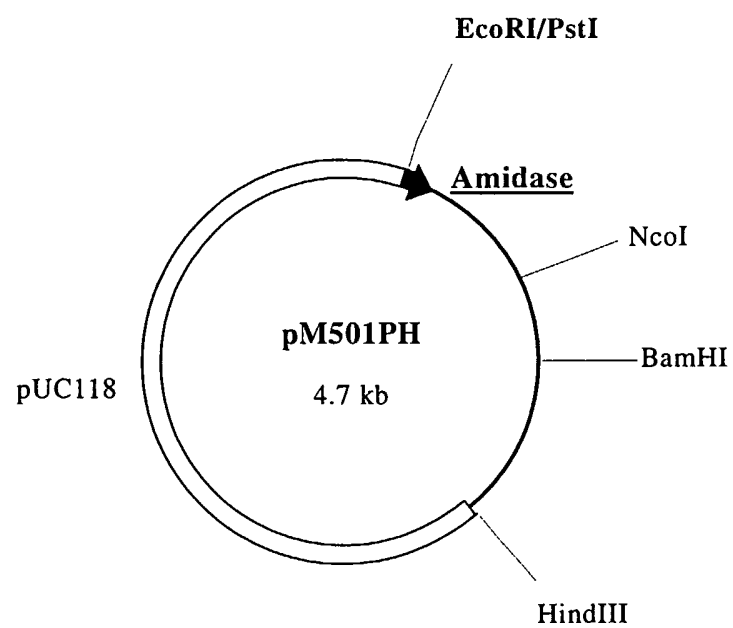


Fig. 4



SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> NOVEL AMIDASE GENE

<130> PH-1617-PCT

<140>

<141>

<150> JP2001-257736

<151> 2001-08-28

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 309

<212> PRT

<213> Thermus sp.

<220>

<221> variant

<222> 1

<223> Xaa = Met or deletion

<400> 1

Xaa Lys Gly Tyr Arg Thr Ile His Arg Glu His His His Phe Gly Trp

1 5 10 15

Asp Asn Gly Leu Pro Pro Val Ala Arg Val Phe Pro Gly Glu Val Val

20 25 30

Glu Phe Glu Val Val Asp Ala Ser Gly Gly Gln Leu Thr Pro Gly Ala

35 40 45

Thr Ala Glu Asp Val Ala Arg Leu Asp Phe Ala Arg Val Asn Pro Val

50 55 60

Thr Gly Pro Val Leu Val Asp Gly Ala Glu Pro Gly Asp Ala Leu Val

65 70 75 80

Val Glu Val Val Gly Leu Glu Gly Ser Gly Trp Gly Trp Thr Ala Ile

85 90 95

Ile Pro Gly Phe Gly Leu Leu Ala Glu Asp Phe Pro Asn Pro His Leu

100 105 110

His Phe Ser Gln Tyr His Leu Gly Gly Val Glu Phe Leu Pro Gly Val

115 120 125

Arg Leu Pro Tyr Arg Pro Phe Pro Gly Thr Ile Gly Val Ala Pro Ala

130 135 140

Ala Pro Gly Val His Ser Val Val Pro Pro Arg Glu Val Gly Gly Asn

145	150	155	160
Leu Asp Ile Arg Asp Leu Val Glu Gly Ala Arg Leu Phe Leu Pro Val			
	165	170	175
Gln Val Pro Gly Ala Leu Phe Ser Val Gly Asp Thr His Ala Val Gln			
	180	185	190
Gly Asp Gly Glu Val Cys Gly Thr Ala Val Glu Ser Pro Met Arg Ile			
	195	200	205
Ala Leu Arg Phe Asp Leu Arg Lys Glu Ala Arg Ile Pro Arg Pro Ala			
	210	215	220
Phe Glu Val Pro Arg Gly Ser Ala Lys Val Pro Gly Glu Arg Gly Phe			
225	230	235	240
Phe Ala Thr Thr Gly Ile Ala Pro Asp Leu Met Leu Ala Ala Lys Asp			
	245	250	255
Ala Val Arg Tyr Met Ile Asp His Leu Gly Arg Glu Tyr Gly Leu Ser			
	260	265	270
Pro Glu Lys Ala Tyr Met Leu Cys Ser Val Ala Val Asp Leu Arg Ile			
	275	280	285
Ser Glu Val Val Asp Ala Pro Asn Trp Val Val Ser Ala Tyr Leu Pro			
	290	295	300

Val Asp Ile Phe Ala

305

<210> 2

<211> 930

<212> DNA

<213> *Thermus* sp.

<300>

<400> 2

```

atgaagggt acaggacat tcatcgggag catcaccact tcggctggga taatggactg 60
cccccggtag ccagggtatt tccgggagag gtggtggaat tcgaggtggt ggacgcctct 120
ggagggcagc tgacgccggg tgccaccgct gaagacgtgg ctctcttgga cttcgcccgg 180
gtaaaccggt tcacgggtcc cgtgctggtg gacggggctg agccggggga tgccctggtg 240
gtggagggtg tgggcctcga ggggtcgggg tggggctgga cggccatcat ccccggtttt 300
gggctgttgg cggaagactt tccaaatccg cacttgcaat ttctgcaata ccacttgggt 360
ggcgtggagt ttctacctgg agtccggcta ccgtacaggc ctttccccgg caccatcggc 420
gtggctcctg cggcccctgg ggtgcactcc gtggttcac cgcgggaggt gggaggcaac 480
ctggacatcc gcgacctggt ggaaggggag agactcttcc ttccggtgca ggtgccgggg 540
gcccgtttct ctgtgggaga caccacgcc gttcaggggg acggcgaggt gtgtggcacc 600
gcagtggagt caccatgag gatcgcccta cgttttgacc tgcgcaagga ggccaggata 660
ccgcgcccgg cttttgaagt cccacgcgga tcagcaaaag ttccagggga gagaggcttt 720
tttgccacca cagggttgc tccggacctt atgcttgagg ccaaggatgc ggtacgctac 780
atgatcgacc acctagggcg ggagtatggg ctatccccgg agaaggcgta catgctctgc 840
agcgtggcag tggacctaa aatcagcgag gtggtggatg cccccaactg ggtggtttcc 900
gcttacctac ccgtggatat ttctgcctga 930

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 9/78, 1/21, C12P41/00// (C12N15/55, C12R1:07)
(C12N9/78, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, 9/78, 1/21, C12P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/63354 A1 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.), 26 October, 2000 (26.10.00), Claims; examples and sequence listing & EP 1174499 A1 & JP 2000-612433 A	1-9
Y	WO 97/48794 A1 (RECOMBINANT BIOCATALYSIS), 24 December, 1997 (24.12.97), Claims; examples & EP 937139 A1 & US 5877001 A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 November, 2002 (20.11.02)	Date of mailing of the international search report 03 December, 2002 (03.12.02)
---	--

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, 9/78, 1/21, C12P41/00// (C12N15/55, C12R1:07) (C12N9/78, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, 9/78, 1/21, C12P41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/63354 A1 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.) 2000. 10. 26, 特許請求の範囲、実施例及び配列表等参照, & EP 1174499 A1 & JP 2000-612433 A	1-9
Y	WO 97/48794 A1 (RECOMBINANT BIOCATALYSIS) 1997. 12. 24, 特許請求の範囲、実施例等参照, & EP 937139 A1 & US 5877001 A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 02

国際調査報告の発送日

03.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488