

明 細 書

発明の名称：

酸化酵素、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらの利用

技術分野

[0001] 本発明は、酸化酵素、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらを利用した α -アミノ酸化合物等の製造法に関する。

背景技術

[0002] α -アミノ酸化合物は、農林水産分野、食品分野、医療分野及び美容分野等において多彩な用途に用いられている。例えば、メチオニンは、動物用飼料添加物として利用されている。当該化合物を製造するには、アクロレインとメチルメルカプタンとを反応させて3-メチルチオプロピオンアルデヒドにし、これをさらに青酸、アンモニア及び二酸化炭素と反応させて5-(2-メチルーメルカプトエチル)-ヒダントイン(メチオニンヒダントイン)にする。最終的にこれをアルカリにより加水分解してアルカリ金属メチオニン酸塩にし、次いで酸、例えば硫酸又は炭酸を用いて中和することによってメチオニンを遊離させる(例えば、特許文献1等参照)。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開昭55-102557号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 上記製造法は、青酸及びアクロレインをC1-又はC3-構成要素として使用するが、これらの原料化合物の取り扱いには十分な管理やそれに適合する設備等が必要である。そこで、例えば、メチオニン等の α -アミノ酸化合物の新たな製造法の開発が期待されている。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明は、

項 1. 下記 (A1) から (A5) のいずれかのアミノ酸配列:

(A1) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列に対して 85% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号 4 または 13 で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) i) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において、109 番目のバリンのイソロイシンへの置換、191 番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び 246 番目のグルタミンのアルギニンへの置換からなる群から選ばれる 1 以上のアミノ酸置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応す

る2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

をコードするポリヌクレオチド（以下、本発明ポリヌクレオチド(A)と記すこともある。）；

項2．前記アミノ酸配列をコードする塩基配列のコドン使用頻度を大腸菌のコドン使用頻度に合わせるように選択されたコドンを含む改変された(altered)塩基配列を有する前項1記載のポリヌクレオチド；

項3．宿主細胞内において機能可能なプロモーターと前項1または2記載のポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

項4．前項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター（以下、本発明組換えベクター(A)と記すこともある。）；

項5．前項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド又は前項4記載の組換えベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体；

項6．宿主細胞が微生物または大腸菌である前項5記載の形質転換体；

項7．前項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを保有する形質転換体；

項8．宿主細胞内で複製可能なベクターに、前項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを組み込む工程を含む組換えベクターの製造方法；

項9．前項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは前項4記載の組換えベクターを宿主細胞に導入する工程を含む形質転換体の製造方法；

項10．下記(B1)から(B4)のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、

(B2) i) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)

酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) i) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号2で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

をコードするポリヌクレオチド（以下、本発明ポリヌクレオチド(B)と記すこともある。）；

項11．宿主細胞内において機能可能なプロモーターと前項10記載のポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

項12．前項10または11記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター（以下、本発明組換えベクター(B)と記すこともある。）；

項13．前項10または11記載のポリヌクレオチド又は前項12記載の組換えベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体；

項14．宿主細胞が微生物または大腸菌である前項13記載の形質転換体；

項15．前項10または11記載のポリヌクレオチドを保有する形質転換体；

項 16. 宿主細胞内で複製可能なベクターに、前項 10 または 11 記載のポリヌクレオチドを組み込む工程を含む組換えベクターの製造方法；

項 17. 前項 10 または 11 記載のポリヌクレオチドまたは前項 12 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入する工程を含む形質転換体の製造方法；

項 18. 前項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと前項 10 または 11 記載のポリヌクレオチドとを含有する組換えベクター（以下、本発明組換えベクター(AB)と記すこともある。）；

項 19. α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドをさらに含む前項 18 記載の組換えベクター（以下、本発明組換えベクター(AB C)と記すこともある。）；

項 20. α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質がロイシン脱水素酵素である前項 19 記載の組換えベクター；

項 21. α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列が、下記 (C1) から (C3) のいずれかのアミノ酸配列：

(C1) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列、

(C2) i) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(C3) i) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；

である前項 19 または 20 記載の組換えベクター；

項 22. 前項 18 から 21 のいずれか一項に記載の組換えベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体；

項 23. 宿主細胞が微生物または大腸菌である前項 22 記載の形質転換体；

項 24. i) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応する L- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド、

ii) 前項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、及び

iii) 前項 10 または 11 記載のポリヌクレオチド；

を保有する形質転換体；

項 25. 下記 (A1) から (A5) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列に対して 85% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号 4 または 13 で示される塩基配列の相補配列からなるポ

リヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) *i*) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

を有するタンパク質（以下、本発明タンパク質(A)と記すこともある。）；

項26. 下記(B1)から(B4)のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、

(B2) *i*) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) *i*) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシー

イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号2で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

を有するタンパク質（以下、本発明タンパク質(B)と記すこともある。）；

項27. (1) 下記(A1)から(A5)のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号3で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して85%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌク

レオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) *i*) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

を有するタンパク質と、

下記(B1)から(B4)のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、

(B2) *i*) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) *i*) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、*i i*) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導

体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号 2 で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

を有するタンパク質とのいずれか又は両者を、

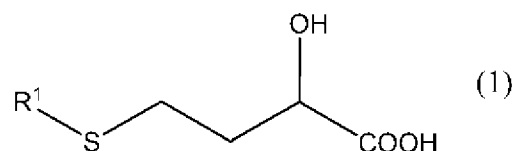
α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させて、対応する α -オキソカルボン酸化合物を得る工程、及び

(2) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質を、工程(1)で得られた α -オキソカルボン酸化合物に作用させて、対応するL- α -アミノ酸化合物を得る工程、

を含むL- α -アミノ酸化合物の製造方法（以下、本発明製造方法と記すこともある。）；

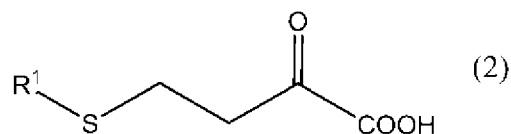
項 28. α -ヒドロキシカルボン酸化合物が含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が含硫 α -オキソカルボン酸化合物であり、対応するL- α -アミノ酸化合物が含硫L- α -アミノ酸化合物であり、工程(1)において α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるタンパク質が、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力を少なくとも有するタンパク質である前項 27 記載の製造方法；

項 29. 含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物が式(1)：



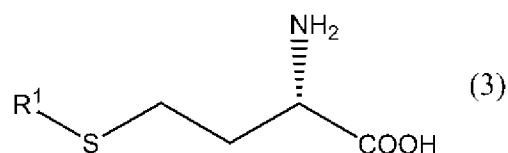
式中、R¹は水素又は置換されていてもよい炭素数1－8のアルキル基を表す；

で示される化合物であり、含硫 α -オキソカルボン酸化合物が、式(2)：



式中、R¹は前記と同じ意味を表す；

で示される化合物であり、含硫L- α -アミノ酸化合物が、式(3)：



式中、R¹は前記と同じ意味を表す；

で示される化合物である、前項28記載の製造方法；

項30. α -ヒドロキシカルボン酸化合物が α -ヒドロキシーイソカプロン酸であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が α -オキソイソカプロン酸であり、対応するL- α -アミノ酸化合物がL-ロイシンであり、工程(1)において α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるタンパク質が、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力を少なくとも有するタンパク質である前項27記載の製造方法；

項31. α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質がロイシン脱水素酵素である前項27から30のいずれか一項に記載の製造方法；

項32. α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列が、下記(C1)から(C3)のいずれかのアミノ酸配列：

(C1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(C2) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) α -オキソカルボン酸化

合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(C3) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；

である前項27から31のいずれか一項に記載の製造方法；

項33. 工程(1)において α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される前項27から32のいずれか一項に記載の製造方法；

項34. 前記形質転換体が、前項5、6、7、13、14、15、22、23または24のいずれか一項に記載の形質転換体である前項33記載の製造方法；

項35. α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される前項27から34のいずれか一項に記載の製造方法；

項36. 前記形質転換体が、前項22、23または24のいずれか一項に記載の形質転換体である前項35記載の製造方法；

項37. 工程(1)が、還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を酸化型に変換する能力を有するタンパク質の存在下で行われる前項27から36のいずれか一項に記載の製造方法；

項38. 還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を酸化型に変換する能力を有するタンパク質が α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL-

α -アミノ酸化合物に変換する能力をさらに有するタンパク質である前項 37 記載の製造方法；

項 39. 還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を酸化型に変換する能力を有するタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される前項 37 または 38 記載の製造方法；

項 40. 工程 (2) が、酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質の存在下で行われる前項 27 から 39 のいずれか一項に記載の製造方法；

項 41. 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質が α -ヒドロキシカルボン酸化合物を酸化して対応する α -オキソカルボン酸化合物に変換する能力をさらに有するタンパク質である前項 40 に記載の製造方法；

項 42. 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される前項 40 または 41 記載の製造方法；及び

項 43. 工程 (1) と工程 (2) とが一つの反応系で行われる前項 27 から 42 のいずれか一項に記載の製造方法；

等を提供するものである。

発明の効果

[0006] 本発明により、酸化酵素、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらを利用した、メチオニン、ロイシン等の α -アミノ酸化合物の製造法等を提供することが可能となる。

発明を実施するための形態

[0007] 本発明において、アミノ酸の改変を人為的に行う手法としては、例えば、改変しようとするアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに対して部位特異的変異導入を施し、その後このポリヌクレオチドを常法により発現させる手法が挙げられる。部位特異的変異導入法としては、例えば、O l f e r t L a n d t ら (Gene 96 125-128 1990)、S m i t h ら (Genetic Engineering 31 Setlow, J. and Hollaender, A Plenum : New York)、V l a s u k ら (Experimental Manipulation of Gene Expression, Inouye, M. : Academic Press, New York)、H o s . N. Hunt ら (Gene 77 51 1989) 等の方法や、M u t a n - E x p r e s s K m (タカラバイオ社製)、T a K a R a L a P C R i n v i t r o M u t a g e n e s i s K i t (タカラバイオ社製)、Q u i c k C h a n g e I I S i t e - D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t (STRATAGENE社製) 等の市販キットを利用する方法を挙げることができる。

アミノ酸の改変を人為的に行う手法としては、例えば、改変しようとするアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに対してランダムに変異導入を施し、その後このポリヌクレオチドを常法により発現させる手法も挙げられる。ここでランダムに変異を導入する手法としては、例えば、上記のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを鋳型とし、当該ポリヌクレオチドの全長を増幅できるようなプライマー対を用い、基質に用いるd ATP、dTTP、dGTP、dCTPの各々の添加濃度を通常とは変化させた反応条件や、或いはポリメラーゼの反応を促進させる Mg^{2+} の濃度を通常よりも増加させた反応条件でP C Rを行う方法等が挙げられる。このようなP C Rの手法としては、例えば、Method in Molecular Biology, (31), 1994, 97-112 に記載される方法があげられる。

[0008] 「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列又は塩基配列間の同一性をいう。前記「配列同一性」は、比較対象の配列の全領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象のアミノ酸配列又は塩基配列の最適なアラインメントにおいては、付加又は欠失（例えばギャップ等）を許容してもよい。このような配列同一性は、例えば、UWGC G P a c k a g e が供給するBESTFITプログラム（Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395）や、PILEUPやBLASTアルゴリズム（Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul S. F. (1990) J Mol Biol 215:403-10）などの配列分析用ツールを用いて算出し得る。配列同一性は市販の配列解析ソフトウェアを用いて求めることもできる。

[0009] 本発明において、目的とするポリヌクレオチドの供給源となる微生物は天然から分離してもよいし、菌株保存機関から購入することにより入手することもできる。

このような微生物を入手できる菌株保存機関として、例えば、下記の菌株保存機関を挙げることができる。

1. IF0 (Institute of Fermentation Osaka: 財団法人醗酵研究所) コレクション

現在は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源部門 (NBRC) に移管されている。微生物の入手に際してはNBRCに購入を申し込めばよく、購入申込には例えばNBRCのホームページにアクセスすればよい。

2. ATCC (American Type Culture Collection)

住商ファーマインターナショナル株式会社 ATCC事業グループを通じて入手可能であり、微生物の購入に際しては、例えば当該グループのホームページにアクセスすればよい。ATCCから微生物を直接購入してもよい。

3. JCM (理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorg

anisms, JCM)

現在は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター（RIKEN BRC）微生物材料開発室に移管されている。微生物の入手に際しては当該機関に購入を申し込めばよく、例えば当該機関のホームページのカルチャーコレクションに関するサイトにアクセスすればよい。

4. IAMカルチャーコレクション

現在は、IAMカルチャーコレクション保存菌株のうち、細菌、酵母、糸状菌については独立行政法人 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM）に、微細藻類については独立行政法人 国立環境研究所微生物系統保存施設（NIES）に移管されている。微生物の入手に際してはこれらの機関に購入を申し込めばよく、例えばこれらの機関のホームページのカルチャーコレクションに関するサイトにアクセスすればよい。

[0010] 目的とするポリヌクレオチドをクローニングするために、染色体DNA又はDNAライブラリーにプローブをハイブリダイズさせる方法としては、例えば、コロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションを挙げることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて方法を選択することができる。

使用されるライブラリーがプラスミドベクターを用いて作製されている場合にはコロニーハイブリダイゼーションを利用するとよい。具体的には、ライブラリーのDNAを宿主微生物に導入することにより形質転換体を取得し、得られた形質転換体を希釈した後、該希釈物を寒天培地上にまき、コロニーが現われるまで培養する。

使用されるライブラリーがファージベクターを用いて作製されている場合にはプラークハイブリダイゼーションを利用するとよい。具体的には、宿主微生物とライブラリーのファージとを感染可能な条件下で混合し、さらに軟寒天培地と混合した後、該混合物を寒天培地上にまき、プラークが現われるまで培養する。

[0011] 上記いずれのハイブリダイゼーションの場合にも、上記の培養を行った寒

天培地上にメンブレンを置き、形質転換体又はファージを該メンブレンに吸着・転写させる。このメンブレンをアルカリ処理した後、中和処理し、次いでDNAを該メンブレンに固定する処理を行う。より具体的には、例えば、プラークハイブリダイゼーションの場合には、前記寒天培地上にニトロセルロースメンブレン又はナイロンメンブレン（例えば、Hybond-N+（GEヘルスケア社商標））を置き、約1分間静置してファージ粒子をメンブレンに吸着・転写させる。次に、該メンブレンをアルカリ溶液（例えば1.5 M塩化ナトリウム、0.5 M水酸化ナトリウム）に約3分間浸してファージ粒子を溶解させることによりファージDNAをメンブレン上に溶出させた後、中和溶液（例えば、1.5 M塩化ナトリウム、0.5 Mトリスー塩酸緩衝溶液pH 7.5）に約5分間浸す。次いで該メンブレンを洗浄液（例えば、0.3 M塩化ナトリウム、30 mMクエン酸、0.2 Mトリスー塩酸緩衝液pH 7.5）で約5分間洗った後、例えば、約80℃で約90分間加熱することによりファージDNAをメンブレンに固定する。

このように調製されたメンブレンを用いて、プローブのハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、例えば、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition (1989)」 Cold Spring Harbor Laboratory Press等の記載に準じて行うことができる。

プローブに用いるDNAは、放射性同位元素により標識されたものや、蛍光色素で標識されたものであってもよい。

プローブに用いるDNAを放射性同位元素により標識する方法としては、例えば、Random Primer DNA Labeling Kit（タカラバイオ社製）等を利用することにより、PCR反応液中のdCTPを（ α -³²P）dCTPに替えて、プローブに用いるDNAを鋳型にしてPCRを行う方法が挙げられる。

プローブに用いるDNAを蛍光色素で標識する場合には、例えば、ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System（GEヘルスケア社製）等を用いることができる。

ハイブリダイゼーションは、例えば、以下の通りに行うことができる。

450から900 mMの塩化ナトリウム及び45から90 mMのクエン酸ナトリウムを含みドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を0.1から1.0重量%の濃度で含み、変性した非特異的DNAを0から200 μ l/mlの濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ0から0.2重量%の濃度で含んでいてもよいプレハイブリダイゼーション液（好ましくは900 mMの塩化ナトリウム、90 mMのクエン酸ナトリウム、1.0重量%のSDS及び100 μ l/mlの変性Calf-thymus DNAを含むプレハイブリダイゼーション液）を上記のようにして作製したメンブレン1 cm²当たり50から200 μ lの割合で準備し、該プレハイブリダイゼーション液に前記メンブレンを浸して42から65℃で1から4時間保温する。

次いで、例えば、450から900 mMの塩化ナトリウム及び45から90 mMのクエン酸ナトリウムを含み、SDSを0.1から1.0重量%の濃度で含み、変性した非特異的DNAを0から200 μ g/mlの濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ0から0.2重量%の濃度で含んでいてもよいハイブリダイゼーション溶液（好ましくは、900 mMの塩化ナトリウム、90 mMのクエン酸ナトリウム、1.0重量%のSDS及び100 μ g/mlの変性Calf-thymus DNAを含むハイブリダイゼーション溶液）と前述の方法で調製して得られたプローブ（メンブレン1 cm²当たり 1.0×10^4 から 2.0×10^6 cpm相当量）とを混合した溶液をメンブレン1 cm²当たり50から200 μ lの割合で準備し、該ハイブリダイゼーション溶液に浸し42から65℃で12から20時間保温する。

該ハイブリダイゼーション後、メンブレンを取り出し、15から300 mMの塩化ナトリウム1.5から30 mMクエン酸ナトリウム及び0.1から1.0重量%のSDS等を含む42から65℃の洗浄液（好ましくは15 mMの塩化ナトリウム、1.5 mMのクエン酸ナトリウム及び1.0重量%の

S D Sを含む65℃の洗浄液)等を用いて洗浄する。洗浄したメンブレンを2xSSC(300mM塩化ナトリウム、30mMクエン酸ナトリウム)で軽くすすいだ後、乾燥する。このメンブレンを例えばオートラジオグラフィー等
に供してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブとハイブリダイズするDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンを元の寒天培地上で特定し、これを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離する。

このようにして得られるクローンを培養して得られる培養菌体から、目的とするポリヌクレオチドを調製することができる。

[0012] 目的とするポリヌクレオチドを宿主細胞で発現させるには、例えば、宿主細胞で機能可能なプロモーターと前記ポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドを調製し、これを宿主細胞に導入する。

ここで、「機能可能な形で接続されてなる」とは、目的とするポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することにより宿主細胞を形質転換させた際に、当該ポリヌクレオチドが、プロモーターの制御下に発現するようにプロモーターと結合された状態にあることを意味する。

[0013] 微生物で機能可能なプロモーターとしては、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーターもしくはT7ファージのプロモーター、または、tacプロモーター、trcプロモーターもしくはT7lacプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター等をあげることができる。

[0014] 目的とするポリヌクレオチド、又は、宿主細胞において機能可能なプロモーターと前記ポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドをベクターに組み込むことにより、組換えベクターを作製することができる。用いられるベクターとしては、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖でき、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマーカーをコードするベクターを挙げることができる。宿主細胞が大腸菌である場合に利用可能なベクターとしては、pUC119(タカラバ

イオ社製)、pTV118N(タカラバイオ社製)、pBluescriptII(東洋紡社製)、pCR2.1-TOP0(Invitrogen社製)、pTrc99A(GEヘルスケア社製)、pKK223-3(GEヘルスケア社製)、pET-22b(ノバジェン社製)、pET-15b(ノバジェン社製)等が挙げられる。ベクターとして、選択マーカー遺伝子(例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性付与遺伝子等)を含むベクターを用いると、該ベクターが導入された形質転換体を当該選択マーカー遺伝子の表現型等を指標にして選択することができる。

[0015] 本発明において使用される形質転換体は、目的とするポリヌクレオチド、宿主細胞において機能可能なプロモーターと前記ポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド、または、これらポリヌクレオチドを含有する組換えベクターを宿主細胞に導入することにより、製造することができる。

宿主細胞としては、例えば、Escherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、Staphylococcus属、Streptomyces属、Saccharomyces属、Kluyveromyces属、Pichia属、Rhodococcus属及びAspergillus属に属する微生物等があげられる。

ポリヌクレオチド又は組換えベクターを宿主細胞へ導入する方法としては、用いられる宿主細胞に応じて通常使われる導入方法を適用することができる、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される塩化カルシウム法や、「Methods in Electroporation: Gene Pulser / E. coli Pulser System」Bio-Rad Laboratories, (1993)等に記載されるエレクトロポレーション法等をあげることができる。

[0016] 目的とするポリヌクレオチド又は組換えベクター等が導入された形質転換体は、例えば、上述のようなベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の表現型を指標にして選抜することができる。

得られた形質転換体が目的とするポリヌクレオチドを保有していることは、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載される通常の方法に準じて、制限酵素部位の確認、塩基配列の解析、サザンハイブリダイゼーション、ウエスタンハイブリダイゼーション等を行うことにより、確認することができる。

[0017] 本発明において使用される形質転換体を培養するための培地としては、例えば、微生物等の宿主細胞の培養に通常使用される炭素源や窒素源、有機塩や無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。

炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、シュークロース等の糖類、グリセロール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸、動物油、植物油及び糖蜜が挙げられる。これらの炭素源の培地への添加量は培養液に対して通常0.1から30% (w/v) 程度である。

窒素源としては、例えば、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーン・スティーブ・リカー (Corn Steep Liquor)、綿実粉、乾燥酵母、カザミノ酸等の天然有機窒素源、アミノ酸類、硝酸ナトリウム等の無機酸のナトリウム塩、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無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩及び尿素が挙げられる。これらのうち有機酸のアンモニウム塩、天然有機窒素源、アミノ酸類等は多くの場合には炭素源としても使用することができる。これらの窒素源の培地への添加量は培養液に対して通常0.1から30% (w/v) 程度である。

有機塩や無機塩としては、例えば、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛等の塩化物、硫酸塩、酢酸塩、炭酸塩及びリン酸塩を挙げることができる。具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化コバルト、硫酸亜鉛、硫酸銅、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素一カリウム及びリン酸水素二カリウムが挙げられる。これらの有機塩及び／又は無

機塩の培地への添加量は培養液に対して通常0.0001から5% (w/v) 程度である。

tacプロモーター、trcプロモーター、T7lacプロモーター及びlacプロモーター等のアロクトースで誘導されるタイプのプロモーターと、目的とするタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドが導入されてなる形質転換体の場合には、目的とするタンパク質の生産を誘導するための誘導剤として、例えば、isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) を培地中に少量加えることもできる。lacUV5プロモーターの支配下にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が組み込まれたバクテリオファージDE3の溶原菌 (λ DE3 lysogen) に、T7ファージプロモーターと目的とするタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドが導入されてなる形質転換体を培養する場合にも、目的とするタンパク質の生産を誘導するための誘導剤として、IPTGを培地に少量加えてもよい。

[0018] 形質転換体の培養は、微生物等の宿主細胞の培養に通常使用される方法に準じて行うことができ、例えば、試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーマンター (Jar Fermenter) 培養、タンク培養等の液体培養及び固体培養が挙げられる。

培養温度は、該形質転換体が生育可能な範囲で適宜変更できるが、通常約15℃から約40℃である。培地のpHは約6から約8の範囲が好ましい。培養時間は、培養条件によって異なるが通常約1日間から約5日間が好ましい。

[0019] 目的とするタンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有し当該目的とするタンパク質を産生する形質転換体、例えば、目的とするタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体、の培養物から目的とするタンパク質を精製する方法としては、タンパク質の精製において使用される通常の方法を適用することができ、例えば、次のような方法を挙げることができる。

形質転換体の培養物から遠心分離等により細胞を集めた後、これを超音波処理、ダイノミル処理、フレンチプレス処理等の物理的破碎法又は界面活性剤若しくはリゾチーム等の溶菌酵素を用いる化学的破碎法等によって破碎する。得られた破碎液から遠心分離、メンブレンフィルター濾過等により不純物を除去することにより無細胞抽出液を調製し、これを陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、金属キレートクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の分離精製方法を適宜用いて分画することによって、目的とするタンパク質を精製することができる。

クロマトグラフィーに使用される担体としては、例えば、カルボキシメチル（CM）基、ジエチルアミノエチル（DEAE）基、フェニル基若しくはブチル基を導入したセルロース、デキストリン又はアガロース等の不溶性高分子担体が挙げられる。市販の担体充填済カラムを用いることもでき、かかる市販の担体充填済カラムとしては、例えば、Q-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP（商品名、いずれもGEヘルスケア社製）、TSK-gel G3000SW（商品名、東ソー社製）等が挙げられる。

目的とするタンパク質が、そのアミノ末端又はカルボキシ末端領域に、連続する数残基のヒスチジンが付加されたタンパク質である場合は、金属キレートアフィニティカラムを用いて、当該タンパク質を精製することができる。目的とするタンパク質がグルタチオンSトランスフェラーゼと融合されたタンパク質として産生される場合は、グルタチオンSトランスフェラーゼモノクローナル抗体カラムを用いてこれを精製することができる。

[0020] 本発明において使用される「形質転換体の処理物」としては、例えば、凍結乾燥形質転換体、有機溶媒処理形質転換体、乾燥形質転換体、形質転換体摩砕物、形質転換体の自己消化物、形質転換体の超音波処理物、形質転換体抽出物、形質転換体のアルカリ処理物が挙げられる。形質転換体抽出物としては、無細胞抽出液、形質転換体から調製された粗精製タンパク質又は精製タンパク質、及び、これらの固定化物が挙げられる。固定化物を得る方法と

しては、例えば、担体結合法（シリカゲルやセラミック等の無機担体、セルロース、又は、イオン交換樹脂等に目的とするタンパク質等を吸着させる方法）及び包括法（ポリアクリルアミド、含硫多糖ゲル（例えばカラギーナンゲル）、アルギン酸ゲル、又は、寒天ゲル等の高分子の網目構造の中に目的とするタンパク質等を閉じ込める方法）が挙げられる。

形質転換体を用いた工業的な生産を考慮すれば、生きた形質転換体を用いるよりも該形質転換体を死滅化させた処理物を用いる方が、製造設備の制限が少ないという点では好ましい。形質転換体の死滅化処理方法としては、例えば、物理的殺菌法（加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、濾過、通電）や、化学薬品を用いる殺菌法（アルカリ、酸、ハロゲン、酸化剤、硫黄、ホウ素、砒素、金属、アルコール、フェノール、アミン、サルファイド、エーテル、アルデヒド、ケトン、シアン及び抗生物質）が挙げられる。一般的には、これらの殺菌法のうちできるだけ目的とするタンパク質の酵素活性を失活させず、かつ反応系への残留や汚染などの影響が少ない処理方法を選択することが望ましい。

[0021] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、下記(A1)から(A5)のいずれかのアミノ酸配列:

(A1) 配列番号3で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して85%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-

イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

をコードする。

本発明タンパク質(A)は、上記(A1)から(A5)のいずれかのアミノ酸配列を有する。

[0022] 本発明ポリヌクレオチド(A)がコードするアミノ酸配列または本発明タンパク質(A)のアミノ酸配列において、配列番号3で示されるアミノ酸配列との間に認められることのある相違は、一部のアミノ酸の欠失、置換または付加等(以下、総じてアミノ酸の改変と記すこともある。)である。前記「付加」には、配列の端へのアミノ酸の付加のみならず、配列中へのアミノ酸の挿入も含まれる。かかるアミノ酸の改変としては、例えば、(a)配列番号3で示さ

れるアミノ酸配列を有するタンパク質が細胞内で受けるプロセッシングによる欠失、(b)前記タンパク質が由来する生物の種差や個体差等により天然に生じる遺伝子変異によって生じるアミノ酸の欠失、置換または付加、または、(c)人為的に導入される遺伝子変異等により生じるアミノ酸の欠失、置換または付加を挙げることができる。

改変されるアミノ酸の数は、改変が生じた上記アミノ酸配列を有するタンパク質が、改変前のタンパク質と同様の能力、即ち2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を発揮することのできる範囲内の数であれば良い。

本発明ポリヌクレオチド(A)がコードするアミノ酸配列の(A3)または本発明タンパク質(A)のアミノ酸配列の(A3)における「複数のアミノ酸」としては、例えば、2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、30、35、40、45もしくは48個のアミノ酸が挙げられる。

アミノ酸の置換としては、例えば、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似したアミノ酸への保存的置換をあげることができる。このような置換としては、具体的には例えば、(1)グリシン、アラニン；(2)バリン、イソロイシン、ロイシン；(3)アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、(4)セリン、スレオニン；(5)リジン、アルギニン；(6)フェニルアラニン、チロシン等のグループ内での置換が挙げられる。

アミノ酸の付加としては、例えば、タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシ末端への、連続する6残基程度のヒスチジンを含む7残基程度から25残基程度のアミノ酸の付加を挙げることができる。より具体的には、タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端への、配列番号44で示されるアミノ酸配列の付加や、タンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ末端への、配列番号45で示されるアミノ酸配列の付加を挙げることができる。

[0023] 本発明ポリヌクレオチド(A)がコードするアミノ酸配列の(A2)または本発

明タンパク質(A)のアミノ酸配列の(A2)における「85%以上の配列同一性」としては、例えば85、90、95、98または99%以上の配列同一性が挙げられる。

[0024] 本発明ポリヌクレオチド(A)がコードするアミノ酸配列または本発明タンパク質(A)のアミノ酸配列において、「配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば「クローニングとシーケンス」(渡辺格監修、杉浦昌弘編集、1989年、農村文化社発行)等に記載されているサザンハイブリダイゼーション法において、(1)高イオン濃度下[例えば、6XSSC(900mMの塩化ナトリウム、90mMのクエン酸ナトリウム)]が挙げられる。]に、65℃でハイブリダイズさせることにより、配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドと塩基対合によるハイブリッドを形成し、(2)低イオン濃度下[例えば、0.1 X SSC(15mMの塩化ナトリウム、1.5mMのクエン酸ナトリウム)]が挙げられる。]に、65℃で30分間保温した後でも該ハイブリッドが維持されうるようなポリヌクレオチドをいう。

上記のポリヌクレオチドとしては、具体的には、配列番号4または13で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号4または13で示される塩基配列において、その一部の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するポリヌクレオチド、または、配列番号4または13で示される塩基配列と90%、95%、98%又は99%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドがあげられる。

[0025] 本発明ポリヌクレオチド(A)がコードするアミノ酸配列の(A5)または本発明タンパク質(A)のアミノ酸配列の(A5)の具体例を以下に挙げる：

(A5-1) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒド

ロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列V109Iと記すこともある。）；

(A5-2) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列G191Dと記すこともある。）；

(A5-3) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、246番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列Q246Rと記すこともある。）；

(A5-4) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換及び191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列V109I/G191Dと記すこともある。）；

(A5-5) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキ

シー４－（メチルチオ）酪酸誘導体を酸化して対応する２－オキソー４－（メチルチオ）酪酸誘導体に変換する能力と、 α －ヒドロキシ－イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α －オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列V109I/Q246Rと記すこともある。）；

(A5-6) i) 配列番号３で示されるアミノ酸配列において、１９１番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び２４６番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) ２－ヒドロキシ－４－（メチルチオ）酪酸誘導体を酸化して対応する２－オキソー４－（メチルチオ）酪酸誘導体に変換する能力と、 α －ヒドロキシ－イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α －オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列G191D/Q246Rと記すこともある。）；及び

(A5-7) i) 配列番号３で示されるアミノ酸配列において、１０９番目のバリンのイソロイシンへの置換、１９１番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び２４６番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列であって、かつ、ii) ２－ヒドロキシ－４－（メチルチオ）酪酸誘導体を酸化して対応する２－オキソー４－（メチルチオ）酪酸誘導体に変換する能力と、 α －ヒドロキシ－イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α －オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列（以下、改変アミノ酸配列V109I/G191D/Q246Rと記すこともある。）。

改変アミノ酸配列V109I/G191D/Q246Rの具体例としては、配列番号５で示されるアミノ酸配列を挙げることができる。配列番号５で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号６で示される塩基配列を挙げることができる。

[0026] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、自然界に存在するDNAの中からクローニングされたポリヌクレオチドであっても、このクローニングされたポリヌク

レオチドの塩基配列において、その一部の塩基の欠失、置換または付加が人為的に導入されてなるポリヌクレオチドであっても、化学合成されたポリヌクレオチドであってもよい。

[0027] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、例えば、 α -ヒドロキシカルボン酸を対応する α -オキソカルボン酸に酸化する能力を有する微生物、具体的には、アクロモバクター・デニトリフィカンス (*Achromobacter denitrificans*) ATCC 55564株などのアクロモバクター属に属する微生物から得ることができる。

例えば、アクロモバクター・デニトリフィカンス (*Achromobacter denitrificans*) 等のアクロモバクター属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法（例えば、「新 細胞工学実験プロトコル」（東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年）に記載された方法）に準じてDNAライブラリーを調製し、調製されたDNAライブラリーを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号4で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド等を増幅して本発明ポリヌクレオチド(A)を調製することができる。

上記のPCRに用いられるプライマーの5'末端側又は3'末端側又はその両方には、制限酵素認識配列等が付加されていてもよい。

[0028] 例えば、上記DNAライブラリーを鋳型として、かつ配列番号11で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号12で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行うことにより、配列番号4で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを増幅することができる。

上記のPCRの条件としては、例えば、4種類のdNTPを各々20 μ M、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々15 pmol、Taq polymeraseを1.3 U及び鋳型となるDNAライブラリーを混合した反

応液を94℃で2分間保温した後、94℃で10秒間次いで65℃で30秒間次いで72℃で90秒間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃で10秒間次いで65℃で30秒間次いで72℃で1分と5秒間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持する条件が挙げられる。

[0029] 上記DNAライブラリーを鋳型として配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（例えば、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'末端の約14塩基以上の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド）とDNAライブラリー構築に用いられたベクターのDNA挿入部位近傍の塩基配列に相補的な塩基配列からなる約14塩基以上のオリゴヌクレオチドとをプライマーとして用いてPCRを行うことによっても、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドや、配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド等を増幅して本発明ポリヌクレオチド(A)を調製することができる。

[0030] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、例えば、微生物またはファージ由来のベクターに挿入されたDNAライブラリーに、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有する約15塩基以上の塩基配列からなるDNAをプローブとして、上述の条件にてハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNAを検出することによっても取得することができる。

[0031] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、その塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984) 等の通常の方法に準じて、目的とする塩基配列を有する核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。

[0032] 上記(A1)から(A5)のいずれかのアミノ酸配列をコードするコドンとして、大腸菌におけるコドン使用頻度に合わせるようにコドンを選択することによって塩基配列を設計し、設計された塩基配列からなるポリヌクレオチド

を化学合成することにより、本発明ポリヌクレオチド(A)を調製することもできる。

具体的には例えば、発現させる微生物細胞（例えば、大腸菌）におけるコドン使用頻度に近いコドン使用頻度となるように、配列番号3で示されるアミノ酸配列に含まれる各々のアミノ酸に対応するコドンを選択し、目的とするアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。大腸菌等におけるコドン使用頻度の情報は、例えば、当業者に公知のDNAデータベース（GenBank、EMBL、DDBJ等）を利用して得ることができる。

[0033] 以下、具体的な手順を示す。

目的とするアミノ酸配列に含まれる各アミノ酸の個数を求める。ポリヌクレオチドを発現させる微生物細胞のコドンの平均出現頻度に最も近くなるように、上記で求めた個数のアミノ酸について使用するコドンを割り当てる。同一コドンがなるべく連続しないように、それぞれのコドンの使用順番をつける。N末端側のアミノ酸から順番に、各アミノ酸について決定した順番通りにコドンを選び、そのアミノ酸残基のコドンと仮決定する。これらの手順を繰り返しC末端までの全アミノ酸のコドンを仮決定し、最後に終止コドンを配置する。仮決定されたコドンからなる塩基配列について、微生物細胞において遺伝子の転写を阻害する塩基配列や、以降の操作で使用する制限酵素が認識する塩基配列が存在しないことを確認する。このような塩基配列が存在した場合には、この塩基配列にかかるコドンを別の部分で使用したコドンと交換する。このような塩基配列設計の際に、後の操作のために適当な制限酵素が認識する塩基配列を5'末端側および3'末端側に付加しておくことが好ましい。

このようにして設計された塩基配列を有するポリヌクレオチドの合成は、PCRを用いた長鎖DNA合成法を用いて行うことができる（細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ7「植物のPCR実験プロトコール」、95-100頁、島本巧・佐々木卓治監修秀潤社、1997年7月1日刊行）（以下、本法をAssembly PCR法と記すこともある）。当該方法では、長い合成オリゴヌクレオ

チドプライマーのみを使用してDNAを合成する。プライマーの対は、プライマーの各々の3'末端に約10bpから約12bpの相補鎖又はオーバーラップを持つように合成され、互いのプライマーを鋳型としてDNA合成を行う。プライマーの全長としては、例えば、約60merから約100mer等を挙げることができる。好ましくは、例えば、約80merから約100mer等が挙げられる。

これらオリゴヌクレオチドプライマーを順番にPCR反応により結合することにより、目的の塩基配列を有するDNAを得る。得られたDNAを常法に従いクローニングベクターに導入し、クローニングする。得られたクローンの塩基配列をDNAシーケンサーで確認し、目的の塩基配列を有するポリヌクレオチドが得られたことを確認する。このようにして、例えば、配列番号13で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを人工合成して、本発明ポリヌクレオチド(A)を得ることができる。

[0034] 本発明ポリヌクレオチド(B)は、下記(B1)から(B4)のいずれかのアミノ酸配列:

(B1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、

(B2) i) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) i) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号2で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；
をコードする。

本発明タンパク質(B)は、上記(B1)から(B4)のいずれかのアミノ酸配列を有する。

[0035] 本発明ポリヌクレオチド(B)がコードするアミノ酸配列または本発明タンパク質(B)のアミノ酸配列において、配列番号1で示されるアミノ酸配列との間に認められることのある相違は、一部のアミノ酸の欠失、置換または付加等（以下、総じてアミノ酸の改変と記すこともある。）である。前記「付加」には、配列の端へのアミノ酸の付加のみならず、配列中へのアミノ酸の挿入も含まれる。かかるアミノ酸の改変としては、例えば、(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が細胞内で受けるプロセッシングによる欠失、(b)前記タンパク質が由来する生物の種差や個体差等により天然に生じる遺伝子変異によって生じるアミノ酸の欠失、置換または付加、または、(c)人為的に導入される遺伝子変異等により生じるアミノ酸の欠失、置換または付加を挙げることができる。

改変されるアミノ酸の数は、改変が生じた上記アミノ酸配列を有するタンパク質が、改変前のタンパク質と同様の能力、即ち2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を発揮することのできる範囲内の数であれば良い。

本発明ポリヌクレオチド(B)がコードするアミノ酸配列の(B3)または本発

明タンパク質(B)のアミノ酸配列の (B3) における「複数のアミノ酸」としては、例えば、2、3、4、5、6、7、8、10、12、15、もしくは17個のアミノ酸が挙げられる。

アミノ酸の置換としては、例えば、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似したアミノ酸への保存的置換をあげることができる。このような置換としては、具体的には例えば、(1)グリシン、アラニン；(2)バリン、イソロイシン、ロイシン；(3)アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、(4)セリン、スレオニン；(5)リジン、アルギニン；(6)フェニルアラニン、チロシン等のグループ内での置換が挙げられる。

アミノ酸の付加としては、例えば、タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシ末端への、連続する6残基程度のヒスチジンを含む7残基程度から25残基程度のアミノ酸の付加を挙げることができる。より具体的には、タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端への、配列番号44で示されるアミノ酸配列の付加や、タンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ末端への、配列番号45で示されるアミノ酸配列の付加を挙げることができる。

[0036] 本発明ポリヌクレオチド(B)がコードするアミノ酸配列の (B2) または本発明タンパク質(B)のアミノ酸配列の (B2) における「95%以上の配列同一性」としては、例えば、95、98または99%以上の配列同一性が挙げられる。

[0037] 本発明ポリヌクレオチド(B)がコードするアミノ酸配列または本発明タンパク質(B)のアミノ酸配列において、「配列番号2で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば「クローニングとシーケンス」（渡辺格監修、杉浦昌弘編集、1989年、農村文化社発行）等に記載されているサザンハイブリダイゼーション法において、（1）高イオン濃度下〔例えば、6XSSC（900mMの塩化ナトリウム、90mMのクエン酸ナトリウム）が挙げられる。〕に、65℃でハイブリダイズさせることにより、配列番号2で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドと塩基対合によるハイブリ

ッドを形成し、(2) 低イオン濃度下〔例えば、0.1 X SSC (15mMの塩化ナトリウム、1.5mMのクエン酸ナトリウム) が挙げられる。〕に、65℃で30分間保温した後でも該ハイブリッドが維持されうるようなポリヌクレオチドをいう。

上記のポリヌクレオチドとしては、具体的には、配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号2で示される塩基配列において、その一部の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するポリヌクレオチド、または、配列番号2で示される塩基配列と95%、98%又は99%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドがあげられる。

[0038] 本発明ポリヌクレオチド(B)は、自然界に存在するDNAの中からクローニングされたポリヌクレオチドであっても、このクローニングされたポリヌクレオチドの塩基配列において、その一部の塩基の欠失、置換または付加が人為的に導入されてなるポリヌクレオチドであっても、化学合成されたポリヌクレオチドであってもよい。

[0039] 本発明ポリヌクレオチド(B)は、例えば、 α -ヒドロキシカルボン酸を対応する α -オキソカルボン酸に酸化する能力を有する微生物、具体的には、アクロモバクター・デニトリフィカンス (*Achromobacter denitrificans*) ATCC 55564株などのアクロモバクター属に属する微生物から得ることができる。

例えば、アクロモバクター・デニトリフィカンス (*Achromobacter denitrificans*) 等のアクロモバクター属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法 (例えば、「新 細胞工学実験プロトコル」(東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年) に記載された方法) に準じてDNAライブラリーを調製し、調製されたDNAライブラリーを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号2で示される塩基配列を

有するポリヌクレオチド等を増幅して本発明ポリヌクレオチド(B)を調製することができる。

上記のPCRに用いられるプライマーの5'末端側又は3'末端側又はその両方には、制限酵素認識配列等が付加されていてもよい。

[0040] 例えば、上記DNAライブラリーを鋳型として、かつ配列番号9に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号10に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行うことにより、配列番号2で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを増幅することができる。

上記のPCRの条件としては、例えば、4種類のdNTPを各々20 μ M、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々15 pmol、Taq polymeraseを1.3 U及び鋳型となるDNAライブラリーを混合した反応液を94°Cで2分間保温した後、94°Cで10秒間次いで65°Cで30秒間次いで72°Cで90秒間の保温サイクルを10回行い、次いで、94°Cで10秒間次いで65°Cで30秒間次いで72°Cで1分と5秒間の保温サイクルを20回行い、さらに72°Cで7分間保持する条件が挙げられる。

[0041] 上記DNAライブラリーを鋳型として配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'末端の約14塩基以上の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド）とDNAライブラリー構築に用いられたベクターのDNA挿入部位近傍の塩基配列に相補的な塩基配列からなる約14塩基以上のオリゴヌクレオチドとをプライマーとして用いてPCRを行うことによっても、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドや、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド等を増幅して本発明ポリヌクレオチド(B)を調製することができる。

[0042] 本発明ポリヌクレオチド(B)は、例えば、微生物またはファージ由来のベク

ターに挿入されたDNAライブラリーに、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有する約15塩基以上の塩基配列からなるDNAをプローブとして、上述の条件にてハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNAを検出することによっても取得することができる。

[0043] 本発明ポリヌクレオチド(B)は、その塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984) 等の通常の方法に準じて、目的とする塩基配列を有する核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。

[0044] 上記 (B1) から (B4) のいずれかのアミノ酸配列をコードするコドンとして、大腸菌におけるコドン使用頻度に合わせるようにコドンを選択することによって塩基配列を設計し、設計された塩基配列からなるポリヌクレオチドを化学合成することにより、本発明ポリヌクレオチド(B)を調製することもできる。

具体的には例えば、発現させる微生物細胞（例えば、大腸菌）におけるコドン使用頻度に近いコドン使用頻度となるように、配列番号1で示されるアミノ酸配列に含まれる各々のアミノ酸に対応するコドンを選択し、目的とするアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。

[0045] 上述のようにして調製されたポリヌクレオチドは「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」 (1989) , Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」 (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングすることができる。

上述のようにして調製されたポリヌクレオチドの塩基配列は、F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson 著、Proceeding of Natural Academy of Science U.S.A. (1977) 74: 5463-5467 頁等に記載されているダイデオキシターミネーター法等により解析することができる。塩基配列分析用の試料調製には、例えば、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kit等の市販の試薬を用いてもよい。

[0046] 上述のようにして調製されたポリヌクレオチドが、 α -ヒドロキシカルボン酸（例えば、2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸又は α -ヒドロキシイソカプロン酸）を酸化して対応する α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸又は α -オキソイソカプロン酸）に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードしていることの確認は、例えば、以下のようにして行うことができる。

上述のようにして得られるポリヌクレオチドを、宿主細胞において機能可能なプロモーターの下流に接続されるようにベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。得られた形質転換体の培養物を α -ヒドロキシカルボン酸（例えば、2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸又は α -ヒドロキシイソカプロン酸）に作用させる。反応生成物中の対応する α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸又は α -オキソイソカプロン酸）の量を分析することにより、得られたポリヌクレオチドが目的とする能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードすることが確認できる。

[0047] 本発明ポリヌクレオチド(A)又は本発明ポリヌクレオチド(B)を宿主細胞で発現させるには、例えば、宿主細胞で機能可能なプロモーターと、本発明ポリヌクレオチド(A)又は本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドを調製し、これを宿主細胞に導入する。

微生物で機能可能なプロモーターとしては、上述のような、大腸菌内で機能可能な合成プロモーター等をあげることができる。アクロモバクター・デニトリフィカンスにおいて本発明ポリヌクレオチド(A)又は本発明ポリヌクレオチド(B)の発現を制御しているプロモーターを利用してもよい。

[0048] 本発明ポリヌクレオチド(A)、又は、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドをベクターに組み込むことにより、本発明組換えベクター(A)を作製することができる。

本発明ポリヌクレオチド(B)、又は、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドをベクターに組み込むことにより、本発明組換えベクター(B)を作製することができる。

i) 本発明ポリヌクレオチド(A)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；と、

ii) 本発明ポリヌクレオチド(B)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；とをベクターに組み込むことにより、本発明組換えベクター(AB)を作製することができる。

[0049] 本発明組換えベクター(AB)は、 α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質（以下、本タンパク質(C)と記すこともある。）のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドをさらに含有することもできる。

例えば、

a) 本発明ポリヌクレオチド(A)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；と、

b) 本発明ポリヌクレオチド(B)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

と、

c) 本タンパク質(C)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

とをベクターに組み込むことにより、本発明組換えベクター(ABC)を作製することができる。

[0050] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質としては、アミノ酸脱水素酵素やアミノトランスフェラーゼが挙げられる。アミノ酸脱水素酵素としては、具体的には、アラニン脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、ロイシン脱水素酵素及びフェニルアラニン脱水素酵素を挙げることができ、ロイシン脱水素酵素を好ましく挙げることができる。

α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有する上記タンパク質として、より具体的には、Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 23 (2003) 239-247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素、及び、前記ロイシン脱水素酵素のアミノ酸配列において、113番目のアラニンがグリシンに変換されたアミノ酸配列を有するタンパク質を挙げることができる。

配列番号42で示されるアミノ酸配列は、Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 23 (2003) 239-247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素のアミノ酸配列である。

配列番号7で示されるアミノ酸配列は、配列番号42で示されるアミノ酸配列において、113番目のアラニンがグリシンに変換されたアミノ酸配列である。

[0051] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列としては、具体的には、下記(C1)から(C3)のいずれかのアミノ酸配列：

(C1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(C2) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(C3) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；
を挙げることができる。

[0052] 本タンパク質(C)の上記アミノ酸配列において、配列番号7で示されるアミノ酸配列との間に認められることのある相違は、一部のアミノ酸の欠失、置換または付加等である。前記「付加」には、配列の端へのアミノ酸の付加のみならず、配列中へのアミノ酸の挿入も含まれる。かかるアミノ酸の改変としては、例えば、(a)配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が細胞内で受けるプロセッシングによる欠失、(b)前記タンパク質が由来する生物の種差や個体差等により天然に生じる遺伝子変異によって生じるアミノ酸の欠失、置換または付加、または、(c)人為的に導入される遺伝子変異等により生じるアミノ酸の欠失、置換または付加を挙げることができる。

改変されるアミノ酸の数は、改変が生じた上記アミノ酸配列を有するタンパク質が、 α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を発揮することのできる範囲内の数であれば良い。本タンパク質(C)の上記アミノ酸配列の(C3)における「複数のアミノ酸」としては、例えば、2、3、4、5、6、7、10、15、18、20、25、30、35、36もしくは40個のアミノ酸が挙げられる。

アミノ酸の置換としては、例えば、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似したアミノ酸への保存的置換をあげることができる。このような置換としては、具体的には例えば、(1)グリシン、アラニン；(2)バリン、イソロイシン、ロイシン；(3)アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、(4)セリン、スレオニン；(5)リジン、アルギニン；(6)フェニルアラニン、チロシン等のグループ内での置換が挙げられる。

アミノ酸の付加としては、例えば、アミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシ末端への、連続する6残基程度のヒスチジンを含む約20残基のアミノ酸

の付加を挙げることができる。より具体的には、タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端への、配列番号44で示されるアミノ酸配列の付加や、タンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ末端への、配列番号45で示されるアミノ酸配列の付加を挙げることができる。

本タンパク質(C)の上記アミノ酸配列の(C2)における「90%以上の配列同一性」としては、例えば90、95、98または99%以上の配列同一性が挙げられる。

[0053] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド（以下、本ポリヌクレオチド(C)と記すこともある。）は、例えば、 α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有する微生物、例えば、*Bacillus sphaericus* IF03525株などのバシラス属に属する微生物から得ることができる。

[0054] *Bacillus sphaericus* IF03525株などのバシラス属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法に準じてDNAライブラリーを調製し、調製されたDNAライブラリーを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号42で示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、又は、配列番号42で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド等を増幅して本ポリヌクレオチド(C)を調製することができる。

例えば、配列番号42で示されるアミノ酸配列をコードする、配列番号43で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドの増幅用プライマーとして、配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号15に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成する。配列番号42で示されるアミノ酸配列の113番目のアラニンをグリシンに変換するための変異導入用プライマーとして、配列番号16で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号17で示される塩基配列を有するオリゴ

ヌクレオチドを合成する。

上記DNAライブラリーを鋳型として、配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行うことにより、配列番号43で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを増幅する。増幅されたポリヌクレオチドをベクターに組み込んで、配列番号43で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有する組換えベクターを得る。得られた組換えベクターを鋳型として、配列番号16で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号17で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行い、得られたPCR産物をDpn Iで処理した後、大腸菌に導入する。得られた形質転換体が保有する組換えベクターの塩基配列を分析し、目的のアミノ酸変異が導入されたアミノ酸配列、すなわち、配列番号42で示されるアミノ酸配列において113番目のアラニンがグリシンへ置換されたアミノ酸配列（配列番号7で示されるアミノ酸配列）、をコードするポリヌクレオチドを得る。配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号8で示される塩基配列が挙げられる。

[0055] 本ポリヌクレオチド(C)は、その塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984) 等の通常の方法に準じて、目的とする塩基配列を有する核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。

上記(C1)から(C3)のいずれかのアミノ酸配列をコードするコドンとして、大腸菌におけるコドン使用頻度に合わせるようにコドンを選択することによって塩基配列を設計し、設計された塩基配列からなるポリヌクレオチドを化学合成することにより、本ポリヌクレオチド(C)を調製することもできる。

[0056] 本ポリヌクレオチド(C)を宿主細胞で発現させるには、例えば、宿主細胞で機能可能なプロモーターと本ポリヌクレオチド(C)とが機能可能な形で接続さ

れてなるポリヌクレオチドを調製し、これを宿主細胞に導入する。

微生物で機能可能なプロモーターとしては、上述のような、大腸菌内で機能可能な合成プロモーター等をあげることができる。Bacillus sphaericusなどのバシラス属に属する微生物において本ポリヌクレオチド(C)の発現を制御しているプロモーターを利用してもよい。

[0057] 上述のようにして調製されたポリヌクレオチドが、 α -オキソカルボン酸化合物（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸又は α -オキソ-イソカプロン酸）をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物（例えば、L-メチオニン又はL-ロイシン）に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードしていることの確認は、例えば、以下のようにして行うことができる。

上述のようにして得られるポリヌクレオチドを、宿主細胞において機能可能なプロモーターの下流に接続されるようにベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。得られた形質転換体の培養物を α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸又は α -オキソ-イソカプロン酸）に作用させる。反応生成物中の対応するL- α -アミノ酸（例えば、L-メチオニン又はL-ロイシン）の量を分析することにより、得られたポリヌクレオチドが目的とする能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードすることが確認できる。

[0058] 本発明ポリヌクレオチド(A)、本発明ポリヌクレオチド(B)もしくは本ポリヌクレオチド(C)、または、これらポリヌクレオチドの1以上を含有する組換えベクターを宿主細胞に導入することにより、形質転換体を製造することができる。

宿主細胞としては、例えば、Escherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、Staphylococcus属、Streptomyces属、Saccharomyces属、Kluyveromyces属、Pichia属、Rhodococcus属及びAspergillus属に属する微生物等があげられる。

[0059] 上述のようにして、本発明ポリヌクレオチド(A)、又は、宿主細胞内におい

て機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することにより、本発明ポリヌクレオチド(A)、又は、宿主細胞内において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドを保有する形質転換体を得ることができる。かかる形質転換体としては、外来の上記ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体、すなわち、外来の上記ポリヌクレオチドを染色体上に保有する形質転換体を挙げることもできる。

本発明ポリヌクレオチド(B)、又は、宿主細胞内において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することにより、本発明ポリヌクレオチド(B)、又は、宿主細胞内において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドを保有する形質転換体を得ることができる。かかる形質転換体としては、外来の上記ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体、すなわち、外来の上記ポリヌクレオチドを染色体上に保有する形質転換体を挙げることもできる。

[0060] 上述のようにして、

a) 本発明ポリヌクレオチド(A)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；と、

b) 本発明ポリヌクレオチド(B)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

と、

c) 本タンパク質(C)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

とを宿主細胞に導入することにより、

a) 本発明ポリヌクレオチド(A)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(A)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；と、

b) 本発明ポリヌクレオチド(B)、もしくは、宿主細胞において機能可能なプロモーターと本発明ポリヌクレオチド(B)とが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

と、

c) 本タンパク質(C)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド；

とを保有する形質転換体を得ることができる。

上記 a) のポリヌクレオチド、 b) のポリヌクレオチド及び c) のポリヌクレオチドは、それぞれ別のベクターに組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよいし、これらのうち 1 以上が同じベクター上に組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよい。1 以上のポリヌクレオチドを単一のベクターに組み込む場合は、例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域を目的とするポリヌクレオチドのそれぞれに連結してベクターに組み込んでよいし、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして目的とするポリヌクレオチドを発現させるようにベクターに組み込んでよい。上記 a) のポリヌクレオチド、 b) のポリヌクレオチド及び c) のポリヌクレオチドのいずれか、又は、これらのうち 1 以上が、宿主細胞の染色体上に保有されてもよい。

[0061] 本発明タンパク質(A)は、例えば、本発明ポリヌクレオチド(A)を保有する形質転換体を培養し本発明タンパク質(A)を発現させることにより、製造することができる。

本発明タンパク質(B)は、例えば、本発明ポリヌクレオチド(B)を保有する形質転換体を培養し本発明タンパク質(B)を発現させることにより、製造する

ことができる。

本タンパク質(C)は、例えば、本ポリヌクレオチド(C)を保有する形質転換体を培養し本タンパク質(C)を発現させることにより、製造することができる。

本発明ポリヌクレオチド(A)、本発明ポリヌクレオチド(B)又は本ポリヌクレオチド(C)を保有する形質転換体の培養物から本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)又は本タンパク質(C)を精製する方法としては、タンパク質の精製において使用される通常の方法を適用することができる。

本発明タンパク質(A)を含む画分及び本発明タンパク質(B)を含む画分は、例えば、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸を酸化して2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸を優先的に生産する能力又は α -ヒドロキシイソカプロン酸を酸化して α -オキソイソカプロン酸を優先的に生産する能力を指標にして選抜することができる。

本タンパク質(C)を含む画分は、例えば、2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸をアミノ化してL-メチオニンを優先的に生産する能力又は α -オキソイソカプロン酸をアミノ化してL-ロイシンを優先的に生産する能力を指標にして選抜することができる。

[0062] 本発明製造方法は、

(1) 本発明タンパク質(A)と本発明タンパク質(B)とのいずれか又は両者を、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させて、対応する α -オキソカルボン酸化合物を得る工程、及び

(2) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質を、工程(1)で得られた α -オキソカルボン酸化合物に作用させて、対応するL- α -アミノ酸化合物を得る工程、

を含む、L- α -アミノ酸化合物の製造方法である。

[0063] 上記 α -ヒドロキシカルボン酸化合物としては、式(4)：



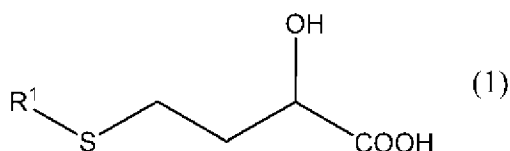
式中、 R^2 は水素であるか、炭素数1－10の線状、分岐鎖状もしくは環式のアルキル基であるか、置換基のアミド、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、モノアルキルアミド、ジアルキルアミド、アルコキシ、アルキルチオ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシルもしくはアルコキシカルボニルを有する炭素数1－10の線状もしくは分岐鎖状のアルキル基であるか、または、1H-イミダゾリル基、フェニル基、3'-インドリル基、p-ヒドロキシフェニル基もしくはp-アルコキシフェニル基であり、前記置換基に含まれるアルキル及びアルコキシの炭素数はそれぞれ1－3である；
で示される α -ヒドロキシカルボン酸が挙げられる。

上記L- α -アミノ酸化合物としては、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-アラニン、グリシン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン及びL-バリンが挙げられ、好ましくは、L-アラニン、グリシン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニンまたはL-バリンが挙げられる。

[0064] 上記 α -ヒドロキシカルボン酸化合物として、好ましくは、 α -ヒドロキシイソカプロン酸をあげることができ、対応する α -オキソカルボン酸化合物としては、 α -オキソイソカプロン酸を挙げることができ、対応するL- α -アミノ酸化合物としては、L-ロイシンを挙げることができる。

[0065] 上記 α -ヒドロキシカルボン酸化合物として、好ましくは、含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物を挙げることでもでき、対応する α -オキソカルボン酸化合物としては、含硫 α -オキソカルボン酸化合物を挙げることができ、対応するL- α -アミノ酸化合物としては、含硫L- α -アミノ酸化合物を挙げることができる。

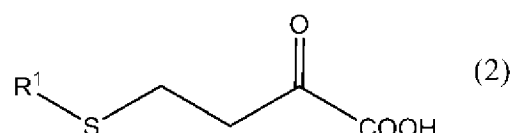
上記含硫 α -ヒドロキシカルボン酸としては、式(1)：



式中、 R^1 は水素又は置換されていてもよい炭素数1－8のアルキル基を表す；

で示される含硫 α －ヒドロキシカルボン酸が例示される。

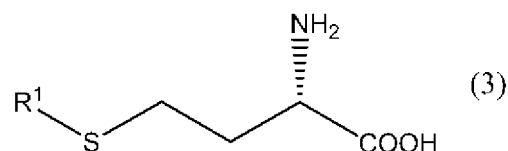
上記式（1）で示される含硫 α －ヒドロキシカルボン酸に、本発明タンパク質(A)と本発明タンパク質(B)とのいずれか又は両者を作用させて得られる含硫 α －オキソカルボン酸化合物としては、式（2）：



式中、 R^1 は前記と同じ意味を表す；

で示される含硫 α －オキソカルボン酸が例示される。

上記式（2）で示される含硫 α －オキソカルボン酸に、本タンパク質(C)を作用させて得られる含硫L－ α －アミノ酸化合物としては、式（3）：



で示される含硫L－ α －アミノ酸が例示される。

[0066] 式（1）の含硫 α －ヒドロキシカルボン酸、式（2）の含硫 α －オキソカルボン酸、および、式（3）の含硫L－ α －アミノ酸において、 R^1 で表される置換されていてもよいC1－8のアルキル基におけるC1－8のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基およびオクチル基が例示される。

式（1）で示される含硫 α －ヒドロキシカルボン酸としては、具体的には例えば、2－ヒドロキシ－4－（メチルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（エチルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（プロピルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（ブチルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（ペンチルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（ヘキシルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（ヘプチルチオ）酪酸、2－ヒドロキシ－4－（オクチルチオ）酪酸を挙

げることができる。

式(2)で示される含硫 α -オキソカルボン酸としては、具体的には例えば、2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(エチルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(プロピルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(ブチルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(ペンチルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(ヘキシルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(ヘプチルチオ)酪酸、2-オキソ-4-(オクチルチオ)酪酸を挙げることができる。

式(3)で示される含硫L- α -アミノ酸としては、具体的には例えば、2-アミノ-4-(メチルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(エチルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(プロピルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(ブチルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(ペンチルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(ヘキシルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(ヘプチルチオ)酪酸、2-アミノ-4-(オクチルチオ)酪酸を挙げることができる。

[0067] R^1 で表される置換されていてもよいC1-8のアルキル基としては、メチル基が好ましく、式(1)で示される含硫 α -ヒドロキシカルボン酸としては、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸が好ましく例示される。

[0068] 本発明製造方法の工程(1)において、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸を基質とした場合は、工程(1)において α -オキソイソカプロン酸が得られ、工程(2)においてL-ロイシンが得られる。

本発明製造方法の工程(1)において、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸を基質とした場合は、工程(1)において2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸が得られ、工程(2)においてL-メチオニンが得られる。

[0069] 本発明製造方法の工程(1)において、本発明タンパク質(A)及び本発明タンパク質(B)はそれぞれ、種々の形態で、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるための反応系に提供され得る。本発明タンパク質(A)及び本発明タンパク質(B)はそれぞれ、精製されたタンパク質の形態で本発明製造方法の工程(1)の反応系に提供されてもよいし、当該タンパク質を産生する微生物又は該微生物の処理物に含まれる形態で前記反応系に提供されてもよい。「

微生物の処理物」とは、上述の「形質転換体の処理物」と同様に調製されたものを意味する。本発明タンパク質(A)及び本発明タンパク質(B)はそれぞれ、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で上記反応系に提供されてもよい。

本発明タンパク質(A)を α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるために、具体的には、例えば、本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(A)の固定化物、本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなり本発明タンパク質(A)を産生する形質転換体の培養物、又は、前記形質転換体の処理物を、本発明製造方法の工程(1)の反応系に提供することができる。

本発明タンパク質(B)を α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるために、具体的には、例えば、本発明タンパク質(B)、本発明タンパク質(B)の固定化物、本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなり本発明タンパク質(B)を産生する形質転換体の培養物、又は、前記形質転換体の処理物を、本発明製造方法の工程(1)の反応系に提供することができる。

本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物と、本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物とが、本発明製造方法の工程(1)の反応系に提供されてもよい。本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドと本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドとの両者が同一の宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が、上記反応系に提供されてもよい。本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドと本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ別のベクターに組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよいし、同じベクター上に組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよい。両ポリヌクレオチドを単一のベクターに組み込む場合は、例えば、プロモーター、ター

ミネーター等の発現制御に関わる領域を両ポリヌクレオチドのそれぞれに連結してベクターに組み込んでもよいし、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして両ポリヌクレオチドを発現させるようにベクターに組み込んでもよい。本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドと本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドのいずれか、又は、両方が、宿主細胞の染色体上に保有されてもよい。

[0070] 本発明製造方法の工程(1)は、通常、水及び酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下、 NAD^+ と記すこともある。)等の補酵素の存在下に行われる。この際に用いられる水は、緩衝水溶液であってもよい。該緩衝水溶液に用いられる緩衝剤としては、例えば、トリスヒドロキシメチルアミノメタンや、リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウム等の酢酸アルカリ金属塩、又は、これらの混合物が挙げられる。

[0071] 本発明製造方法の工程(1)においては、水に加えて有機溶媒を反応系に共存させることもできる。用いられる有機溶媒としては、例えば、*t*-ブチルメチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル類；ギ酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル等のエステル類；トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、イソオクタン等の炭化水素類；メタノール、エタノール、2-プロパノール、ブタノール、*t*-ブチルアルコール等のアルコール類；ジメチルスルホキシド等の有機硫黄化合物、アセトン等のケトン類、アセトニトリル等のニトリル類、及びこれらの混合物が挙げられる。

[0072] 本発明製造方法の工程(1)においては、共役系として補因子(*cofactor*)が利用されるため、通常、反応系に補酵素(*coenzyme*)を添加するとよい。添加される補酵素としては、例えば、酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)や、酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸(以下、 NADP^+ と記すこともある。)を挙げることができる。反応系内における補因子の量は、通常、基質である

α -ヒドロキシカルボン酸化合物の量と等モルかまたはそれ以上であり、反応開始時に添加しておくのが好ましい。

本発明製造方法の工程（１）において、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物（例えば、２-ヒドロキシー４-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸又は α -ヒドロキシーイソカプロン酸）の酸化反応の進行に伴い、反応液中の NAD^+ は還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下、 NADH と記すこともある。）に変換される。変換により生じた NADH は、 NADH を酸化型（ NAD^+ ）に変換する能力を有するタンパク質を作用させることにより元の NAD^+ に戻すことができるので、上記工程（１）の反応系内には、 NADH を NAD^+ に変換する能力を有するタンパク質をさらに存在させてもよい。上記工程（１）の反応系内に、 NADH を NAD^+ に変換する能力を有するタンパク質をさらに存在させる場合には、反応系内における補因子の量は、通常、触媒量でよく、基質である α -ヒドロキシカルボン酸化合物の量と等モルかまたはそれ以下である。

NADH を NAD^+ に変換する能力を有するタンパク質としては、例えば、リンゴ酸脱水素酵素等の有機酸脱水素酵素、還元酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、又は、 NADH 酸化酵素が挙げられる。アミノ酸脱水素酵素としては、本タンパク質（C）を挙げることができる。より具体的には、*Bacillus*属に属する微生物のロイシン脱水素酵素を挙げることができる。

NADH を NAD^+ に変換する能力を有するタンパク質が NADH 酸化酵素である場合には、反応系内に FAD 等を共存させることにより、該タンパク質の活性が増強される場合もあり、例えば、反応液に FAD 等を加えてもよい。 NADH を NAD^+ に変換する能力を有するタンパク質が NADH 酸化酵素である場合には、反応液中の酸素が消費され、過酸化水素に変換される。変換により生じた過酸化水素は、過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質により元の分子状酸素に戻すことができるので、上記工程の反応系内に、過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をさらに共存させ

てもよい。過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質としては、例えば、カタラーゼが挙げられる。

[0073] NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質や過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質はそれぞれ、精製されたタンパク質もしくはその固定化物の形態で本発明製造方法の工程（１）の反応系に提供されてもよいし、当該タンパク質を産生する微生物又は該微生物の処理物に含まれる形態で前記反応系に提供されてもよい。「微生物の処理物」とは、上述の「形質転換体の処理物」と同様に調製されたものを意味する。例えば、NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が上記反応系に提供されてもよい。過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が上記反応系にさらに提供されてもよい。

NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物と、過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物とが、上記反応系に提供されてもよい。

NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドと過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの両者が同一の宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が、上記反応系に提供されてもよい。NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドと過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ別のベクターに組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよいし、同じベクター上に組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよい。両ポリヌクレオチドを単一のベクターに組み込む場合は、例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域を両ポリヌクレオチドのそ

れぞれに連結してベクターに組み込んでもよいし、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして両ポリヌクレオチドを発現させるようにベクターに組み込んでもよい。NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドと過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドのいずれか、又は、両方が、宿主細胞の染色体上に保有されてもよい。

本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチド、本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチド、NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び、過酸化水素を分子状酸素に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドからなる群から選ばれる2以上のポリヌクレオチドが同一の宿主細胞に導入される形質転換体又はその処理物が、上記反応系に提供されてもよい。

[0074] 本発明製造方法の工程(1)における反応は、例えば、水、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物(例えば、2-ヒドロキシー4-(メチルチオ)酪酸等の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物又は α -ヒドロキシーイソカプロン酸)及びNAD⁺を、本発明タンパク質(A)と本発明タンパク質(B)とのいずれかもしくは両者又はそれらを産生する形質転換体又はそれらの処理物とともに、必要によりさらに有機溶媒やカタラーゼ等を含有する反応液を、攪拌、振盪等により混合することにより行われる。

[0075] 上記方法における反応時のpHは適宜選択することができ、通常pH約3から約10の範囲である。反応温度は適宜選択することができ、原料及び生成物の安定性、反応速度の点から通常約0℃から約60℃の範囲である。

[0076] α -ヒドロキシカルボン酸化合物(例えば、2-ヒドロキシー4-(メチルチオ)酪酸等の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸又は α -ヒドロキシーイソカプロン酸)の酸化反応の進行に伴い、反応液中のNAD⁺はNADHに変換される。よって、上記工程(1)の反応系内に、NADHをNAD⁺に変換する能力を有するタンパク質が含まれない場合には、例えば、反応液中のNADHの単位時間当たりの増加量、即ち、増加速度を測定することにより、前

記酸化反応の進行をモニターすることができる。

反応の終点は、例えば、反応液中の α -ヒドロキシカルボン酸化合物（例えば、2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物又は α -ヒドロキシーイソカプロン酸）の量を液体クロマトグラフィー等により分析することにより決めることができる。

反応時間は適宜選択することができ、通常約0.5時間から約10日間の範囲である。

[0077] 反応液からの α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸化合物又は α -オキソイソカプロン酸）の回収は、一般に知られている任意の方法で行えばよい。

例えば、反応液の有機溶媒抽出操作、濃縮操作等の後処理を、必要によりカラムクロマトグラフィー、蒸留等と組み合わせて行うことにより、目的とする化合物を精製する方法が挙げられる。

[0078] 本発明製造方法の工程（1）で得られた α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸化合物又は α -オキソイソカプロン酸）を、反応液から精製または部分精製した後、工程（2）に供することができる。工程（1）の反応液を工程（2）の反応液に添加することにより、工程（1）で得られた α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸化合物又は α -オキソイソカプロン酸）を工程（2）に供することもできる。

[0079] 本発明製造方法の工程（2）において、本タンパク質(C)は、種々の形態で、 α -オキソカルボン酸化合物に作用させるための反応系に提供され得る。本タンパク質(C)は、精製されたタンパク質の形態で上記工程（2）の反応系に提供されてもよいし、当該タンパク質を産生する微生物又は該微生物の処理物に含まれる形態で前記反応系に提供されてもよい。「微生物の処理物」とは、上述の「形質転換体の処理物」と同様に調製されたものを意味する。本タンパク質(C)は、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細

胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で上記反応系に提供されてもよい。

本タンパク質(C)を α -オキソカルボン酸化合物に作用させるために、具体的には、例えば、本タンパク質(C)、本タンパク質(C)の固定化物、本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなり本タンパク質(C)を産生する形質転換体の培養物、又は、前記形質転換体の処理物を、上記工程(2)の反応系に提供することができる。

[0080] 本発明製造方法の工程(2)は、通常、水、アンモニウムイオン及びNADH等の補酵素の存在下に行われる。

この際に用いられる水は、緩衝水溶液であってもよい。該緩衝水溶液に用いられる緩衝剤としては、例えば、トリスヒドロキシメチルアミノメタンや、リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウム等の酢酸アルカリ金属塩、又は、これらの混合物が挙げられる。

本発明製造方法の工程(2)においては、水に加えて有機溶媒を反応系に共存させることもできる。用いられる有機溶媒としては、例えば、*t*-ブチルメチルエーテル、ジイソプロプルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル類；ギ酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル等のエステル類；トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、イソオクタン等の炭化水素類；メタノール、エタノール、2-プロパノール、ブタノール、*t*-ブチルアルコール等のアルコール類；ジメチルスルホキシド等の有機硫黄化合物、アセトン等のケトン類、アセトニトリル等のニトリル類、及びこれらの混合物が挙げられる。

[0081] 本発明製造方法の工程(2)においては、アミノ基供与体としてアンモニウムイオンが利用されるため、通常、反応系にアンモニウム塩化合物が添加される。添加されるアンモニウム塩化合物としては、例えば、硫酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム

等を挙げることができる。反応系内におけるアンモニウムイオンの量は、通常、基質である α -オキソカルボン酸化合物の量と等モルかまたはそれ以上であり、反応開始時に添加しておくのが好ましい。

[0082] 本発明製造方法の工程（２）においては、共役系として補因子（c o f a c t o r）が利用されるため、通常、反応系に補酵素（c o e n z y m e）を添加するとよい。添加される補酵素としては、例えば、還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドや、還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（以下、N A D P Hと記すこともある。）を挙げることができる。反応系内における補因子の量は、通常、基質である α -オキソカルボン酸化合物の量と等モルかまたはそれ以上であり、反応開始時に添加しておくのが好ましい。

[0083] 本発明製造方法の工程（２）において、 α -オキソカルボン酸（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸又は α -オキソ-イソカプロン酸）の還元的アミノ化反応の進行に伴い、反応液中のN A D Hは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（N A D⁺）に変換される。変換により生じたN A D⁺は、N A D⁺を還元型（N A D H）に変換する能力を有するタンパク質を作用させることにより元のN A D Hに戻すことができるので、上記工程（２）の反応系内には、N A D⁺をN A D Hに変換する能力を有するタンパク質をさらに存在させてもよい。上記工程（２）の反応系内に、N A D⁺をN A D Hに変換する能力を有するタンパク質をさらに存在させる場合には、反応系内における補因子の量は、通常、触媒量でよく、基質である α -オキソカルボン酸化合物の量と等モルかまたはそれ以下である。

N A D⁺をN A D Hに変換する能力を有するタンパク質としては、例えば、蟻酸脱水素酵素やリンゴ酸脱水素酵素等の有機酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、又は、アミノ酸脱水素酵素が挙げられる。

[0084] N A D⁺をN A D Hに変換する能力を有するタンパク質は、精製されたタン

パク質もしくはその固定化物の形態で本発明製造方法の工程（２）の反応系に提供されてもよいし、当該タンパク質を産生する微生物又は該微生物の処理物に含まれる形態で前記反応系に提供されてもよい。「微生物の処理物」とは、上述の「形質転換体の処理物」と同様に調製されたものを意味する。 NAD^+ を NADH に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が上記反応系に提供されてもよい。

[0085] 本発明製造方法の工程（２）において、本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物と、 NAD^+ を NADH に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物とが、 α -オキソカルボン酸化合物に作用させるための反応系に提供されてもよい。

本発明製造方法の工程（２）において、本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドと NAD^+ を NADH に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの両者が同一の宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が、前記反応系に提供されてもよい。本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドと NAD^+ を NADH に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ別のベクターに組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよいし、同じベクター上に組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよい。両ポリヌクレオチドを単一のベクターに組み込む場合は、例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域を両ポリヌクレオチドのそれぞれに連結してベクターに組み込んでもよいし、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして両ポリヌクレオチドを発現させるようにベクターに組み込んでもよい。本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドと NAD^+ を NADH に変換する能力を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドのいずれか、又は、両方が、宿主細胞の染色体上に保有されてもよい。

[0086] 本発明製造方法の工程（２）における反応は、例えば、水、アンモニウム

塩化合物、NADH、 α -オキソカルボン酸化合物（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸化合物又は α -オキソ-イソカプロン酸）、本タンパク質(C)又はそれを産生する形質転換体若しくはその処理物とともに、必要によりさらに有機溶媒やNAD⁺をNADHに変換する能力を有するタンパク質等を含有する反応液を、攪拌、振盪等により混合することにより行われる。

[0087] 上記方法における反応時のpHは適宜選択することができ、通常pH約3から約10の範囲である。反応温度は適宜選択することができ、原料及び生成物の安定性、反応速度の点から通常約0℃から約60℃の範囲である。

[0088] 反応の終点は、例えば、反応液中の α -オキソカルボン酸化合物（例えば、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸化合物又は α -オキソ-イソカプロン酸）の量を液体クロマトグラフィー等により分析することにより決めることができる。

反応時間は適宜選択することができ、通常約0.5時間から約10日間の範囲である。

[0089] 反応液からのL- α -アミノ酸（例えば、L-メチオニン等の含硫L- α -アミノ酸又はL-ロイシン）の回収は、一般に知られている任意の方法で行えばよい。

例えば、反応液のろ過、晶析、有機溶媒抽出操作、濃縮操作等の後処理を、必要によりカラムクロマトグラフィー、蒸留等と組み合わせて行うことにより、目的とする化合物を精製する方法が挙げられる。

[0090] 本発明製造方法の工程（1）と工程（2）とを、一つの反応系で行うこともできる。

この場合、本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)は、それぞれ種々の形態で上記反応系に提供され得る。

本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)は、精製されたタンパク質の形態で上記反応系に提供されてもよいし、これらタンパク質を産生する微生物又は該微生物の処理物に含まれる形態で上記反応系に

提供されてもよい。

本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)は、これらタンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で上記反応系に提供されてもよい。

例えば、本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物と、本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物とのいずれか又は両者と、本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物とが、上記反応系に提供されてもよい。本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドと本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドとのいずれか又は両者と、本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドとが同一の宿主細胞に導入されてなる形質転換体又はその処理物が、上記反応系に提供されてもよい。本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドと本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドとのいずれか又は両者と、本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ別のベクターに組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよいし、同じベクター上に組み込まれて宿主細胞へ導入されてもよい。複数のポリヌクレオチドを単一のベクターに組み込む場合は、例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域を上記ポリヌクレオチドのそれぞれに連結してベクターに組み込んでもよいし、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして上記ポリヌクレオチドを発現させるようにベクターに組み込んでもよい。本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチド、本発明タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチド及び本タンパク質(C)をコードするポリヌクレオチドのいずれか、又は、2以上が、宿主細胞の染色体上に保有されてもよい。

[0091] 本発明製造方法の工程(1)と工程(2)とを一つの反応系で行う場合の反応は、上述の本発明製造方法の工程(2)の反応に準じた反応液及び反応

条件にて行うことができる。

工程（１）における α -ヒドロキシカルボン酸化合物（例えば、２-ヒドロキシー-４-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸又は α -ヒドロキシーイソカプロン酸）の酸化反応の進行に伴い、反応液中の NAD^+ は NADH に変換される。工程（２）における α -オキソカルボン酸（例えば、２-オキソ-４-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -オキソカルボン酸又は α -オキソイソカプロン酸）の還元的アミノ化反応の進行に伴い、反応液中の NADH は NAD^+ に変換される。よって、本発明製造方法の工程（１）と工程（２）とを一つの反応系で行うと、補酵素（ NAD^+ 及び NADH ）を触媒量にてリサイクルすることができる。

反応の終点は、例えば、反応液中の α -ヒドロキシカルボン酸化合物（例えば、２-ヒドロキシー-４-（メチルチオ）酪酸等の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物又は α -ヒドロキシーイソカプロン酸）の量を液体クロマトグラフィー等により分析することにより決めることができる。

反応時間は適宜選択することができ、通常約０．５時間から約１０日間の範囲である。

反応液からの $\text{L-}\alpha$ -アミノ酸（例えば、 L- メチオニン等の含硫 $\text{L-}\alpha$ -アミノ酸又は L- ロイシン）の回収は、上述の本発明製造方法の工程（２）の場合と同様に行うことができる。

実施例

[0092] 以下、実施例等により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はそれらの実施例によって限定されるものではない。

[0093] 参考例１（染色体DNAの調製）

２本の５００ｍｌ容フラスコに培地（水１００ｍｌにグルコース２ｇ、ポリペプトン０．５ｇ、酵母エキス０．３ｇ、肉エキス０．３ｇ、硫酸アンモニウム０．２ｇ、リン酸２水素カリウム０．１ｇ、硫酸マグネシウム７水和物０．０５ｇを溶解し、２Nの HCl でpHを６に調整したもの）をそれぞれ１００ｍｌずつ入れ、１２１℃で１５分間滅菌した。ここに、同組成の培

地中で30℃にて48時間振盪培養したアクロモバクター・デニトリフィカンス (*Achromobacter denitrificans*) ATCC55564株の培養液をそれぞれ0.3mlずつ加え、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液を8000rpm、4℃にて10分間遠心分離し、生じた沈殿を集めた。得られた沈殿を0.85%食塩水50mlで洗浄して、3.5gの湿菌体を得た。

得られた菌体から、QIAprep Genomic-tip System (Qiagen社製)を用いて染色体DNA (以下、染色体DNA (A) と記す。)を得た。

[0094] 実施例1 (本発明ポリヌクレオチド(A)及び本発明ポリヌクレオチド(B)、これらをそれぞれ含む組換えベクター、並びに当該ベクターを保有する形質転換体の作製)

(1) プライマー合成

配列番号9から12で示される塩基配列をそれぞれ有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。

[0095] [表1]

センスプライマー	アンチセンスプライマー
配列番号9: CCATATGAAAAAGCTCTCCATCGCCCAAG	配列番号10: ACTCGAGGCCTTCGTGCGGCAGGGCTTC
配列番号11: CCATATGAGCCAAAAACCGAAAATCATCG	配列番号12: ACTCGAGGCCGCGGGCTTCCCACACCTGCGGG

[0096] (2) 本発明ポリヌクレオチド(B)を含む組換えベクター

配列番号9で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号10で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、上記染色体DNA (A) を鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[0097] [反応液組成]

染色体DNA (A) 溶液	1.5 μ l
dNTP(各2mMのmixture)	10 μ l
プライマー(50pmol/ μ l)	各0.3 μ l
2xbuffer	25 μ l
KOD-FX(1U/ μ l、東洋紡社製)	1 μ l

超純水 11.9 μ l

[0098] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System 9700）にセットし、94℃にて2分間保温した後、98℃にて10秒間次いで60℃にて30秒間次いで68℃にて60秒間の保温サイクルを30回行った後、4℃で保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1 kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NdeI及びXhoIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1 kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpET-22b（ノバジェン社製）を制限酵素NdeI及びXhoIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2 mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen社製）を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NdeI及びXhoIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.1 kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらプラスミドのうちの1つが保有する約1.1 kbの挿入DNAの塩基配列を分析したところ、当該DNAが配列番号2で示される塩基配列を有することが判明した。このプラスミドをpET774と名付けた。配列番号2で示される塩基配列は配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする。プラスミドpET774は、配列番号1で示されるアミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号45：LeuGluHisHisH

isHisHisHis) が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0099] (3) 本発明ポリヌクレオチド(A)を含む組換えベクター

配列番号 11 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号 12 で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、上記染色体 DNA (A) を鋳型にして、Expand High Fidelity PCR System (ロシュ・ダイアグノスティック社製) を用いた下記反応液組成で PCR を行った。

[0100] [反応液組成]

染色体DNA (A) 溶液	1 μ l
dNTP (各2.5mMのmixture)	1 μ l
プライマー (20pmol/ μ l)	各0.4 μ l
5xbuffer (with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times$ 10 ³ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0101] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー (PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System2400) にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで65℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで70℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.0 kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NdeI及びXhoIを加えて、DNAを二重消化させ、酵素消化された約1.0 kbのDNAを精製した。

プラスミドベクター pET-22b (ノバジェン社製) を制限酵素NdeI及びXhoIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有する LB 寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から 8 コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有する滅菌 LB 培地 2 ml に接種し、試験管中で 37°C 、17 時間振盪培養した。それぞれの培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 社製) を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素 NdeI 及び XhoI により二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6 つのプラスミドにおいて、それぞれ約 1.0 kb の DNA が上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらプラスミドのうちの 1 つが保有する約 1.0 kb の挿入 DNA の塩基配列を分析したところ、当該 DNA が配列番号 4 で示される塩基配列を有することが判明した。このプラスミドを pET43 と名付けた。配列番号 4 で示される塩基配列は配列番号 3 で示されるアミノ酸配列をコードする。プラスミド pET43 は、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する 6 残基のヒスチジンを含む 8 アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号 45 : LeuGluHisHisHisHisHisHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0102] 実施例 2（本発明タンパク質(A)及び本発明タンパク質(B)の調製、並びに当該タンパク質を用いた L- α -アミノ酸化合物の製造）

（1）本発明タンパク質(B)

プラスミド pET774 を用いて E. coli BL21(DE3) 株を形質転換した。得られた形質転換体を 0.1 mM の IPTG と $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンとを含有する滅菌 LB 培地 800 ml に接種し、 30°C 、15 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得た。この湿菌体約 4.9 g を、 0.5 M NaCl と 5 mM イミダゾールとを含む 20 mM リン酸バッファー（pH 7.4）（以下、バインディングバッファーと記すこともある。） 40 ml に懸濁し、マルチビーズショッカー（安井器械社製）及びガラスビーズ（ 0.1 mm Φ ）を用いて、 2500 rpm にて 20 分間破碎処理した。得られた破

碎液を8000rpm、4℃にて10分間遠心分離し、遠心上清液約28mlを得た。

得られた遠心上清液の約10mlを流速5ml/minでアフィニティカラム (HisTrap HP、ゲルベッド5ml、GEヘルスケア社製) にアプライした。このカラムに約25mlのバインディングバッファーを流速5ml/minで流して非吸着タンパク質を溶出させた。その後、流速を維持したまま、0.5M NaClと29.75mM イミダゾールを含む20mMリン酸バッファー (pH7.4) 約35mlを流して、非吸着タンパク質および低吸着タンパク質を溶出させた。

次いで、47.5ml流す間にイミダゾール濃度を29.75mMから500mMに増やすグラジエント溶出により吸着タンパク質を溶出させ、イミダゾール濃度が120mMから270mM付近の画分25mlを分取した。得られた画分をAmicon Ultra-15 (ミリポア社製) に供して脱塩濃縮および0.5M Tris-HCl (pH9) へのバッファー交換を行い、約2mlの精製酵素液 (40gタンパク質/L) を得た。得られた精製酵素液の2倍希釈液0.31mlと、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ) 酪酸のカルシウム塩 (東京化成社製) 50mg、NAD⁺ 10mg、0.5M Tris-HCl緩衝液 (pH9.0) 0.04ml、硫酸アンモニウム40mg、及びロイシン脱水素酵素 (和光純薬社製) 60Uとを混合し、30℃で24時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。反応に用いた2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ) 酪酸のカルシウム塩の量に対してL-メチオニンは35.3%生成していることがわかった。

[0103] (含量分析条件)

カラム : UNISON UK-C18(4.6mmφ×25cm、3μm)

移動相 : 50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%) : B液(%) = 90 : 10の割合で混合

流量 : 0.8ml/分

カラム温度 : 37℃

検出：210nm

[0104] (2) 本発明タンパク質(A)

プラスミドpET43を用いてE. coli BL21(DE3)株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1mMのIPTGと50μg/mlのアンプシリンとを含有する滅菌LB培地800mlに接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得た。この湿菌体約5.2gを、0.5MのNaClと5mMイミダゾールとを含む20mMリン酸バッファー(pH7.4)(即ち、バインディングバッファー)40mlに懸濁し、マルチビーズショッカー(安井器械社製)及びガラスビーズ(0.1mmφ)を用いて、2500rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を8000rpm、4℃にて10分間遠心分離し、遠心上清液約28mlを得た。

得られた遠心上清液の約10mlを流速5ml/minでアフィニティカラム(HisTrap HP、ゲルベッド5ml、GEヘルスケア社製)にアプライした。このカラムに約25mlのバインディングバッファーを流速5ml/minで流して非吸着タンパク質を溶出させた。その後、流速を維持したまま、0.5M NaClと29.75mM イミダゾールとを含む20mMリン酸バッファー(pH7.4)約35mlを流して、非吸着タンパク質および低吸着タンパク質を溶出させた。

次いで、47.5ml流す間にイミダゾール濃度を29.75mMから500mMに増やすグラジエント溶出により吸着タンパク質を溶出させ、イミダゾール濃度が120から270mM付近の画分25mlを分取した。得られた画分をAmicon Ultra-15(ミリポア社製)に供して脱塩濃縮および0.5M Tris-HCl(pH9)へのバッファー交換を行い、約2mlの精製酵素液(9gタンパク質/L)を得た。得られた精製酵素液0.62mlをAmicon Ultra-15(ミリポア社製)にて2倍濃縮した。得られた0.31mlの濃縮液と、2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸のカルシウム塩(東京化成社製)50mg、NAD⁺10mg、0.5M Tris-HCl緩衝液(pH9.0)0.04ml、硫酸アンモニウム40mg、及びロイシン脱水素酵素(和光純薬社製)60Uとを混合し、30℃で24時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析

を行った。反応に用いた2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸のカルシウム塩の量に対してL-メチオニンが36.9%生成していることがわかった。

[0105] (含量分析条件)

カラム：UNISON UK-C18(4.6 mm ϕ × 25 cm、3 μ m)

移動相：50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%)：B液(%) = 90：10の割合で混合

流量：0.8 ml / 分

カラム温度：37℃

検出：210 nm

[0106] (3) 本発明タンパク質(A)及び本発明タンパク質(B)

実施例2(1)で調製された精製酵素液(40gタンパク質/L)の2倍希釈液0.31mlと実施例2(2)で調製された精製酵素液(9gタンパク質/L)の2倍濃縮液0.31mlとを混合し、Amicon Ultra-15(ミリポア社製)にて2倍濃縮した。得られた酵素液0.31mlと、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸のカルシウム塩(東京化成社製)50mg、NAD⁺10mg、0.5M Tris-HCl緩衝液(pH9.0)0.04ml、硫酸アンモニウム40mg、及びロイシン脱水素酵素(和光社製)60Uとを混合し、30℃で3時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。反応に用いた2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸のカルシウム塩の量に対してL-メチオニンは47.0%生成していることがわかった。

[0107] (含量分析条件)

カラム：UNISON UK-C18(4.6 mm ϕ × 25 cm、3 μ m)

移動相：50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%)：B液(%) = 90：10の割合で混合

流量：0.8 ml / 分

カラム温度：37℃

検出：210nm

[0108] 実施例3（本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター及び当該ベクターを保有する形質転換体の作製、並びに、本タンパク質(C)の調製）

[0109]（1）本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

Bacillus sphaericus IF03525株を滅菌したLB培地100ml中で培養し、菌体0.4gを得た。この菌体からQiagen Genomic Tip (Qiagen社製)を用い、それに付属のマニュアルに記載の方法にしたがって染色体DNA（以下、染色体DNA（B）と記す。）を精製した。

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 23 (2003) 239–247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素をコードする塩基配列をもとに、配列番号14で示される塩基配列（GCCATGGAAATCTTCAAGTATATGG）を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号15で示される塩基配列（GGGCCCCGGGTTAACGGCCGTTCAAAATATT）を有するオリゴヌクレオチドプライマーとを合成する。

配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとを用い、上記染色体DNA（B）を鋳型にして、Expand High Fidelity PCR System（ロシュ・ダイアグノスティック社製）を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[0110] [反応液組成]

染色体DNA（B）溶液	1μl
dNTP(各2.5mMのmixture)	1μl
プライマー(20pmol/μl)	0.4μl
プライマー(4pmol/μl)	2μl
5xbuffer(with MgCl ₂)	10μl
enz. expandHiFi (3.5×10 ³ U/ml)	0.5μl
超純水	35.1μl

[0111] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System2400）にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて20秒間次いで55℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを25回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NcoI及びSmaIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpTrc99A（GEヘルスケア社製）を制限酵素NcoI及びSmaIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen社製）を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NcoIとXbaIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.1kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1つをpTrcLDと名付けた。

[0112] (2) 本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 23 (2003) 239–247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素をコードする塩基配列を基にして、前記酵素の113番目のアラニンをグリシンに置換するための変異導入プライマーとして、配列番号16で示される塩基配列（GTCGCTATATTACCGGTGAAGATGTTG）を有するオリゴヌクレオチド（センスプラ

イマー)と、配列番号17で示される塩基配列(CAACATCTTCACCGGTAATATAGCGAC)を有するオリゴヌクレオチド(アンチセンスプライマー)とを合成する。配列番号16で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号17で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例3(1)に記載の組換えベクターpTrcLDを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrcLDのDNA溶液 0.4 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる) 1 μ l
センスプライマー (50 μ M) 0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M) 0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる) 5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる) 1 μ l
超純水 41.8 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー(PERKINELMER-GeneAmp PCR System2400)にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで55℃にて1分間次いで68℃にて5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme (上記Kitに含まれる)を1 μ l添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体の各々からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定し、設計どおりの変異が導入されていることを確認した。配列番号8で示される塩基配列を有するプラスミドをpTrcLD(A113G)と名付けた。配列番号8で示される塩基配列は配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードする。

[0113] (3) 本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

(3-1) 塩基置換のための部位特異的変異導入

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 23 (2003) 239-247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素をコードする塩基配列を基にして、993番目のアデニンをシトシンに置換するための変異導入プライマーとして、配列番号18で示される塩基配列 (GATAGTATTCCAACCTATGTTGCGGC) を有するオリゴヌクレオチド (センスプライマー) と、配列番号19で示される塩基配列 (GCCGCAACATAGGTTGGAATACTATC) を有するオリゴヌクレオチド (アンチセンスプライマー) とを合成する。

配列番号18で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号19で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例3(2)に記載の組換えベクターpTrcLD(A113G)を鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製) を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrcLD(A113G)のDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme（上記Kitに含まれる）を1 μ l添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrcLD(A113G)ndと名付けた。

[0114] (3-2) 本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 23 (2003) 239-247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素をコードする塩基配列を基にして、配列番号20で示される塩基配列（GGGCATATGGAAATCTTCAAGTATATGG）を有するオリゴヌクレオチドプライマー（センスプライマー）と、配列番号21で示される塩基配列（GGATCCTTAACGGCCGTTCAAAATATT）を有するオリゴヌクレオチドプライマー（アンチセンスプライマー）とを合成する。配列番号20で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号21で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用い、実施例3（3-1）に記載の組換えベクターpTrcLD(A113G)ndを鋳型にして、Expand High Fidelity PCR System(ロシュ・ダイアグノスティック社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[0115] [反応液組成]

pTrcLD(A113G)ndのDNA溶液	1 μ l
dNTP(各2.5mMのmixture)	1 μ l
プライマー(20pmol/ μ l)	各0.4 μ l
5xbuffer(with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times$ 10 ³ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0116] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System2400）にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで55℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを

10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで60℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NdeI及びBamHIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpET-15b（ノバジェン製）を制限酵素NdeI及びBamHIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から10コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen社製）を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NdeI及びBamHIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。4つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.1kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。このようにして得られるプラスミドは、組換えベクターpTrcLD(A113G)ndにコードされるロイシン脱水素酵素のアミノ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む20アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号44：MetGlySerSerHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHis）が付加されたタンパク質を発現可能なように設計されている。得られたプラスミドのうちの1つをpETLD(A113G)と名付けた。

[0117] （４）本タンパク質(C)

組換えベクターpETLD(A113G)を用いてE. coli BL21(DE3)株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1mMのIPTGと50 μ g/mlのアンピ

シリんとを含有する滅菌LB培地800mlに接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、約6gの湿菌体を得た。この湿菌体約6gを、0.5MのNaClと5mMイミダゾールとを含む20mMリン酸バッファー（pH7.4）（即ち、バインディングバッファー）40mlに懸濁し、マルチビーズショッカー（安井器械社製）及びガラスビーズ（0.1mmφ）を用いて、2500rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を8000rpm、4℃にて10分間遠心分離し、遠心上清液約25mlを得た。

得られた遠心上清液の約10mlを、流速5ml/minでアフィニティカラム（HisTrap HP、ゲルベッド5ml、GEヘルスケア社製）にアプライした。このカラムに約25mlのバインディングバッファーを流速5ml/minで流して非吸着タンパク質を溶出させた。その後、流速を維持したまま、0.5M NaClと29.75mM イミダゾールとを含む20mMリン酸バッファー（pH7.4）約35mlを流して、非吸着タンパク質および低吸着タンパク質を溶出させた。次いで、47.5ml流す間にイミダゾール濃度を29.75mMから500mMに増やすグラジエント溶出により吸着タンパク質を溶出させ、イミダゾール濃度が160mMから443mM付近の画分30mlを分取した。得られた画分をAmicon Ultra-15（ミリポア社製）に供して、脱塩濃縮および0.5M Tris-HCl（pH9）へのバッファー交換を行い、約2mlの画分（32.6gタンパク質/L）を得た。この画分を以下、ロイシン脱水素酵素（A113G）精製酵素液と記す。

[0118] 実施例4（本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)を用いたL- α -アミノ酸化合物の製造）

実施例2（1）で調製された精製酵素液（40gタンパク質/L）の2倍希釈液0.31mlと実施例2（2）で調製された精製酵素液（9gタンパク質/L）の2倍濃縮液0.31mlとを混合し、Amicon Ultra-15（ミリポア社製）にて2倍濃縮した。得られた酵素液0.31mlと、2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸のカルシウム塩（東京化成社製）50mg、NAD⁺10mg、0.5M Tris-HCl緩衝液（pH9.0）0.04ml、硫酸アンモニウム40mg、及び実施例3（4）で調製されたロイシン脱水素酵素（A113G）精製酵素液（32.6gタンパ

ク質/L) 0.15 ml とを混合し、30℃で1時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。反応に用いた2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸のカルシウム塩の量に対してL-メチオニンが49.9%生成していることがわかった。

[0119] (含量分析条件)

カラム：UNISON UK-C18(4.6 mm ϕ × 25 cm、3 μ m)

移動相：50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%) : B液(%) = 90 : 10の割合で混合

流量：0.8 ml / 分

カラム温度：37℃

検出：210 nm

[0120] 実施例5 (本発明ポリヌクレオチド(A)、本発明組換えベクター(ABC)、及び当該ベクターを保有する形質転換体の作製)

(1) 本発明ポリヌクレオチド(A)を含有する組換えベクター

配列番号13で示される塩基配列の5'末端に塩基配列ccatggct、3'末端に塩基配列ggatccが、それぞれ付加された塩基配列を有する二本鎖DNAを調製する。配列番号13で示される塩基配列は配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする。

調製された約1.0 kbの二本鎖DNAを制限酵素NcoI及びBamHIにより二重消化させ、酵素消化されたDNAを精製した。

プラスミドベクターpTrc99A (GEヘルスケア社製)を制限酵素NcoI及びBamHIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli JM109株を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g / mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g / mlのアンピシリンを含有す

る滅菌LB培地2mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NcoIとBamHIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.0kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。得られたプラスミドの塩基配列を決定し、目的とする塩基配列を有するプラスミドをpTrc4.3SCと名付けた。

[0121] (2) 本発明組換えベクター(ABC)

(2-1) 本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 23 (2003) 239-247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素の塩基配列を基にして、561番目のグアニンをアデニンに置換するための変異導入プライマーとして、配列番号22で示される塩基配列(CGTAGCTTACAAACTTTGC GAGTATTTAC)を有するオリゴヌクレオチド(センスプライマー)と、配列番号23で示される塩基配列(GTAAATACTCGCAAAGTTTGTAAAGCTACG)を有するオリゴヌクレオチド(アンチセンスプライマー)とを合成する。配列番号22で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号23で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例3の(3)に記載のプラスミドpTrcLD(A113G)ndを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrcLD(A113G)ndのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l

PfuUltra (上記Kitに含まれる) 1 μ l

超純水 41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme (上記Kitに含まれる) を1 μ l 添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrcLD(A113G)ndhdと名付けた。

[0122] (2-2) 本発明ポリヌクレオチド(B)を含有する組換えベクター

配列番号24で示される塩基配列 (CCATGGCTATGAAAAAGCTCTCCATCGCCC) を有するオリゴヌクレオチド (センスプライマー) と配列番号25で示される塩基配列 (CAAGCTTGCTAGCCTTCGTGCGGCAGGGCTTC) を有するオリゴヌクレオチド (アンチセンスプライマー) とをプライマーに用いて、実施例1(2)に記載のプラスミドpET774を鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[0123] [反応液組成]

pET774のDNA溶液 1.5 μ l

dNTP(各2mMのmixture) 10 μ l

プライマー(50pmol/ μ l) 各0.3 μ l

2xbuffer 25 μ l

KOD-FX(1U/ μ l、東洋紡社製) 1 μ l

超純水 11.9 μ l

[0124] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー (PERKIN ELMER-Gen

eAmp PCR System 9700) にセットし、94℃にて2分間保温した後、98℃にて10秒間次いで60℃にて30秒間次いで68℃にて60秒間の保温サイクルを30回行った後、4℃で保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1 kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NcoI及びHindIIIを加えて、DNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1 kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpTrc99A (GEヘルスケア社製) を制限酵素NcoI及びHindIIIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2 mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NcoI及びHindIIIより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.1 kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1つをpTrc774NHと名付けた。

[0125] (2-3) 本発明ポリヌクレオチド(B)及び本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

配列番号26で示される塩基配列 (CGGATCCGAGGAAACAGACCATGG) を有するオリゴヌクレオチド (センスプライマー) と配列番号27で示される塩基配列 (GCTGCAGCCTAGCCTTCGTGCGGCAGGGCTTC) を有するオリゴヌクレオチド (アンチセンスプライマー) とを用いて、実施例5 (2-2) に記載のプラスミドpTrc774NHを鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[0126] [反応液組成]

pTrc 7 7 4 NHのDNA溶液	1.5 μ l
dNTP(各2mMのmixture)	10 μ l
プライマー(50pmol/ μ l)	各0.3 μ l
2xbuffer	25 μ l
KOD-FX(1U/ μ l、東洋紡社製)	1 μ l
超純水	11.9 μ l

[0127] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー (PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System 9700) にセットし、94℃にて2分間保温した後、98℃にて10秒間次いで60℃にて30秒間次いで68℃にて60秒間の保温サイクルを30回行った後、4℃で保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素BamHI及びPstIを加えて、DNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1kbのDNAを精製した。

実施例5(2-1)に記載のプラスミドpTrcLD(A113G)ndhdを制限酵素BamHI及びPstIにより二重消化させ、酵素消化されたプラスミドDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素BamHI及びPstIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.1kbのDNAがプラスミ

ド pTrcLD(A113G)nd h d に挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの 1 つを pTrcLD(A113G)/774 と名付けた。

[0128] (2-4) 本発明ポリヌクレオチド(A)、本発明ポリヌクレオチド(B)及び本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

配列番号 28 で示される塩基配列 (GCTGCAGCAGGAAACAGACCATGG) を有するオリゴヌクレオチド (センスプライマー) と配列番号 29 で示される塩基配列 (CAAGCTTGTTAGCCACGGGCTTCCCACACC) で示されるオリゴヌクレオチド (アンチセンスプライマー) とをプライマーに用いて、実施例 5 (1) に記載のプラスミド pTrc4 3 SC を鋳型にして Expand High Fidelity PCR System (ロシュ・ダイアグノスティック社製) を用いた下記反応液組成で PCR を行った。

[0129] [反応液組成]

pTrc4 3 SC の DNA 溶液	1 μ l
dNTP (各 2.5 mM の mixture)	1 μ l
プライマー (20 pmol / μ l)	各 0.4 μ l
5 x buffer (with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times 10^3$ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0130] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー (PERKIN ELMER-Gen eAmp PCR System2400) にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで65℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで70℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記 PCR 反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約 1.0 kb の DNA のバンドが検出された。

残りの PCR 反応液に制限酵素 PstI 及び HindIII を加えて、DNA を二重消化させ、酵素消化された約 1.0 kb の DNA を精製した。

実施例 5 (2-3) に記載のプラスミド pTrcLD(A113G)/774 を制限酵素 Pst

I及びHindIIIにより二重消化させ、酵素消化されたプラスミドDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2 mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素PstI及びHindIIIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.0 kbのDNAがプラスミドpTrcLD(A113G)/774に挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1つをpTrcLD(A113G)/774/43SCと名付けた。

[0131] 実施例6 (本発明組換えベクター(ABC)を保有する形質転換体の処理物を用いたL- α -アミノ酸化合物の製造)

[0132] プラスミドpTrcLD(A113G)/774/43SCを用いてE. coli JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1 mMのIPTGと50 μ g/mlのアンピシリンとを含有する滅菌LB培地100 mlに接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得た。この湿菌体約0.8 gを0.5M Tris-HClバッファー (pH9) 5 mlに懸濁し、マルチビーズショッカー (安井器械社製) 及びガラスビーズ (0.1 mm Φ) を用いて、2500 rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を8000 rpm、4℃にて10分間遠心分離し、遠心上清液 (28 gタンパク質/L) 約3.5 mlを得た。

得られた遠心上清液の0.34 mlをAmicon Ultra-15 (ミリポア社製)にて3.4倍濃縮した。得られた濃縮遠心上清液0.1 ml、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の40%水

溶液を0.35 ml、NAD+10 mg、0.5 M Tris-HCl緩衝液（pH 9.0）0.05 ml、及び硫酸アンモニウム20 mgを混合し、30℃で1時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。93.5 g/LのL-メチオニンが生成していることがわかった。反応に用いた2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸の量に対してL-メチオニン収率は30.4%であった。

[0133] （含量分析条件）

カラム：UNISON UK-C18（4.6 mm ϕ × 25 cm、3 μ m）

移動相：50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液（A液）とアセトニトリル（B液）をA液（%）：B液（%）＝90：10の割合で混合

流量：0.8 ml / 分

カラム温度：37℃

検出：210 nm

[0134] 実施例7（本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター及び当該ベクターを保有する形質転換体の作製）

（1）配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

（1-1）

配列番号30で示される塩基配列（CCATATGTCTCAAAAACCAAAATCATCG）を有するオリゴヌクレオチド（センスプライマー）と、配列番号31で示される塩基配列（ACTCGAGGCCACGGGCTTCCCACACCTGCG）を有するオリゴヌクレオチド（アンチセンスプライマー）を合成する。配列番号30で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号31で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、実施例5の（1）に記載のプラスミドpTrc43SCを鋳型にしてExpand High Fidelity PCR System（ロシュ・ダイアグノスティック社製）を用いた下記反応液組成でPCRを行った。

[0135] [反応液組成]

pTrc4 3 SCのDNA溶液	1 μ l
dNTP(各2.5mMのmixture)	1 μ l
プライマー(20pmol/ μ l)	各0.4 μ l
5 xbuffer(with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times$ 10 ³ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0136] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー (PERKIN ELMER—Gen eAmp PCR System2400) にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで55℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで60℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.0 kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NdeI及びXhoIを加えて、DNAを二重消化させ、酵素消化された約1.0 kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpET-22b (ノバジェン製)を制限酵素NdeI及びXhoIにより二重消化させ、酵素消化されたDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g / ml のアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から10コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g / ml のアンピシリンを含有する滅菌LB培地2 ml に接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NdeI及びXhoIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。4つのプラスミドにおいて、それぞれ約1.0 kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1

つを pET4 3 SCcHis と名付けた。プラスミド pET4 3 SCcHis は、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する 6 残基のヒスチジンを含む 8 アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号 45 : LeuGluHisHisHisHisHisHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0137] (1-2)

配列番号 32 で示される塩基配列（GCCATGGCTATGTCTCAAAAACCAAAAATC）を有するオリゴヌクレオチド（センスプライマー）と、配列番号 33 で示される塩基配列（GGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG）を有するオリゴヌクレオチド（アンチセンスプライマー）を合成する。配列番号 32 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号 33 で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、実施例 7（1-1）に記載のプラスミド pET4 3 SCcHis を鋳型にして Expand High Fidelity PCR System（ロシュ・ダイアグノスティック社製）を用いた下記反応液で PCR を行った。

[0138] [反応液組成]

pET4 3 SCcHis の DNA 溶液	1 μ l
dNTP (各 2.5mM の mixture)	1 μ l
プライマー (20pmol/ μ l)	各 0.4 μ l
5xbuffer (with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times$ 10 ³ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0139] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System2400）にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで55℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで60℃にて30秒間次いで72℃にて1.5分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記 PCR 反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約

1. 0 k b の D N A のバンドが検出された。

残りの P C R 反応液に制限酵素NcoI及びBamHIを加えて、D N A を二重消化させ、酵素消化されたD N A を精製した。

プラスミドベクター pTrc99A (G E ヘルスケア社製) を制限酵素NcoI及びBamHIにより二重消化させ、酵素消化されたD N A を精製した。

これらの精製されたD N A を混合し、T 4 D N A リガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を 5 0 μ g / m l のアンピシリンを含有する L B 寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から 1 0 コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ 5 0 μ g / m l のアンピシリンを含有する滅菌 L B 培地 2 m l に接種し、試験管中で 3 7 $^{\circ}$ C 、 1 7 時間振盪培養した。それぞれの培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製) を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NcoI及びBamHIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。4 つのプラスミドにおいて、前記約 1 . 0 k b の D N A が挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの 1 つを pTrc4 3 SCcHis と名付けた。プラスミド pTrc4 3 SCcHis は、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する 6 残基のヒスチジンを含む 8 アミノ酸からなるアミノ酸配列 (配列番号 4 5 : LeuGluHisHisHisHisHisHis) が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0140] (2) 改変アミノ酸配列 V 1 0 9 I を有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号 1 3 に示される塩基配列を基にして、325番目のグアニンをアデニンに置換するための変異導入プライマーとして、配列番号 3 4 で示される塩基配列 (CGCTGTTGCTGATATTACCATCGGCCTG) を有するオリゴヌクレオチド (センスプライマー) と、配列番号 3 5 で示される塩基配列 (CAGGCCGATGGTAATATCAGCAACAGCG) を有するオリゴヌクレオチド (アンチセンスプライマー) とを合成する。配列番号 1 3 に示される塩基配列における325番目のグアニンのア

デニンへの置換は、配列番号3で示されるアミノ酸配列における109番目のバリンのイソロイシンへの置換をもたらす。

配列番号34で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号35で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例7(1-2)に記載のプラスミドpTrc4 3SCcHisを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrc4 3SCcHisのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme (上記Kitに含まれる) を1 μ l 添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4 3SCcHis-g325aと名付けた。プラスミドpTrc4 3SCcHis-g325aは、配列番号3で示されるアミノ酸配列において109番

目のバリンのイソロイシンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列(配列番号45: LeuGluHisHisHisHisHisHis)が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0141] (3) 改変アミノ酸配列G191Dを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号13に示される塩基配列を基にして、572番目のグアニンをアデニンに置換するための変異導入プライマーとして、配列番号36で示される塩基配列(GGCGGCATACGTCGATCGTGACGAGCTG)を有するオリゴヌクレオチド(センスプライマー)と、配列番号37で示される塩基配列(CAGCTCGTCACGATCGACGTATGCCGCC)を有するオリゴヌクレオチド(アンチセンスプライマー)とを合成する。配列番号13に示される塩基配列における572番目のグアニンのアデニンへの置換は、配列番号3で示されるアミノ酸配列における191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換をもたらす。

配列番号36で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号37で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例7(1-2)に記載のプラスミドpTrc4.3SCcHisを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrc4.3SCcHisのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー（P E R K I N E L M E R - G e n e A m p P C R S y s t e m 2 4 0 0）にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、D p n I r e s t r i c t i o n e n z y m e（上記K i tに含まれる）を1μl添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. c o l i D H 5 αを形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4.3SCcHis-g572aと名付けた。プラスミドpTrc4.3SCcHis-g572aは、配列番号3で示されるアミノ酸配列において191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号45：LeuGluHisHisHisHisHisHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0142]（4）改変アミノ酸配列Q246Rを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号13に示される塩基配列を基にして、737番目のアデニンをグアニンに置換するための変異導入プライマーとして、配列番号38で示される塩基配列（GCAGCACTGGTACGGGCACTGCGCTCTG）を有するオリゴヌクレオチド（センスプライマー）と、配列番号39で示される塩基配列（CAGAGCGCAGTGCCCGTACCAGTGCTGC）を有するオリゴヌクレオチド（アンチセンスプライマー）とを合成する。配列番号13に示される塩基配列における737番目のアデニンのグアニンへの置換は、配列番号3で示されるアミノ酸配列における246番目のグルタミンのアルギニンへの置換をもたらす。

配列番号38で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号39で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用い

て、実施例7（1－2）に記載のプラスミドpTrc4 3SCcHisを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit（STRATAGENE社製）を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

〔反応液組成〕

pTrc4 3SCcHisのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix（上記Kitに含まれる）	1 μ l
センスプライマー（50 μ M）	0.4 μ l
アンチセンスプライマー（50 μ M）	0.4 μ l
10x buffer（上記Kitに含まれる）	5 μ l
PfuUltra（上記Kitに含まれる）	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー（PERKIN ELMER－GeneAmp PCR System2400）にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme（上記Kitに含まれる）を1 μ l添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4 3SCcHis-a737gと名付けた。プラスミドpTrc4 3SCcHis-a737gは、配列番号3で示されるアミノ酸配列において246番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号45：LeuGluHisHisHisHisHisHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0143] (5) 改変アミノ酸配列V109I/G191Dを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号13に示される塩基配列における572番目のグアニンをアデニンに変換するための変異導入プライマーである、配列番号36で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号37で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例7(2)に記載のプラスミドpTrc4.3SCcHis-g325aを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrc4.3SCcHis-g325aのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme (上記Kitに含まれる) を1 μ l 添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4.3SCcHis-g325a/g572aと名付けた。プラスミ

ド pTrc4 3 SCcHis-g325a/g572aは、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において 109 番目のバリンのイソロイシンへの置換及び 191 番目のグリシンのアスパラギン酸への置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する 6 残基のヒスチジンを含む 8 アミノ酸からなるアミノ酸配列(配列番号 45 : LeuGluHisHisHisHisHisHis) が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0144] (6) 改変アミノ酸配列 V 109 I / Q 246 R を有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号 13 に示される塩基配列における 737 番目のグアニンをアデニンに変換するための変異導入プライマーである、配列番号 38 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号 39 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例 7 (2) に記載のプラスミド pTrc4 3 SCcHis-g325a を鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社製) を用いた以下の反応液組成で PCR を行った。

[反応液組成]

pTrc4 3 SCcHis-g325a の DNA 溶液	1 μ l
dNTP mix (上記 Kit に含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記 Kit に含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記 Kit に含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme（上記Kitに含まれる）を1 μ l添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4.3SCcHis-g325a/a737gと名付けた。プラスミドpTrc4.3SCcHis-g325a/a737gは、配列番号3で示されるアミノ酸配列において109番目のバリンのイソロイシンへの置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号45：LeuGluHisHisHisHisHisHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0145] (7) 改変アミノ酸配列G191D/Q246Rを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号13に示される塩基配列における737番目のグアニンをアデニンに変換するための変異導入プライマーである、配列番号38で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号39で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例7(3)に記載のプラスミドpTrc4.3SCcHis-g572aを鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

〔反応液組成〕

pTrc4.3SCcHis-g572aのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix（上記Kitに含まれる）	1 μ l
センスプライマー（50 μ M）	0.4 μ l
アンチセンスプライマー（50 μ M）	0.4 μ l
10x buffer（上記Kitに含まれる）	5 μ l
PfuUltra（上記Kitに含まれる）	1 μ l

超純水

41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System 2400）にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme（上記Kitに含まれる）を1 μ l添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4.3SCcHis-g572a/a737gと名付けた。プラスミドpTrc4.3SCcHis-g572a/a737gは、配列番号3で示されるアミノ酸配列において、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号45：LeuGluHisHisHisHisHisHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0146] (8) 改変アミノ酸配列V109I/G191D/Q246Rを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

配列番号13に示される塩基配列における737番目のアデニンをグアニンに変換するための変異導入プライマーである、配列番号38で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号39で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例7(5)に記載のプラスミドpTrc4.3SCcHis-g325a/g572aを鋳型にして、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit（STRATAGENE社製）を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

[反応液組成]

pTrc4 3 SCcHis-g325a/g572aのDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

上記組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて5.5分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme (上記Kitに含まれる) を1 μ l 添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpTrc4 3 SCcHis-g325a/g572a/a737gと名付けた。プラスミドpTrc4 3 SCcHis-g325a/g572a/a737gは、配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換を有する改変(altered)アミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列 (配列番号45: LeuGluHisHisHisHisHisHis) が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0147] 実施例8 (本発明タンパク質(A)の熱安定性評価)

(1)

プラスミドpTrc4 3 SCcHis、pTrc4 3 SCcHis-g325a/g572a、pTrc4 3 SC

cHis-g325a/a737g、または、プラスミド pTrc4 3SCcHis-g325a/g572a/a737g を用いてE. coli JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1 mM のIPTGと50 μ g/mlのアンピシリンとを含有する滅菌LB培地20 mlにそれぞれ接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られたそれぞれの培養液を遠心分離し、約0.1 gの湿菌体を得た。湿菌体それぞれ約0.1 gを、0.5 MのNaClと5 mMイミダゾールとを含む20 mMリン酸バッファー (pH7.4) (即ち、バインディングバッファ) 1 mlにそれぞれ懸濁し、マルチビーズショッカー (安井器械社製) 及びガラスビーズ (0.1 mm ϕ) を用いて、2500 rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を13000 rpm、4℃にて10分間遠心分離し、それぞれ遠心上清液約0.7 mlを得た。

得られたそれぞれの遠心上清液に約0.3 mlのバインディングバッファを追加して約1 mlとした後、これをアフィニティカラム (HisTrap HP、ゲルベッド1 ml、GEヘルスケア社製) にアプライした。このカラムに約3 mlのバインディングバッファを流して非吸着タンパク質を溶出させた。その後、0.5 M NaClと500 mM イミダゾールとを含む20 mMリン酸バッファ (pH7.4) 約2 mlを流して、それぞれの吸着タンパク質を溶出させ、溶出液を集めた。それぞれの溶出液約2 mlをAmicon Ultra-15 (ミリポア社製) に供して脱塩濃縮及び0.5 M Tris-HCl (pH9) へのバッファ交換を行い、それぞれ約0.4 mlの精製酵素液を得た。それぞれの精製酵素液のタンパク質濃度を測定した。pTrc4 3SCcHis導入形質転換体からの精製酵素液のタンパク質濃度は3.1 gタンパク質/L、pTrc4 3SCcHis-g325a/g572a導入形質転換体からのそれは2.5 gタンパク質/L、pTrc4 3SCcHis-g325a/a737g導入形質転換体からのそれは3.1 gタンパク質/L、pTrc4 3SCcHis-g325a/g572a/a737g導入形質転換体からのそれは3.2 gタンパク質/Lであった。

得られた精製酵素液をそれぞれ0.45 gタンパク質/Lになるように希釈し、得られた希釈酵素液0.06 mlを41℃で30分間熱処理した後、4℃に冷却した。得られた酵素液0.045 mlと0.5 M Tris-HCl緩衝液 (pH9.0) 0.0

55 ml とを混合し、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸カルシウム（東京化成社製）が47 mM、NAD⁺が3.2 mMとなるよう添加して、30℃で保温した。前記反応液の吸光度を340 nmの波長で10秒ごとに約10分間測定した。1分間に1 μmolのNAD⁺を還元させる酵素量を1 Uとして、酵素活性を求めた。対照として、熱処理を行わなかった希釈酵素液を用いて同様に反応を行い、反応液の吸光度を測定し、酵素活性を求めた。熱処理を行わなかった希釈酵素液を用いた反応での酵素活性を100%として、熱処理した希釈酵素液の残存活性を算出した。結果を表2に示す。

[0148] [表2]

酵素液		残存活性 (%)	
導入プラスミド	アミノ酸配列	熱処理無し	熱処理(41℃、30分間)
pTrc43SCcHis	配列番号3	100	0
pTrc43SCcHis-g325a/g572a	V109I/G191D	100	51.6
pTrc43SCcHis-g325a/a737g	V109I/Q246R	100	56.4
pTrc43SCcHis-g325a/g572a/a737g	V109I/G191D/Q246R	100	59.9

[0149] (2)

プラスミド pTrc43SCcHis、pTrc43SCcHis-g325a、pTrc43SCcHis-g572a、pTrc43SCcHis-a737g、pTrc43SCcHis-g325a/g572a、pTrc43SCcHis-g572a/a737g、pTrc43SCcHis-g325a/a737g、または、プラスミド pTrc43SCcHis-g325a/g572a/a737gを用いてE. coli JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1 mMのIPTGと50 μg/mlのアンプシリンとを含有する滅菌LB培地20 mlにそれぞれ接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られたそれぞれの培養液を遠心分離し、約0.1 gの湿菌体を得た。湿菌体それぞれ約0.1 gを、0.5 MのNaClと5 mMイミダゾールとを含む20 mMリン酸バッファー(pH7.4)（即ち、バインディングバッファー）1 mlにそれぞれ懸濁し、マルチビーズショッカー（安井器械社製）及びガラスビーズ（0.1 mmφ）を用いて、2500 rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を12000 rpm、4℃にて10分間遠心分離し、それぞれ遠心上清液約0.7 mlを得た。

得られたそれぞれの遠心上清液に約0.3 mlのバインディングバッファーを追加して約1 mlとした後、これをアフィニティカラム (HisTrap HP、ゲルベッド1 ml、GEヘルスケア社製) にアプライした。このカラムに約3 mlのバインディングバッファーを流して非吸着タンパク質を溶出させた。その後、0.5 M NaClと500 mM イミダゾールとを含む20 mMリン酸バッファー (pH 7.4) 約2 mlを流して、それぞれの吸着タンパク質を溶出させ、溶出液を集めた。それぞれの溶出液約2 mlをAmicon Ultra-15 (ミリポア社製) に供して脱塩濃縮及び0.5 M Tris-HCl (pH 9) へのバッファー交換を行い、それぞれ約0.4 mlの精製酵素液を得た。それぞれの精製酵素液のタンパク質濃度を測定した。pTrc4-3SCcHis導入形質転換体からの精製酵素液のタンパク質濃度は2.3 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-g325a導入形質転換体からのそれは2.9 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-g572a導入形質転換体からのそれは2.9 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-a737g形質転換体からのそれは4.2 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-g325a/g572a導入形質転換体からのそれは2.1 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-g572a/a737g導入形質転換体からのそれは3.3 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-g325a/a737g導入形質転換体からのそれは2.6 gタンパク質/L、pTrc4-3SCcHis-g325a/g572a/a737g導入形質転換体からのそれは2.7 gタンパク質/Lであった。

得られた精製酵素液をそれぞれ0.45 gタンパク質/Lになるように希釈し、得られた希釈酵素液0.06 mlを40.5°Cで30分間熱処理した後、4°Cに冷却した。得られた酵素液0.045 mlと0.5 M Tris-HCl緩衝液 (pH 9.0) 0.055 mlとを混合し、2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸カルシウム (東京化成社製) が47 mM、NAD⁺が3.2 mMとなるよう添加して、30°Cで保温した。前記反応液の吸光度を340 nmの波長で10秒ごとに約10分間測定した。1分間に1 μ molのNAD⁺を還元させる酵素量を1 Uとして、酵素活性を求めた。対照として、熱処理を行わなかった希釈酵素液を用いて同様に反応を行い、反応液の吸光度を測定し、酵素活性を求めた。熱処理を行わなかった希釈酵素液を用いた反応での酵素活性を100%として、熱処理

した希釈酵素液の残存活性を算出した。結果を表3に示す。

[0150] [表3]

酵素液		残存活性 (%)	
導入プラスミド	アミノ酸配列	熱処理 無し	熱処理 (40.5℃、30分間)
pTrc43SCcHis	配列番号3	100	6.9
pTrc43SCcHis-g325a	V109I	100	16.6
pTrc43SCcHis-g572a	G191D	100	8.1
pTrc43SCcHis-a737g	Q246R	100	22.5
pTrc43SCcHis-g325a/g572a	V109I/G191D	100	10.9
pTrc43SCcHis-g572a/a737g	G191D/Q246R	100	11.9
pTrc43SCcHis-g325a/a737g	V109I/Q246R	100	53.1
pTrc43SCcHis-g325a/g572a/a737g	V109I/G191D/Q246R	100	65.1

[0151] 実施例9（本発明組換えベクター(ABC)及び当該ベクターを保有する形質転換体の作製）（1）配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する本発明組換えベクター(ABC)

[0152] （1-1）本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 23 (2003) 239-247に記載されたBacillus sphaericus IF03525株由来のロイシン脱水素酵素の塩基配列を基にして、561番目のグアニンをアデニンに変換するための変異導入プライマーとして、配列番号22で示される塩基配列（CGTAGCTTACAACTTTGC GAGTATTTAC）を有するオリゴヌクレオチド（センスプライマー）と、配列番号23で示される塩基配列（GTAAATACTCGCAAAGTTTGTAAGCTACG）を有するオリゴヌクレオチド（アンチセンスプライマー）とを合成する。

配列番号22で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号23で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、実施例3の（3-2）に記載のプラスミドpETLD(A113G)を鋳型にして、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit（STRATAGENE社製）を用いた以下の反応液組成でPCRを行った。

〔反応液組成〕

pETLD(A113G)のDNA溶液	1 μ l
dNTP mix (上記Kitに含まれる)	1 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.4 μ l
10x buffer (上記Kitに含まれる)	5 μ l
PfuUltra (上記Kitに含まれる)	1 μ l
超純水	41.2 μ l

〔PCR反応条件〕

上記反応液組成の反応液が入った容器を、サーマルサイクラー (PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System 2400) にセットし、95℃で1分間保温した後、95℃にて50秒間次いで60℃にて1分間次いで68℃にて6.8分間の保温サイクルを12回行った後、4℃で保存した。

得られたPCR反応液に、DpnI restriction enzyme (上記Kitに含まれる) を1 μ l 添加した後、37℃で1時間保温した。得られた保温液を用いてE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からプラスミドを抽出した後、ダイデオキシ法により変異箇所の塩基配列を決定した。設計どおりの変異が導入されていることが確認されたプラスミドをpETLD(A113G)hdと名付けた。

[0153] プラスミドpETLD(A113G)hdに制限酵素NcoI及びBamHIを加えて、当該プラスミドDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1 kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpTrc99A (GEヘルスケア社製) を制限酵素NcoI及びBamHIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天

培地で培養し、生育してきたコロニーの中から10コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2 mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NcoI及びBamHIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。4つのプラスミドにおいて、約1.1 kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1つをpTrcLD(A113G)nhと名付けた。プラスミドpTrcLD(A113G)nhは、配列番号7で示されるアミノ酸配列のアミノ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む20アミノ酸からなるアミノ酸配列（配列番号44: MetGlySerSerHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHis）が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0154] (1-2) 本発明ポリヌクレオチド(B)を含有する組換えベクター

配列番号24で示される塩基配列（CCATGGCTATGAAAAAGCTCTCCATCGCCC）を有するオリゴヌクレオチド（センスプライマー）と配列番号40で示される塩基配列（GCTGCAGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG）で示されるオリゴヌクレオチド（アンチセンスプライマー）とをプライマーに用い、実施例1の(2)に記載のプラスミドpET774を鋳型にして、下記反応液組成でPCRを行った。

[0155] [反応液組成]

プラスミドpET774のDNA溶液	1.5 μ l
dNTP(各2mMのmixture)	10 μ l
プライマー(50pmol/ μ l)	各0.3 μ l
2xbuffer	25 μ l
KOD-FX(1U/ μ l、東洋紡社製)	1 μ l
超純水	11.9 μ l

[0156] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—Gen

eAmp PCR System 9700) にセットし、94℃にて2分間保温した後、98℃にて10秒間次いで60℃にて30秒間次いで68℃にて60秒間の保温サイクルを30回行った後、4℃で保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素NcoI及びPstIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpTrc99A (GEヘルスケア社製) を制限酵素NcoI及びPstIにより二重消化させ、酵素消化されたベクターDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素NcoIとPstIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、約1.1kbのDNAが上記ベクターに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1つをpTrc774chNPと名付けた。プラスミドpTrc774chNPは、配列番号1で示されるアミノ酸配列のカルボキシ末端に、連続する6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸からなるアミノ酸配列(配列番号45: LeuGluHisHisHisHisHisHis)が付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を発現可能なように設計されている。

[0157] (1-3) 本発明ポリヌクレオチド(B)及び本ポリヌクレオチド(C)を含有する組換えベクター

配列番号26で示される塩基配列(CGGATCCGAGGAAACAGACCATGG)を有する

オリゴヌクレオチド（センスプライマー）と配列番号４０で示される塩基配列（GCTGCAGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG）で示されるオリゴヌクレオチド（アンチセンスプライマー）とをプライマーに用いて、実施例９（１－２）に記載のプラスミド pTrc 7 7 4 chNP を鋳型にして、下記反応液組成でＰＣＲを行った。

[0158] [反応液組成]

pTrc 7 7 4 chNPのDNA溶液	1.5 μ l
dNTP(各2mMのmixture)	10 μ l
プライマー(50pmol/ μ l)	各0.3 μ l
2xbuffer	25 μ l
KOD-FX(1U/ μ l、東洋紡社製)	1 μ l
超純水	11.9 μ l

[0159] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System 9700）にセットし、94℃にて2分間保温した後、98℃にて10秒間次いで60℃にて30秒間次いで68℃にて60秒間の保温サイクルを30回行った後、4℃で保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.1 kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素BamHI及びPstIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.1 kbのDNAを精製した。

実施例 9 (1 - 1) に記載のプラスミド pTrcLD(A113G)nhを制限酵素BamHI及びPstIにより二重消化させ、酵素消化されたプラスミドDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有する LB 寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から 8 コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有す

プラスミド pTrc43SCchNH を鋳型にして、Expand High Fidelity PCR System (ロシュ・ダイアグノスティック社製) を用いた下記反応液組成で PCR を行った。

[0164] [反応液組成]

pTrc43SCchNH の DNA 溶液	1 μ l
dNTP (各 2.5 mM の mixture)	1 μ l
プライマー (20 pmol / μ l)	各 0.4 μ l
5 x buffer (with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times 10^3$ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0165] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー (PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System2400) にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで65℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで70℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記 PCR 反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約 1.0 kb の DNA のバンドが検出された。

残りの PCR 反応液に制限酵素 PstI 及び HindIII を加えて、DNA 断片を二重消化させ、酵素消化された約 1.0 kb DNA を精製した。

実施例 9 (1-3) に記載のプラスミド pTrcLD(A113G)nh/774ch を制限酵素 PstI 及び HindIII により二重消化させ、酵素消化されたプラスミド DNA を精製した。

これらの精製された DNA を混合し、T4 DNA リガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液で E. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を 50 μ g / ml のアンピシリンを含有する LB 寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から 8 コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ 50 μ g / ml のアンピシリンを含有する滅菌 LB 培地 2 ml に接種し、試験管中で 37℃、17 時間振盪培養した。

。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素PstIとHindIIIとにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した6つのプラスミドにおいて、約1.0 kbのDNAがプラスミドpTrcLD(A113G)nh/774chに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドの1つをpTrcLD(A113G)nh/774ch/43SCchと名付けた。

[0166] (2) 改変アミノ酸配列V109I/G191D/Q246Rを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する本発明組換えベクター(ABC)

配列番号 28 で示される塩基配列 (GCTGCAGCAGGAAACAGACCATGG) を有するオリゴヌクレオチド (センスプライマー) と配列番号 41 で示される塩基配列 (CAAGCTTGT CAGTGGTGGTGGTGGTGGTG) を有するオリゴヌクレオチド (アンチセンスプライマー) とをプライマーに用い、実施例 7 の (8) に記載のプラスミド pTrc4-3SCcHis-g325a/g572a/a737g を鋳型にして、Expand High Fidelity PCR System(ロシュ・ダイアグノスティック社製)を用いた下記反応液組成でPCRを行った。

[0167] [反應液組成]

pTrc 4 3 SCcHis-g325a/g572a/a737gのDNA溶液	1 μ l
dNTP(各2.5mMのmixture)	1 μ l
プライマー(20pmol/ μ l)	各0.4 μ l
5 xbuffer(with MgCl ₂)	10 μ l
enz. expandHiFi (3.5 $\times$ 10 ³ U/ml)	0.5 μ l
超純水	36.7 μ l

[0168] 上記組成の反応液が入った容器をサーマルサイクラー（PERKIN ELMER—GeneAmp PCR System2400）にセットし、94℃にて2分間保温した後、94℃にて15秒間次いで65℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを10回行い、次いで、94℃にて15秒間次いで70℃にて30秒間次いで72℃にて1分間の保温サイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

その後、上記PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した。約1.0 kbのDNAのバンドが検出された。

残りのPCR反応液に制限酵素PstI及びHindIIIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.0 kbのDNAを精製した。

実施例9（1-5）に記載のプラスミドpTrcLD(A113G)nh/774ch/43SCchを制限酵素PstI及びHindIIIにより二重消化させ、酵素消化された約6.4 kbのプラスミドDNAを精製した。

これらの精製されたDNAを混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から8コロニーを無作為に選抜した。選抜されたコロニーをそれぞれ50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地2 mlに接種し、試験管中で37℃、17時間振盪培養した。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素PstIとHindIIIとにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供した。6つのプラスミドにおいて、約1.0 kbのDNAが上記約6.4 kbのプラスミドDNAに挿入されていることが確認された。これらのプラスミドのうちの1つをpTrcLD(A113G)nh/774ch/43SCMchと名付けた。

[0169] 実施例10（本発明組換えベクター(ABC)を保有する形質転換体の処理物を用いたL- α -アミノ酸化合物の製造）

[0170] （1）配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する本発明組換えベクター(ABC)を保有する形質転換体

プラスミドpTrcLD(A113G)nh/774ch/43SCchを用いてE. coli JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1 mMのIPTGと50 μ g/mlのアンピシリンとを含有する滅菌LB培地20 mlに接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得た。この湿菌

体約0.1gを0.5M Tris-HClバッファー (pH9) 1mlに懸濁し、マルチビーズショッカー (安井器械社製) 及びガラスビーズ (0.1mmφ) を用いて、2500rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を8000rpm、4℃にて10分間遠心分離し、遠心上清液約0.7mlを得た。

得られた遠心上清液の0.1ml、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の40%水溶液を0.4ml、NAD⁺ 10mg、及び硫酸アンモニウム20mgを混合し、30℃で18時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。85.1g/LのL-メチオニンが生成していることがわかった。反応に用いた2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸の量に対してL-メチオニン収率は21.5%であった。

[0171] (含量分析条件)

カラム: UNISON UK-C18(4.6mmφ×25cm、3μm)

移動相: 50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%) : B液(%) = 90 : 10の割合で混合

流量: 0.8ml/分

カラム温度: 37℃

検出: 210nm

[0172] (2) 改変アミノ酸配列V109I/G191D/Q246Rを有する本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチドを含有する本発明組換えベクター(ABC)を保有する形質転換体

プラスミドpTrcLD(A113G)nh/774ch/43SCMchを用いてE. coli JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を0.1mMのIPTGと50μg/mlのアンピシリンとを含有する滅菌LB培地20mlに接種し、30℃、15時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得た。この湿菌体約0.1gを0.5M Tris-HClバッファー (pH9) 1mlに懸濁し、マルチビーズショッカー (安井器械社製) 及びガラスビーズ (0.1mmφ) を用いて

、2500rpmにて20分間破碎処理した。得られた破碎液を8000rpm、4℃にて10分間遠心分離し、遠心上清液約0.7mlを得た。

得られた遠心上清液の0.1ml、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸(東京化成社製)の40%水溶液を0.4ml、NAD⁺10mg、及び硫酸アンモニウム20mgを混合し、30℃で2時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。82.5g/LのL-メチオニンが生成していることがわかった。反応に用いた2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸の量に対してL-メチオニン収率は20.8%であった。

[0173] (含量分析条件)

カラム：UNISON UK-C18(4.6mmφ×25cm、3μm)

移動相：50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%)：B液(%)=90：10の割合で混合

流量：0.8ml/分

カラム温度：37℃

検出：210nm

[0174] 実施例11 (本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)を用いたL-α-アミノ酸化合物の製造)

[0175] (1) 配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)を用いたL-α-アミノ酸化合物の製造

実施例2(1)で調製された本発明タンパク質(B)の精製酵素液(40gタンパク質/L)の2倍希釈液0.1mlと、実施例2(2)で調製された本発明タンパク質(A)の精製酵素液(9gタンパク質/L)の2倍濃縮液0.1mlと、実施例3(4)で調製されたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(32.6gタンパク質/L)の2倍希釈液0.1mlとを混合し、Amicon Ultra-15(ミリポア社製)にて濃縮し、0.1mlの精製酵素混合液を得た。得られた精製酵素混合液0.1ml、ア

ンモニア水を用いpH9に調製したDL- α -ヒドロキシイソカプロン酸 (ACROS ORGANICS社製) の40%水溶液を0.1ml、NAD+10mg、0.5M Tris-HCl緩衝液 (pH9.0) 0.3ml、及び硫酸アンモニウム20mgを混合し、30℃で18時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。反応に用いたDL- α -ヒドロキシイソカプロン酸の量に対してL-ロイシンは60.9%生成していることがわかった。

[0176] (含量分析条件)

カラム: UNISON UK-C18(4.6mm ϕ ×25cm、3 μ m)

移動相: 50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%):B液(%)=90:10の割合で混合

流量: 0.8ml/分

カラム温度: 37℃

検出: 210nm

[0177] (2) 改変アミノ酸配列V109I/G191D/Q246Rを有する本発明タンパク質(A)、本発明タンパク質(B)及び本タンパク質(C)を用いたL- α -アミノ酸化合物の製造

実施例2(1)で調製された本発明タンパク質(B)の精製酵素液(40gタンパク質/L)の2.5倍希釈液0.1mlと、実施例8(1)でpTrc4.3SCcHis-g325a/g572a/a737g形質転換体から調製された本発明タンパク質(A)の精製酵素液(3.2gタンパク質/L)の4.5倍濃縮液0.1mlと、実施例3(4)で調製されたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(32.6gタンパク質/L)の2倍希釈液0.1mlとを混合し、Amicon Ultra-15(ミリポア社製)にて濃縮し、0.1mlの精製酵素混合液を得た。得られた精製酵素混合液0.1ml、アンモニア水を用いpH9に調製したDL- α -ヒドロキシイソカプロン酸 (ACROS ORGANICS社製) の40%水溶液を0.1ml、NAD+10mg、0.5M Tris-HCl緩衝液 (pH9.0) 0.3ml、及び硫酸アンモニウム20mgを混合

し、30℃で18時間振とうした。この反応液につき下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析を行った。反応に用いたDL- α -ヒドロキシソカプロン酸の量に対してL-ロイシンは88.0%生成していることがわかった。

[0178] (含量分析条件)

カラム：UNISON UK-C18(4.6mm ϕ ×25cm、3 μ m)

移動相：50mM リン酸を含む12mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液(A液)とアセトニトリル(B液)をA液(%)：B液(%)=90：10の割合で混合

流量：0.8ml/分

カラム温度：37℃

検出：210nm

産業上の利用可能性

[0179] 本発明によれば、酸化酵素、それをコードするポリヌクレオチド、及びそれらを利用した、メチオニン、ロイシン等の α -アミノ酸化合物の製造法等が提供可能となる。

[配列表フリーテキスト]

[0180] 配列番号9-12

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号13

デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド

配列番号14-41

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号44-45

設計されたアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1]

下記 (A1) から (A5) のいずれかのアミノ酸配列:

(A1) 配列番号3で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して85%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換か

らなる群から選ばれる 1 以上のアミノ酸置換を有する改変アミノ酸配列であって、かつ、i i) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；
をコードするポリヌクレオチド。

[請求項2] 前記アミノ酸配列をコードする塩基配列のコドン使用頻度を大腸菌のコドン使用頻度に合わせるように選択されたコドンを含む改変された塩基配列を有する請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

[請求項3] 宿主細胞内において機能可能なプロモーターと請求項 1 または 2 記載のポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド。

[請求項4] 請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

[請求項5] 請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド又は請求項 4 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

[請求項6] 宿主細胞が微生物または大腸菌である請求項 5 記載の形質転換体。

[請求項7] 請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを保有する形質転換体。

[請求項8] 宿主細胞内で複製可能なベクターに、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを組み込む工程を含む組換えベクターの製造方法。

[請求項9] 請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入する工程を含む形質転換体の製造方法。

[請求項10] 下記 (B1) から (B4) のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列、

(B2) i) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) i) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号 2 で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

をコードするポリヌクレオチド。

[請求項11] 宿主細胞内において機能可能なプロモーターと請求項 10 記載のポリヌクレオチドとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド。

[請求項12] 請求項 10 または 11 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベ

クター。

[請求項13] 請求項10または11記載のポリヌクレオチド又は請求項12記載の組換えベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

[請求項14] 宿主細胞が微生物または大腸菌である請求項13記載の形質転換体。

[請求項15] 請求項10または11記載のポリヌクレオチドを保有する形質転換体。

[請求項16] 宿主細胞内で複製可能なベクターに、請求項10または11記載のポリヌクレオチドを組み込む工程を含む組換えベクターの製造方法。

[請求項17] 請求項10または11記載のポリヌクレオチドまたは請求項12記載の組換えベクターを宿主細胞に導入する工程を含む形質転換体の製造方法。

[請求項18] 請求項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと請求項10または11記載のポリヌクレオチドとを含有する組換えベクター。

[請求項19] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチドをさらに含む請求項18記載の組換えベクター。

[請求項20] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質がロイシン脱水素酵素である請求項19記載の組換えベクター。

[請求項21] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列が、下記(C1)から(C3)のいずれかのアミノ酸配列：

(C1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(C2) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の

配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、i i) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(C3) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、i i) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；

である請求項19または20記載の組換えベクター。

[請求項22] 請求項18から21のいずれか一項に記載の組換えベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

[請求項23] 宿主細胞が微生物または大腸菌である請求項22記載の形質転換体。

[請求項24] i) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、または、当該ポリヌクレオチドと宿主細胞内において機能可能なプロモーターとが機能可能な形で接続されてなるポリヌクレオチド、

i i) 請求項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、及び

i i i) 請求項10または11記載のポリヌクレオチド；
を保有する形質転換体。

[請求項25] 下記(A1)から(A5)のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号3で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して85%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、i i) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ

ーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸置換を有する改変アミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソーイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；
を有するタンパク質。

[請求項26] 下記 (B1) から (B4) のいずれかのアミノ酸配列:

(B1) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列、

(B2) i) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) i) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号 2 で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列;

を有するタンパク質。

[請求項27] (1) 下記 (A1) から (A5) のいずれかのアミノ酸配列:

(A1) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列に対して 85%以上の

配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、i i) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、i i) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A4) i) 配列番号4または13で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、i i) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A5) i) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において、109番目のバリンのイソロイシンへの置換、191番目のグリシンのアスパラギン酸への置換及び246番目のグルタミンのアルギニンへの置換からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸置換を有する改変アミノ酸配列であって、かつ、i i) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシーイソカプロン酸誘導体を酸化

して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

を有するタンパク質と、

下記 (B1) から (B4) のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列、

(B2) i) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(B3) i) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(B4) i) 配列番号 2 で示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力と、 α -ヒドロキシ-イソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソ-イソカプロン酸誘導体に変換する能力とのいずれか又は両者を有するタンパク質のアミノ酸配列；

を有するタンパク質とのいずれか又は両者を、

α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させて、対応する α -オキソカルボン酸化合物を得る工程、及び

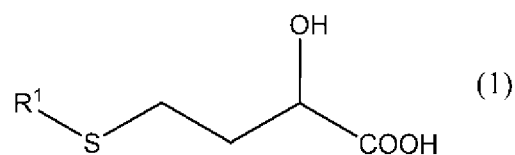
(2) α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質を、工程(1)で得られた α -オキソカルボン酸化合物に作用させて、対応するL- α -アミノ酸化合物を得る工程、
を含むL- α -アミノ酸化合物の製造方法。

[請求項28]

α -ヒドロキシカルボン酸化合物が含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が含硫 α -オキソカルボン酸化合物であり、対応するL- α -アミノ酸化合物が含硫L- α -アミノ酸化合物であり、工程(1)において α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるタンパク質が、2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力を少なくとも有するタンパク質である請求項27記載の製造方法。

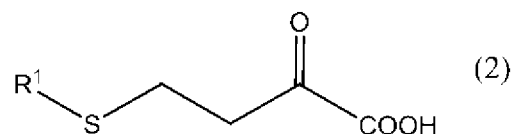
[請求項29]

含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物が式(1)：



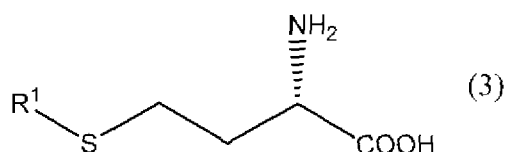
式中、R1は水素又は置換されていてもよい炭素数1-8のアルキル基を表す；

で示される化合物であり、含硫 α -オキソカルボン酸化合物が、式(2)：



式中、R1は前記と同じ意味を表す；

で示される化合物であり、含硫L- α -アミノ酸化合物が、式(3)：



式中、R 1 は前記と同じ意味を表す；

で示される化合物である、請求項 2 8 記載の製造方法。

[請求項30] α -ヒドロキシカルボン酸化合物が α -ヒドロキシイソカプロン酸であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が α -オキソイソカプロン酸であり、対応するL- α -アミノ酸化合物がL-ロイシンであり、工程（1）において α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるタンパク質が、 α -ヒドロキシイソカプロン酸誘導体を酸化して対応する α -オキソイソカプロン酸誘導体に変換する能力を少なくとも有するタンパク質である請求項 2 7 記載の製造方法。

[請求項31] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質がロイシン脱水素酵素である請求項 2 7 から 3 0 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項32] α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列が、下記（C1）から（C3）のいずれかのアミノ酸配列：

（C1）配列番号 7 で示されるアミノ酸配列、

（C2） i ）配列番号 7 で示されるアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、 i i ） α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

（C3） i ）配列番号 7 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、 i i ） α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；

である請求項27から31のいずれか一項に記載の製造方法。

〔請求項33〕 工程（1）において α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させるタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される請求項27から32のいずれか一項に記載の製造方法。

〔請求項34〕 前記形質転換体が、請求項5、6、7、13、14、15、22、23または24のいずれか一項に記載の形質転換体である請求項33記載の製造方法。

〔請求項35〕 α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力を有するタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される請求項27から34のいずれか一項に記載の製造方法。

〔請求項36〕 前記形質転換体が、請求項22、23または24のいずれか一項に記載の形質転換体である請求項35記載の製造方法。

〔請求項37〕 工程（1）が、還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を酸化型に変換する能力を有するタンパク質の存在下で行われる請求項27から36のいずれか一項に記載の製造方法。

〔請求項38〕 還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を酸化型に変換する能力を有するタンパク質が α -オキソカルボン酸化合物をアミノ化して対応するL- α -アミノ酸化合物に変換する能力をさらに有するタンパク質である請求項37記載の製造方法。

〔請求項39〕 還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を酸化型に変換する能力を有するタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレ

オチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される請求項 37 または 38 記載の製造方法。

[請求項40] 工程（2）が、酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質の存在下で行われる請求項 27 から 39 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項41] 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質が α -ヒドロキシカルボン酸化合物を酸化して対応する α -オキソカルボン酸化合物に変換する能力をさらに有するタンパク質である請求項 40 に記載の製造方法。

[請求項42] 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質が、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されてなる形質転換体若しくはその処理物に含まれる形態で反応系に提供される請求項 40 または 41 記載の製造方法。

[請求項43] 工程（1）と工程（2）とが一つの反応系で行われる請求項 27 から 42 のいずれか一項に記載の製造方法。