

明 細 書

発明の名称：

ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質および該タンパク質をコードするDNA、微生物分解製剤ならびに微生物分解方法

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質および該タンパク質をコードするDNA、微生物分解製剤ならびに微生物分解方法に関する。

背景技術

[0002] 活性汚泥法により污水浄化を行うと、除去した有機物が微生物（細菌）を含んだフロックとなり、余剰汚泥と呼ばれる汚泥が発生する。廃水処理設備から排出される余剰汚泥は産業廃棄物の中で20%以上もの割合を占める。一般的に余剰汚泥は、脱水、乾燥後、焼却処理される（非特許文献1：平成30年度事業、産業廃棄物排出・処理状況調査報告書、平成28年度実績（概要版）、非特許文献2：山本昌幸、「下水の燃焼技術について」、日本燃料学会誌、一般社団法人日本燃焼学会、2011、第53巻、164号、p91－96）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：「平成30年度事業、産業廃棄物排出・処理状況調査報告書、平成28年度実績（概要版）」[online]、平成31年3月、環境省環境再生・資源循環局廃棄物規制課[令和2年3月17日検索]、インターネット<URL: <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000031887949&fileKind=2>>

非特許文献2：山本昌幸、「下水の燃焼技術について」、日本燃料学会誌、一般社団法人日本燃焼学会、2011、第53巻、164号、p91－96

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかしながら、余剰汚泥を焼却処理すると温室効果ガスが発生するため、環境への配慮から、余剰汚泥を減容化することが求められている。余剰汚泥を減容化する方法として、余剰汚泥を構成する微生物を分解する方法が提案される。

[0005] 本発明は、ペプチドグリカン分解し得る新規のタンパク質および該タンパク質をコードするDNA、微生物分解製剤ならびに微生物分解方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、以下に例示される[1]～[11]に関する。

[1] *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779
に由来し、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質。

[2] 分泌タンパク質である、[1]に記載のタンパク質。

[3] 下記(A1)～(A3)のいずれかのタンパク質：

(A1) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、

(A2) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、

(A3) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質。

[4] 前記ペプチドグリカン分解活性は、N-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンとの間のグリコシド結合を分解する活性である、[1]～[3]のいずれかに記載のタンパク質。

[5] 下記(a1)～(a4)のいずれかのタンパク質：

(a1) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(a2) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1位のAla

がM e t に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(a 3) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1位のA l a がM e t に置換され、該M e t のN末端に配列番号21に記載のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(a 4) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1位のA l a のN末端にM e t が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[6] 下記(B 1)～(B 3)のいずれかのタンパク質：

(B 1) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、

(B 2) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、

(B 3) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質。

[7] 前記ペプチドグリカン分解活性は、N-アセチルムラモイル-アラニンアミダーゼ活性である、[1]、[2]または[6]に記載のタンパク質。

[8] 下記(b 1)～(b 4)のいずれかのタンパク質：

(b 1) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b 2) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1位のG l u がM e t に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b 3) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1位のG l u がM e t に置換され、該M e t のN末端に配列番号21に記載のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b 4) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1位のG l u のN末端にM e t が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[9] [1]～[8]のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA

。

[10] [9]に記載のDNAを含むベクター。

[11] [9]に記載のDNAまたは[10]に記載のベクターを含む形質転換体。

[12] [1]～[8]のいずれかに記載のタンパク質、ならびに[11]に記載の形質転換体およびその培養物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含む微生物分解剤。

[13] [1]～[8]のいずれかに記載のタンパク質、ならびに[11]に記載の形質転換体およびその培養物からなる群より選ばれる少なくとも1つを標的微生物に作用させる工程を含む微生物分解方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、ペプチドグリカンを分解し得る新規のタンパク質および該タンパク質をコードするDNA、微生物分解剤ならびに微生物分解方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]代表的なペプチドグリカンの構造およびペプチドグリカン分解酵素によって切断され得る部位を示す図である。

[図2]実験4において、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779添加後の余剰汚泥の乾燥重量を示した図である。

[図3]実験6において、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の培養上清をカラムクロマトグラフィーによって分画し、ペプチドグリカン分解活性を調べた図である。

[図4]実験6において、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の培養上清をカラムクロマトグラフィーによって分画し、溶出画分に含まれるタンパク質を電気泳動により検出した図である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0010] [Tumebacillus sp. NITE BP-02779に由来するタンパク質]

本発明の一実施形態に係るタンパク質は、Tumebacillus sp. NITE BP-02779（以下、「NITE BP-02779」と記載することがある。）に由来し、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質である。タンパク質は、合成されたタンパク質であってよく、精製または単離されたタンパク質であってよい。あるタンパク質が本発明に係るタンパク質であるかどうかは、後述するタンパク質の同定方法およびペプチドグリカン分解活性の測定方法の結果に基づいて判断できる。NITE BP-02779に由来し、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質は、標的微生物を分解し得るため、余剰汚泥を減容化することができる。

[0011] NITE BP-02779は、2018年9月11日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目5番地8 122号室）に国際寄託され、2018年9月26日付で原寄託についての受託証および生存に関する証明書が発行された細菌である。NITE BP-02779は、Tumebacillus属細菌の新種と考えられる。NITE BP-02779は、Bacillus、Micrococcus、Staphylococcus等の様々な標的微生物および余剰汚泥を分解可能であることから、余剰汚泥処理に有用である。NITE BP-02779の菌学的性質については、後述する実施例の表1～4に示す。NITE BP-02779は、配列番号10に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する細菌である。

[0012] 「NITE BP-02779に由来し」とは、NITE BP-02779によってある物質が合成もしくは生成されることであってもよいし、NITE BP-02779のゲノム配列を基にすることであってもよく、例えばNITE BP-02779のゲノム配列を基にして、ある物質が人工

的または他の生物の細胞内で合成もしくは生成されることであってもよい。
N I T E B P - 0 2 7 7 9 に由来する物質としては、例えばタンパク質、
核酸、糖などの生体分子および代謝物産物等が挙げられる。これらは、産生
されたのちに細胞内に局在していてもよく、細胞外に分泌されてもよい。

[0013] あるタンパク質が、N I T E B P - 0 2 7 7 9 に由来するタンパク質で
あるかを調べる方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、次世
代シーケンサーによりN I T E B P - 0 2 7 7 9 のゲノム配列を解読する。
得られた塩基配列からアダプター配列をトリミングし、d e n o v o ア
センブルを行う。d e n o v o アセンブルで得られたスキファールド配
列を解析し、遺伝子領域予測およびアノテーションを行い、質量分析用のタ
ンパク質データベースを作製する。次に、対象タンパク質を質量分析にかけ
、上記タンパク質データベースと照合することにより、対象タンパク質がN
I T E B P - 0 2 7 7 9 に由来するタンパク質であるか判断可能である。

[0014] あるタンパク質が、N I T E B P - 0 2 7 7 9 に由来するタンパク質で
あるかを調べる別の方法として、アミノ酸シーケンサーにより対象タンパク
質のアミノ酸配列を解読して、上記タンパク質データベースと照合してもよ
い。

[0015] N I T E B P - 0 2 7 7 9 に由来し、かつペプチドグリカン分解活性を
有するタンパク質は、好ましくは分泌タンパク質である。分泌タンパク質は
、細胞外ではたらくことができる。余剰汚泥を減容化するためには、ペプチ
ドグリカン分解活性を有するタンパク質は、細胞外の環境でペプチドグリカ
ン分解活性を有することが有用である。ペプチドグリカン分解活性を有する
分泌タンパク質は、該タンパク質を産生している細胞の培養上清から回収し
てもよいし、該タンパク質を産生している細胞を破壊して回収してもよい。

[0016] ペプチドグリカンとは、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) とN
- アセチルムラミン酸 (M u r N A c) とが交互に β 1 , 4 結合した多糖が
、オリゴペプチドで架橋された分子である。図1に代表的なペプチドグリカ
ンの構造を示す。「ペプチドグリカン分解活性」とは、ペプチドグリカンが

、2種以上の物質に変化する反応が促進される状態をいい、「ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質」（以下、「ペプチドグリカン分解酵素」と記すことがある。）とは、上記反応を促進するタンパク質をいう。

[0017] ペプチドグリカンは、多糖を構成する糖間のグリコシド結合や、オリゴペプチド内のペプチド結合等が分解されることにより、効率よく分解される。ペプチドグリカン分解酵素によって分解され得る部位を図1中に矢印で示す。ペプチドグリカンを分解する活性を有するタンパク質としては、（1）N－アセチルグルコサミンとN－アセチルムラミン酸間のグリコシド結合を分解する活性を有するタンパク質、（2）N－アセチルムラミン酸とN－アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性を有するタンパク質、（3）N－アセチルムラミン酸とL－アラニン間のアミド結合を分解する活性を有するタンパク質、（4）各ペプチド結合を分解する活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0018] 具体的には、（1）としてN－アセチルグルコサミニダーゼ、（2）としてN－アセチルムラミダーゼ、リティックトランスグリコシラーゼ、（3）としてN－アセチルムラモイル－L－アラニンアミダーゼ、（4）としてL，D－エンドペプチダーゼ、D，L－エンドペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、D，D－エンドペプチダーゼが挙げられる。

[0019] ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質であるかどうかを調べる方法としては、例えば対象タンパク質とペプチドグリカンとを緩衝液中で一定時間反応させた後、ペプチドグリカンの分解を測定する方法が挙げられる。分解を調べる方法としては、特に限定はされないが、例えばペプチドグリカンの濁度を測定する方法、S L P 試薬によりペプチドグリカンを検出する方法、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）；質量分析法（M S）；薄層クロマトグラフィー（T L C）；核磁気共鳴（N M R）；ガスクロマトグラフィー（G C）等を用いてペプチドグリカン由来の分解物を検出する方法等が挙げられる。

[0020] ペプチドグリカン分解活性のうちの（2）N－アセチルムラミン酸とN－

アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性を有するタンパク質であるかどうかを調べる方法として、*Micrococcus lysodeikticus*を基質とする方法が挙げられる。具体的には、*Micrococcus lysodeikticus*の培養菌体を基質として用いてもよいし、Lysozyme activity kit (Sigma-Aldrich社製)、EnzChek Lysozyme assay kit (ThermoFisher Scientific社製)等を使用してもよい。

[0021] ペプチドグリカン分解活性のうちの(3) N-アセチルムラミン酸とL-アラニン間のアミド結合を加水分解するアミダーゼ活性を調べる方法としては、Appl Microbiol Biotechnol. 2015, Oct, 99(20):8563-73に記載されているような、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼの基質であるL-アニリン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (Sigma-Aldrich社製)を使用する方法が挙げられる。

[0022] [配列番号2または4に記載のタンパク質]

本発明の一実施形態に係るタンパク質は、下記のいずれかのタンパク質である。

(A1) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質

(B1) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質

[0023] 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列および配列番号4の1～493位のアミノ酸配列は、NITE BP-02779のゲノム配列から予測されたタンパク質の成熟体のアミノ酸配列である。タンパク質がペプチドグリカン分解活性を有するかどうかは、例えば上述の方法によって判断することができる。ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質は、標的微生物を分解し得るため、余剰汚泥の減容化することができる。

[0024] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、ペプチドグリカン分解活性が維持されている限り、配列番号2の1～164位のアミノ酸配列または配列番号4の1～493位のアミノ酸配列を有するタンパク質のバリエーションであってもよい。ペプチドグリカン分解活性が維持されたバリエーションを「保存的バリエーション」という場合がある。本発明において、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質として特定されるタンパク質には、上述のタンパク質に加えて、その保存的バリエーション、およびそれらのタンパク質と他のペプチドとの融合タンパク質が含まれる。

以下、ペプチドグリカン分解酵素の保存的バリエーションについて例示する。

[0025] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、ペプチドグリカン分解活性が維持されている限り、配列番号2の1～164位のアミノ酸配列または配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。「1もしくは数個」とは、タンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置および種類等によっても異なるが、例えば1～10個、1～8個、1～5個、または1～3個であってもよい。

[0026] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、ペプチドグリカン分解活性が維持されている限り、配列番号2の1～164位のアミノ酸配列または配列番号4の1～493位のアミノ酸配列に対して、高い同一性、例えば90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、または99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

[0027] 上記のアミノ酸残基の変異は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。代表的な保存的変異は、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、P h e、T r p、T y r間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、L e u、I l e、V a l間で、極性アミノ酸である場合には、G l n、A s n間で、塩基性アミノ酸である場合には、L y s、A r g、H i s間で、酸性アミノ酸である場合には、A s p、G l u間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、S e

r、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSerまたはThrへの置換、ArgからGln、HisまたはLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、HisまたはAspへの置換、AspからAsn、GluまたはGlnへの置換、CysからSerまたはAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、AspまたはArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、LysまたはAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、ArgまたはTyrへの置換、IleからLeu、Met、ValまたはPheへの置換、LeuからIle、Met、ValまたはPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、HisまたはArgへの置換、MetからIle、Leu、ValまたはPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、IleまたはLeuへの置換、SerからThrまたはAlaへの置換、ThrからSerまたはAlaへの置換、TrpからPheまたはTyrへの置換、TyrからHis、PheまたはTrpへの置換、および、ValからMet、IleまたはLeuへの置換が挙げられる。アミノ酸残基の変異には、タンパク質が由来する生物の個体差、種の違い等に基づく天然に生じる変異（mutantまたはvariant）によって生じる変異も含まれる。

[0028] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、他のペプチドとの融合タンパク質であってもよい。他のペプチドとしては、マーカーペプチド（マーカータンパク質）、ペプチドタグ、およびプロ配列またはプレプロ配列、例えば分泌シグナルペプチド等が挙げられる。ペプチドグリカン分解酵素に連結されるペプチドは1種だけでもよく、2またはそれ以上のペプチドであってもよい。ペプチドグリカン分解酵素がシグナルペプチドとの融合タンパク質の場合は、分泌可能な宿主細胞中で発現した後、シグナルペプチドが切断されてペプチドグリカン分解酵素部分（成熟タンパク質）のみが細胞外に分泌され得る。ペプチドグリカン分解酵素が融合タンパク質の場合、上記の同一性は、他のペプチド部分を除いた成熟タンパク質部分における同一性である。

[0029] マーカーペプチドとしては、マーカーとして機能し得るペプチドであれば特に制限されるものではなく、例えばアルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFP等が挙げられる。ペプチドタグとしては、特に制限されないが、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグ等の従来知られているペプチドタグが挙げられる。分泌シグナルペプチドとしては、NITE BP-02779が有するペプチドグリカン分解酵素自体の分泌シグナルペプチドの他、ペプチドグリカン分解酵素を発現させる宿主で機能し得る分泌シグナルペプチドを用いることができる。融合タンパク質は、常法により作製することができる。

[0030] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、下記(a1)～(a4)のいずれかのタンパク質であってよい。

(a1) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(a2) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1位のAlaがMetに置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(a3) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1位のAlaがMetに置換され、該MetのN末端にMetGlySerSerHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHis(配列番号21)に記載のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(a4) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1位のAlaのN末端にMetが付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0031] 本発明の一実施形態に係るタンパク質は、下記(b1)～(b4)のいずれかのタンパク質であってよい。

(b1) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b2) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1位のGluがMetに置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b3) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1位のGluがMetに置換され、該MetのN末端に配列番号21に記載のアミノ酸配

列が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b4) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1位のG l uのN末端にM e t が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0032] 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列からなるタンパク質は、上記のペプチドグリカン分解活性のうち(2) N-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンとの間のグリコシド結合を分解する活性を有すると考えられる。(A1) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、(A2) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、(A3) 配列番号2の1～164位のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質は、好ましくは上記のペプチドグリカン分解活性のうち(2) N-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンとの間のグリコシド結合を分解する活性を有する。

[0033] 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列からなるタンパク質は、上記のペプチドグリカン分解活性のうち(3) N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ活性を有すると考えられる。(B1) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、(B2) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質、(B3) 配列番号4の1～493位のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質は、好ましくは上記のペプチドグリカン分解活性のうち(3) N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ活性を有する。

[0034] (A1)～(A3)および(B1)～(B3)に係るタンパク質は、合成されたタンパク質であってよく、精製または単離されたタンパク質であって

よい。(A1)～(A3)および(B1)～(B3)に係るタンパク質は、NITE BP-02779に由来するタンパク質であってよく、人工的またはNITE BP-02779もしくは他の生物の細胞内で合成もしくは生成されたタンパク質であってもよい。

[0035] [ペプチドグリカン分解酵素をコードするDNA]

本発明に係るDNAは、上述のタンパク質をコードするDNAである。具体的には、配列番号2の1～164位のアミノ酸配列をコードするDNA、配列番号4の1～493位のアミノ酸配列をコードするDNA、およびこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の保存的バリエーションをコードするDNAが挙げられる。本発明の一実施形態に係るDNAは、配列番号1の205～696位の塩基配列または配列番号3の85～1563位の塩基配列を有するDNAであってもよい。配列番号1および3は、NITE BP-02779のゲノム配列に基づく塩基配列であり、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質の成熟体をコードする。本発明に係るDNAは、上記の塩基配列の5'末端側に開始コドンおよび／または他のペプチドをコードする塩基配列を含んでいてもよく、上記の塩基配列の3'末端に終始コドンを含んでいてもよい。DNAは、組換えDNAであってもよい。DNAは、合成されたDNAであってよく、相補的DNA(cDNA)であってもよい。DNAは、精製または単離されたDNAであってよい。

[0036] 本発明に係るDNAは、NITE BP-02779が有する配列からなるDNAに限定されず、コード領域において各アミノ酸をコードするコドンを同じアミノ酸をコードする他の等価のコドンに置換した塩基配列を含むDNAであってもよい。本発明の一実施形態に係るDNAは、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質の発現を向上させるように、コドン出現頻度(codon usage)を変更した塩基配列を含むDNAであってもよい。

[0037] 本発明の一実施形態に係るDNAには、上記塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブ、または上記相補的な塩基配列から調製され得るプローブ

とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質をコードするDNAも含まれる。ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、同一性が高いDNA同士、例えば50%以上、65%以上、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより同一性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。また、例えばプローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

- [0038] 2つの配列間の同一性の割合は、例えば数学的アルゴリズムを用いて決定できる。数学的アルゴリズムの例としては、MyersおよびMiller (1988) CABIOS、4:11-17に記載のアルゴリズム、Smith et al (1981) Adv. Appl. Math. 2:482に記載の局所ホモロジーアルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453に記載のホモロジーアライメントアルゴリズム、PearsonおよびLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448に記載の類似性を検索する方法、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:587-5877に記載の、改良されたKarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:2264のアルゴリズムが挙げられる。

[0039] これらの数学的アルゴリズムに基づくプログラムを利用して、配列同一性を決定するための配列比較（アラインメント）を行うことができる。プログラムは、適宜、コンピュータにより実行することができる。このようなプログラムとしては、特に限定されないが、PC／GeneプログラムのCLUSTAL (Intelligenetics, Mountain View, Calif. から入手可能)、ならびにALIGNプログラム (Version 2.0)、Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USAから入手可能) のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA等が挙げられる。これらのプログラムを用いたアライメントは、例えば初期パラメーターを用いて行うことができる。CLUSTALプログラムについては、Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244、Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153、Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:1088-1090、Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-165およびPearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331によく記載されている。

[0040] 対象のタンパク質をコードする塩基配列と同一性がある塩基配列を得るために、例えばBLASTヌクレオチド検索を、BLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12にて行うことができる。対象のタンパク質と同一性があるアミノ酸配列を得るために、例えばBLASTタンパク質検索を、BLASTXプログラム、スコア=50、ワード長=3にて行うことができる。BLASTヌクレオチド検索やBLASTタンパク質検索については、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。比較を目的としてギャップを加えたアライメントを得るために、Gapped BLAST (BLAST 2.0) を利用できる。PSI-BL

AST (BLAST 2.0) を、配列間の離間した関係を検出する反復検索を行うために利用できる。Gapped BLAST および PSI-BLAST については、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 を参照されたい。BLAST、Gapped BLAST、または PSI-BLAST を利用する場合、各プログラム（例えば塩基配列に対して BLASTN、アミノ酸配列に対して BLASTX）の初期パラメーターが用いられ得る。アライメントは、手動にて行われてもよい。

[0041] 2つの配列間の同一性は、2つの配列を最大一致となるように整列したときに2つの配列間で一致する残基の比率として算出される。

[0042] 本発明に係るDNAは、化学合成することによって、または、NITE BP-02779 からPCR等によって得ることができる。

[0043] [ベクター]

本発明に係るベクターは、上記のDNAを含有する。ベクターは、DNAを増幅、維持できる核酸分子であり、発現ベクターまたはクローニングベクターであることができる。本発明に係るベクターは、通常の遺伝子工学的手法に準じて基本ベクターに上記のDNAを組み込むことにより構築すればよい。基本ベクターは、例えば宿主細胞中で自立的に複製可能であり、宿主細胞からの単離および精製が可能であり、検出可能なマーカーを有する。本発明に係るDNAは、例えば遺伝子導入される宿主細胞において利用可能な発現ベクターに挿入され、ベクターは、宿主細胞へ導入されることによって宿主細胞においてペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質を発現させることができる。

[0044] 基本ベクターは、例えば細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、ファージミドベクター、人工染色体ベクター等であってよい。基本ベクターとしては、pBR322、pUCプラスミドベクター、pET系プラスミドベクター等が挙げられる。具体的には、大腸菌を宿主細胞とする場合には、例えばベクターp

UC19、pUC18、pUC119（宝酒造社製）、ファージミドpBluescriptII（Stratagene社製）、pET28a（+）ベクターおよびpET22b（+）ベクター（メルクミリポア社）等を挙げることができる。出芽酵母を宿主細胞とする場合には、例えばベクターpGBT9、pGAD424、pACT2（Clontech社製）等を挙げることができる。哺乳動物細胞を宿主細胞とする場合には、例えばpRc/RSV、pRc/CMV（Invitrogen社製）等のベクター、ウシバピローマウイルスベクターpBPV（アマシャムファルマシアバイオテク社製）、EBウイルスベクターpCEP4（Invitrogen社製）、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等を挙げることができる。昆虫細胞を宿主細胞とする場合には、例えばバキュロウイルスベクターを挙げることができる。

[0045] 自律複製起点（ori）を有する基本ベクターを用いて本発明に係るベクターを構築すると、当該ベクターは宿主細胞に導入された際にエピソームとして細胞内に保持される。SV40のoriが組み込まれたベクターは、例えばoriを欠失したSV40ゲノムで形質転換されたCOS細胞等に導入されると、細胞内でベクターのコピー数を非常に増大させることができる。

[0046] 発現ベクターは、組み込まれた遺伝子を発現するためのプロモーター配列およびターミネーター配列を有してもよい。プロモーターは、宿主細胞において機能するプロモーターであれば特に制限されない。「宿主において機能するプロモーター」とは、宿主においてプロモーター活性を有し、組み込まれた遺伝子の発現を制御できるプロモーターをいう。一般的に、基本ベクターに組み込まれるDNA配列は、プロモーターの下流に、プロモーターが機能可能な状態で挿入される。例えば基本ベクターには、プロモーター配列の下流にクローニング部位が設けられている。基本ベクターは、選択マーカー配列を有していてもよい。

[0047] プロモーターは、宿主由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプ

ロモーターであってもよい。プロモーターは、ペプチドグリカン分解酵素遺伝子固有のプロモーターであってもよく、他の遺伝子のプロモーターであってもよい。宿主細胞が大腸菌である場合には、プロモーターは、例えば大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター（*lacP*）、トリプトファンオペロンのプロモーター（*trpP*）、アルギニンオペロンのプロモーター（*argP*）、ガラクトースオペロンのプロモーター（*galP*）、*tac*プロモーター、*T7*プロモーター、*T3*プロモーター、 λ ファージのプロモーター（ λ -*pL*、 λ -*pR*）等を挙げることができる。宿主細胞が動物細胞または分裂酵母である場合には、プロモーターは、例えばラウス肉腫ウイルス（*RSV*）プロモーター、サイトメガロウイルス（*CMV*）プロモーター、シミアンウイルス（*SV40*）の初期または後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス（*MMTV*）プロモーター等を挙げることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合には、プロモーターは、例えば*ADH1*プロモーター等を挙げることができる。*ADH1*プロモーターは、例えば*ADH1*プロモーターおよび同ターミネーターを保持する酵母発現ベクター *pAAH5*〔Washington Research Foundationから入手可能、Ammererら、*Method in Enzymology*、101 part (p. 192-201)〕から通常の遺伝子工学的的方法により調製することができる。*ADH1*プロモーターを有するベクター *pACT2*は、*ADH1*プロモーターの下流に目的の遺伝子を挿入すれば、*CG1945*（*Clontech*社製）等の出芽酵母内で目的の遺伝子を大量発現させることができる。

[0048] [形質転換体]

本発明に係る形質転換体は、上記の本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターを含む。本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターを含む形質転換体は、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質を発現させることができる。

[0049] 本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターを導入する宿主細胞とし

ては、例えば真核生物または原核生物の細胞を用いることができ、細菌、真菌、植物細胞、動物細胞、昆虫細胞が挙げられる。宿主細胞は、好ましくは大腸菌である。宿主細胞にDNAまたはベクターを導入することにより、宿主細胞を形質転換し、形質転換体を作製できる。

[0050] 本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターは、宿主細胞内で染色体外で保持されていてもよいし、染色体内に組み込まれていてもよい。形質転換体内で、本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターは、好ましくは宿主細胞内で機能するプロモーターの制御下で遺伝子が発現可能な状態で保持されている。

[0051] 本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターを宿主細胞へ導入する方法は、宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用すればよい。大腸菌を宿主細胞とする場合には、例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis「モレキュラー・クローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)」、Cold Spring Harbor Laboratory発行(1989年)等に記載される塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法等の遺伝子導入法を挙げることができる。哺乳動物細胞または昆虫細胞を宿主細胞とする場合には、例えばリン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法等の遺伝子導入法を挙げることができる。酵母を宿主細胞とする場合には、例えばYeast transformation kit (Clontech社製)等で用いられるリチウム法等の遺伝子導入法を挙げることができる。ウイルスをベクターとして用いる場合には、上記の遺伝子導入法によって本発明に係るDNAが挿入されたウイルスのゲノムを宿主細胞に導入できるほか、該ウイルスのゲノムを含有するウイルス粒子を、宿主細胞へ感染させることによって、本発明に係るDNAを宿主細胞に導入することができる。

[0052] 本発明に係るDNAまたは本発明に係るベクターが導入された形質転換体を選抜するには、選択マーカを用いればよい。例えば本発明に係るDNA

またはベクターと同時に選択マーカー遺伝子とを宿主細胞に導入し、選択マーカーの性質に応じた方法によって培養する。例えば、選択マーカー遺伝子が宿主細胞に致死活性を示す選抜薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、当該選抜薬剤が添加された培地を用いて、本発明に係るDNAまたはベクターが導入された宿主細胞を培養すればよい。薬剤耐性を付与する遺伝子と選抜薬剤との組み合わせとしては、例えばネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシンとの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンとの組み合わせ、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子とブラストサイジンSとの組み合わせ等を挙げることができる。またマーカー遺伝子が宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、当該栄養要求性に対応する栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明に係るDNAまたはベクターが導入された宿主細胞を培養すればよい。本発明に係るDNAまたはベクターから発現する酵素の活性に基づいて形質転換体を選抜することもできる。

[0053] 本発明に係るDNAが宿主細胞の染色体内に位置する形質転換体を取得するには、例えばまず本発明に係るベクターとマーカー遺伝子を有するベクターとを制限酵素等で消化することにより直鎖状にした後、これらを上述の遺伝子導入法で宿主細胞に導入する。導入された細胞を通常数週間培養した後、マーカー遺伝子の発現量に基づき目的とする形質転換体を取得すればよい。マーカー遺伝子として選抜薬剤に対する耐性を付与する遺伝子を用いた場合、本発明に係るベクターとマーカー遺伝子を有するベクターとを上述の遺伝子導入法によって宿主細胞に導入した後、細胞を選抜薬剤が添加された培地で数週間以上継代培養し、コロニー状に残った選抜薬剤耐性クローンを純化培養することにより、本発明に係るDNAが宿主細胞の染色体に導入された形質転換体を取得することができる。本発明に係るDNAが宿主細胞の染色体に組み込まれたことを確認するには、細胞のゲノムDNAを通常の遺伝子工学的方法に準じて調製し、導入された本発明に係るDNAの部分塩基配列を有するDNAをプライマーまたはプローブとしたPCR、サザンハ

イブリダイゼーション等を行うことにより、本発明に係るDNAの存在を検出すればよい。本発明に係るDNAが宿主細胞の染色体内に組み込まれた形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、実験毎の形質転換体作製の手間を省くことができ、また、あらかじめ性質や取扱い条件の確認された形質転換体を用いて試験を実施することが可能となる。

[0054] [本発明に係るタンパク質の製造]

本発明に係るタンパク質は、例えばNITE BP-02779から取得することができる。NITE BP-02779から取得するとは、NITE BP-02779の菌体内または培養上清から取得することである。例えば、菌体内から本発明に係るタンパク質を取得する場合、適宜、菌体を破碎、溶解、または抽出等し、本発明に係るタンパク質を回収することができる。菌体は、遠心分離等により培養物から回収することができる。細胞の破碎、溶解、または抽出等は、公知の方法により行うことができる。このような方法としては、例えば超音波破碎法、ダイノミル法、ビーズ破碎、フレンチプレス破碎、リゾチーム処理が挙げられる。これらの方法は、1種を単独で用いてもよく、2種またはそれ以上を適宜組み合わせて用いてもよい。培養上清中に本発明にかかるタンパク質が蓄積する場合、遠心分離等により培養上清を取得し、培養上清から本発明に係るタンパク質を回収することができる。

[0055] 本発明に係るタンパク質の精製は、酵素の精製に用いられる公知の方法により行うことができる。そのような方法としては、例えば硫酸分画、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、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、等電点沈殿が挙げられる。これらの方法は、1種を単独で用いてもよく、2種またはそれ以上を適宜組み合わせて用いてもよい。本発明に係るタンパク質の精製は、所望の程度に行うことができる。

[0056] 本発明に係るタンパク質は、それらをコードするDNAを適当な宿主に導

入した形質転換体を用いて製造することもできる。DNAは好ましくはベクターに組み込まれて、形質転換に用いられる。本発明に係るタンパク質は、無細胞系で人工的に合成されてもよい。

[0057] 形質転換体を用いて本発明に係るタンパク質を製造する場合、形質転換体の培養は、宿主細胞を培養する方法によって行えばよい。形質転換体が微生物である場合には、例えば微生物における培養に通常使用される炭素源、窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養することができる。

[0058] 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、植物油およ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0.1～30% (w/v) 程度である。

[0059] 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・スティープ・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アンモニウム塩、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およ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0.1～30% (w/v) 程度である。

[0060] 有機塩または無機塩としては、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、炭酸塩およびリン酸塩を挙げることができる。具体的には、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およびリン酸水素二カリウムが挙げられる。これらの有機塩および／または

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

[0061] t a c プロモーター、t r c プロモーター、l a c プロモーター等のアロクトースで誘導されるプロモーターと本発明に係るDNAとが接続されて遺伝子が発現する形質転換体の場合には、本発明に係るタンパク質を生産するための誘導剤として、例えばi s o p r o p y l t h i o - β - D - g a l a c t o s i d e (IPTG) を培地中に少量加えることもできる。

[0062] 本発明に係る形質転換体の培養は、宿主細胞の培養に通常使用される方法に準じて行えばよく、例えば試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーメンター（JarFermenter）培養、タンク培養等の液体培養および固体培養が挙げられる。培養温度は、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℃～約40℃である。培地のpHは約6.0～約8.0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約1日～約5日であってよい。

[0063] 本発明に係る形質転換体を培養することにより、本発明に係るタンパク質を含有する培養物が得られる。本発明に係るタンパク質は、例えば形質転換体の菌体内および／または培養上清中に蓄積し得る。本発明に係るタンパク質が生産されたことは、例えば培養上清、菌体内抽出物等の適当な画分について、上述の方法に従ってペプチドグリカン分解活性を測定することにより確認できる。

[0064] 本発明に係るタンパク質は、上述のN I T E B P - 0 2 7 7 9と同じ方法によって、形質転換体を適宜破碎、溶解、抽出および精製して得られてもよい。本発明に係るタンパク質は、精製された本発明に係るタンパク質に限られず、本発明に係るタンパク質を含有する任意の画分を「本発明に係るタンパク質」としてペプチドグリカンの分解等の用途に利用してもよい。本発明に係るタンパク質を含有する画分は、本発明に係るタンパク質がペプチドグリカンに作用できるように含有される限り特に制限されない。そのような画分としては、例えば形質転換体、形質転換体の培養上清、破碎物、溶解物

、抽出物（無細胞抽出液）等）、それらの部分精製物（粗精製物）、およびそれらの組み合わせが挙げられる。これらの画分は、いずれも、ペプチドグリカンの分解等の用途に単独で利用されてもよいし、精製された本発明に係るタンパク質と共に利用されてもよい。培養物には、本発明に係るタンパク質とともに、本発明に係るタンパク質とは異なる他の酵素も生成および蓄積し得る。本発明に係るタンパク質は、そのような他の酵素との混合物として回収されてもよく、そのような他の酵素と分離して回収されてもよい。

[0065] [微生物分解製剤]

微生物分解製剤は、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物からなる群より選択される少なくとも1つを含む。形質転換体の培養物には、培養された形質転換体、形質転換体の培養上清、破砕物、溶解物、細胞の抽出物（無細胞抽出液）等）、それらの部分精製物（粗精製物）、およびそれらの組み合わせが含まれる。

[0066] 微生物分解製剤は、好ましくは配列番号2の1～164位のアミノ酸配列からなるタンパク質および／または配列番号4の1～493位のアミノ酸配列からなるタンパク質を含む。微生物分解製剤は、ペプチドグリカン分解活性を有する酵素を1種含んでいてもよいし、2種以上組合わせて含んでもよい。ペプチドグリカン分解活性を阻害しない限り、それ以外の成分を含んでもよい。微生物分解製剤に含まれ得る形質転換体は、1種であってもよいし、2種以上であってもよい。

[0067] 微生物分解製剤における本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物の含有量は特に限定されず、標的微生物の種類、濃度、微生物分解製剤の使用環境（反応系の容積、温度等）に応じて適宜設定すればよい。

[0068] 微生物分解製剤は、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質またはペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質を発現し得る形質転換体を含むため、ペプチドグリカンを分解することができる。微生物分解製剤は、ペプチドグリカンを有する標的微生物を分解することができる。標的微生物は

、好ましくは余剰汚泥を構成する細菌である。標的微生物は死菌であっても生菌であってもよい。微生物分解剤は、余剰汚泥の減容化に寄与することができる。

[0069] 微生物が分解されているかどうかは、当業者が通常用いる方法により確認することができる。このような確認方法としては、例えば微生物分解剤と標的微生物とを適切な培地または緩衝液中で一定時間反応させた後、培地または緩衝液中における標的微生物の分解を検出する方法が挙げられる。標的微生物の分解を検出する方法は、特に限定されないが、例えば標的微生物の濁度を測定する方法、S L P 試薬により標的微生物を検出する方法、P C R により標的微生物のD N Aを検出する方法、標的微生物の乾燥菌体重量を測定する方法、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）；質量分析法（M S）；薄層クロマトグラフィー（T L C）；核磁気共鳴（N M R）；ガスクロマトグラフィー（G C）等を用いて標的微生物由来の分解物を検出する方法等が挙げられる。上述のペプチドグリカン分解活性を調べる方法によって標的微生物が分解されているかを調べることもできる。

[0070] 濁度により標的微生物の分解を調べる場合、標的微生物を分解するとは、反応後の濁度が反応前の濁度よりも有意に低下しており、例えば反応後の濁度は、反応前の濁度の80%以下であり、好ましくは50%以下であり、より好ましくは30%以下である。乾燥菌体重量により標的微生物の分解を調べる場合、標的微生物を分解するとは、例えば反応後の乾燥菌体重量が反応前よりも有意に低下しており、例えば反応後の乾燥菌体重量は、反応前の95%以下であり、好ましくは90%以下である。

[0071] 微生物分解剤の剤形は、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物の機能が失われない限り、特に限定されない。剤形としては、例えば液体、懸濁液、粉末、固形物、カプセル封入体、またはこれらの凍結体もしくは凍結乾燥体等が挙げられる。製剤化にあたっては、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定化剤、希釈剤、界面活性剤等の添加剤を使用することができる。

[0072] 微生物分解剤は、余剰汚泥が発生する汚泥処理装置、排水処理装置等に投入して使用することができる。微生物分解剤はまた、余剰汚泥または標的微生物が蓄積されたタンク等に投入して使用することもできる。

[0073] 本発明の一態様は、微生物分解剤の製造における、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物からなる群より選ばれる少なくとも1つの使用である。

[0074] [微生物分解方法]

微生物分解方法は、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物からなる群より選択される少なくとも1つを標的微生物に作用させる工程を含む。形質転換体の培養物には、培養された形質転換体、形質転換体の培養上清、破砕物、溶解物、細胞の抽出物（無細胞抽出液）等）、それらの部分精製物（粗精製物）、それらの組み合わせが含まれる。本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物から選択される少なくとも1つを標的微生物に作用させる工程は、上記の微生物分解剤を用いて行われてもよい。

[0075] 本発明に係るタンパク質を標的微生物に作用させるとは、例えば本発明に係るタンパク質と標的微生物とを接触させることをいう。本発明に係る形質転換体を標的微生物に作用させるとは、例えば本発明に係る形質転換体を、標的微生物の存在下で培養することをいう。本発明に係る形質転換体の培養物を標的微生物に作用させるとは、例えば形質転換体の培養物、好ましくは培養物に含まれるペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質と標的微生物とを接触させることをいう。

[0076] 本発明に係る微生物分解方法によれば、ペプチドグリカンを有する標的微生物を分解することができる。標的微生物は、好ましくは余剰汚泥を構成する細菌である。標的微生物は死菌であっても生菌であってもよい。微生物分解方法によれば、余剰汚泥の減容化に寄与することができる。

[0077] 微生物分解方法は、好ましくは配列番号2の1～164位のアミノ酸配列からなるタンパク質および／または配列番号4の1～493位のアミノ酸配

列からなるタンパク質と標的微生物とを作用させる工程を含む。この工程において、ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質を1種用いてもよいし、2種以上組合わせて用いてもよい。微生物分解方法において標的微生物に作用させる形質転換体は、1種であってもよいし、2種以上であってもよい。

[0078] 本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物を標的微生物に作用させる工程は、本発明に係るタンパク質が失われないもしくは本発明に係るタンパク質が有するペプチドグリカン分解活性が失われない条件、または形質転換体が死滅せずに、該タンパク質を合成できる条件であれば、特に制限されるものではない。当該工程は、例えば温度が20～35℃の条件下であってもよく、25～30℃の条件下であってもよい。pHは5.5～8.0の条件下であってもよく、6.0～7.5の条件下であってもよい。

[0079] 微生物分解方法において用いられる、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物の量は、標的微生物の種類および濃度、反応系の容積、反応温度等を考慮し、適宜設定することができる。

[0080] 標的微生物が分解されているかどうかは、微生物分解剤の欄に記載の方法によって確認することができる。

[0081] 本発明の一態様は、標的微生物の分解のための、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物からなる群より選択される少なくとも1つの使用である。本発明の一態様は、標的微生物の分解のための、本発明に係るタンパク質ならびに本発明に係る形質転換体およびその培養物からなる群より選択される少なくとも1つを含む微生物分解剤の使用である。

実施例

[0082] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0083] [実験1. 微生物分解菌の分離]

(方法)

マイクロコッカス (Micrococcus) 属細菌を炭素源とした培地を用いて、環境 (水) 中に存在する微生物群を培養することにより、マイクロコッカス (Micrococcus) 属細菌を分解する微生物を集積培養した。次に、集積培養された微生物群から、増殖が良好であった数菌株を単離した。

[0084] (結果)

単離した菌株ごとにマイクロコッカス属細菌分解能を調べたところ、1つの菌株にマイクロコッカス属細菌分解能が認められた。以下、マイクロコッカス属細菌分解能が認められた菌株を「菌株A」と記すことがある。

[0085] [実験2. 菌株Aの同定]

(材料)

- ・クローニング用フォワードプライマー (27F : 配列番号5)
- ・クローニング用リバースプライマー (1492R : 配列番号6)
- ・シーケンス解析用プライマー (339F : 配列番号7、536R : 配列番号8、907F : 配列番号9)

[0086] (方法)

菌株Aの同定は、16S rRNA遺伝子解析、形態観察および生理・生化学的性状試験によって行った。

[0087] 16S rRNA遺伝子解析は以下の手順で行った。菌株AからゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNAを鋳型として、クローニング用フォワードプライマー (27F) およびクローニング用リバースプライマー (1492R) を用いて16S rRNA遺伝子のPCR増幅を行った。PCR増幅はKOD FX (東洋紡社製) を用いて行い、PCR後の増幅産物を精製した。

[0088] 精製したPCR後の増幅産物を用いてサイクルシーケンス反応を行った。サイクルシーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行った。得られた

反応液を精製し、精製液をDNAシーケンス解析（3730x1 DNA Analyzer）に供して、菌株Aから抽出した鋳型DNAの16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定した。

[0089] 形態観察および生理・生化学的性状試験は、光学顕微鏡による形態観察、BARROWらの方法（Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 3rd Edition 1993、Cambridge University Press.）およびAPI 50CHB（bioMérieux社製、Lyon、France）によって行った。

[0090] （結果）

得られた16S rRNA遺伝子の塩基配列（配列番号10）を国際塩基配列データベース（DDBJ／ENA（EMBL）／GenBank）に対してホモロジー解析を行った。基準株の中では、*Tumebacillus permanentifrigoris* Eurl_9.5の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対し、同一性98.1%を示した。しかし、得られた塩基配列と完全に一致する16S rRNA遺伝子を持つ微生物は存在しなかった。また、菌株Aは、10℃で生育しなかったが、16S rRNA遺伝子の同一性が最も高い*Tumebacillus permanentifrigoris* Eurl_9.5にはこのような特徴がみられなかった。そのため、菌株Aは、従来の*Tumebacillus*とは異なる、新種であることが示唆された。菌株Aを*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779として国際寄託した。

[0091] NITE BP-02779の形態観察および生理・生化学的性状試験結果を表1～表4に示す。

[0092]

[表1]

試験項目		結果
培養温度 (°C)		25
細胞形態		桿菌 (0.8-0.9 × 3.0-5.0 μm)
グラム染色性		+
胞子の有無		+
運動性		-
コロニー形態		培地: R2A寒天
		培養時間: 48hr
		直径: 1-2mm
		色調: 黄色
		形: 円形
		隆起状態: レンズ上 (中央隆起)
		周縁: 波状
		表面の形状など: スムーズ
		透明度: 不透明
		粘稠度: バター様
生育温度試験 (°C)	37	+
	45	-
カタラーゼ反応		+w
オキシダーゼ反応		-
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)		-/-
O/fテスト (酸化/発酵)		-/-

+: 陽性, -: 陰性, +w: 反応弱い

[0093]

[表2]

試験項目 (発酵性試験)	試験 結果	試験項目 (発酵性試験)	試験 結果	基質成分 (発酵性試験)	試験 結果
コントロール	—	α -メチル-D-グルコシド	—	D-タガトース	—
グリセロール	—	N-アセチルグルコサミン	—	D-フコース	—
エリスリトール	—	アミグダリン	—	L-フコース	—
D-アラビノース	—	アルブチン	—	D-アラビトール	—
L-アラビノース	—	エスクリン	—	L-アラビトール	—
リボース	—	サリシン	—	グルコネート	—
D-キシロース	—	セロビオース	—	2-ケトグルコネート	—
L-キシロース	—	マルトース	—	5-ケトグルコネート	—
アドニトール	—	ラクトース	—		
β -メチル-D-キシロース	—	メリビオース	—		
ガラクトース	—	サッカロース	—		
グルコース	—	トレハロース	—		
フラクトース	—	イヌリン	—		
マンノース	—	メレチトース	—		
ソルボース	—	ラフィノース	—		
ラムノース	—	でんぶん	—		
ズルシトール	—	グリコーゲン	—		
イノシトール	—	キシリトール	—		
マンニトール	—	ゲンチオビオース	—		
ソルビトール	—	D-ツラノース	—		
α -メチル-D-マンノシド	—	D-リキソース	—		

＋：陽性、－：陰性

[0094]

[表3]

基質成分 (生化学試験)	試験結果
β -ガラクトシダーゼ	—
アルギニンジヒドロラーゼ	—
リシンデカルボキシラーゼ	—
オルニチンデカルボキシラーゼ	—
クエン酸の利用性	—
H ₂ S 産生	—
ウレアーゼ	—
トリプトファンデアミナーゼ	—
インドール産生	—
アセトイン産生 (VP)	—
ゼラチナーゼ	—
硝酸塩還元	—

＋：陽性、－：陰性

[0095] [表4]

試験項目	試験結果
10℃での生育	—
pH 9.0での生育	＋
でんぷんの加水分解	＋

＋：陽性、－：陰性

[0096] [実験3. NITE BP-02779の余剰汚泥（死菌）に対する分解能評価－1]

(材料)

・R2A培地：1000mLの超純水に対し、R2A Broth, DAIKO（日本製薬株式会社製）を3.2gの割合で溶解し、高圧蒸気滅菌をした培地

・余剰汚泥（死菌）含有無機培地：986mL 基質溶液、3.0mL A液、3.0mL B液、3.0mL C液、3.0mL D液、および1.8mL 1%リン酸を混合した培地

基質溶液およびA液～D液としては、以下を用いた。

基質溶液:余剰汚泥を洗浄後、超純水986 mLに対し、濁度(OD660) 0.2となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

A液:4.35 g リン酸水素二カリウム、1.70 g リン酸二水素一カリウム、8.92 g リン酸水素二ナトリウム12水和物、0.34 g 塩化アンモニウムを超純水に溶解後、200 mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

B液:4.50 g 硫酸マグネシウム7水和物を超純水に溶解後、200 mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

C液:5.50 g 塩化カルシウム無水物を超純水に溶解後、200 mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

D液:0.05 g 塩化鉄6水和物を超純水に溶解後、200 mLに調製し、0.2 μmのシリンジフィルターで濾過滅菌を行った溶液

[0097] (方法)

NITE BP-02779をR2A培地に播種し、25℃で24時間～48時間培養した。培養終了後、NITE BP-02779培養液50 μLと余剰汚泥(死菌)含有無機培地5.0 mLとを試験管に添加して、25℃、200 rpmにて反応させ、経時的に試験管の濁度(OD660)を簡易濁度計(簡易ODモニター miniphoto 518R、TAITEC社製)で測定した。余剰汚泥(死菌)含有無機培地の濁度(OD660)が、陰性対照の濁度(OD660)の50%を示す経過日数を算出した。陰性対照はNITE BP-02779無添加の標的細菌(死菌)含有無機培地の濁度(OD660)を用いた。

[0098] (結果)

NITE BP-02779を添加することにより、余剰汚泥(死菌)の濁度の低下が認められ、3.2日で陰性対照の濁度の50%となった。従って、NITE BP-02779は余剰汚泥(死菌)を分解可能であった。

[0099] [実験4. NITE BP-02779の余剰汚泥(死菌)に対する分解

能評価－２]

(材料)

実験３と同じものを用いた。

[0100] (方法)

実験３と同じ方法で反応を行った。反応は５連で行い、反応開始後４日目に試験管中に残存する余剰汚泥を全量回収した。回収した余剰汚泥を乾燥した後、重量を測定し、陰性対照群とNITE BP-02779添加群とで有意差検定（t検定、片側）を行った。

[0101] (結果)

結果を図２に示す。陰性対照群と比較してNITE BP-02779添加群では余剰汚泥の乾燥重量の有意な低下（ $p < 0.01$ ）が認められた。従って、NITE BP-02779を添加することにより余剰汚泥を削減可能であった。

[0102] [実験５．NITE BP-02779のゲノム配列の決定]

(方法)

NITE BP-02779のゲノム配列を、以下の手順で次世代シーケンサーにより解析した。NITE BP-02779を50mLのR2A培地に植菌し、25℃、130rpmで2日間振とう培養した。得られた菌体を遠心分離により集菌し、ゲノムDNA抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit（250）、QIAGEN社製）を用いて、ゲノムDNAの抽出を行った。抽出したDNAを鋳型に次世代シーケンサーHiSeq 2500（Illumina社製）を用いてPaired-End法でシーケンスを行った。次に、得られた塩基配列からアダプター配列をトリミングし、Velvetを用いてde novoアセンブルを行った。de novoアセンブルで得られたスキャフォールド配列を解析し、遺伝子領域予測およびアノテーションを行った。遺伝子領域予測およびアノテーションにはRapid Annotations using Subsystems Technology（RAST）を用いた。

[0103] (結果)

de novoアセンブルの結果、149のスキファールドが得られ、スキファールド配列の合計長は4,44Mbpであり、4446遺伝子の存在が予測された。

[0104] [実験6. ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質 (ID2839) の同定]

(1) NITE BP-02779培養上清の調製

(方法)

NITE BP-02779をR2A培地5mLに植菌し、25℃で前培養を行った。得られた前培養液5mLをR2A培地1.5Lに植菌し、25℃、130rpmで振とう培養した。48時間後、培養液を遠心分離し(4℃、8000×g、10分間)、得られた培養上清をフィルター過(0.20μm)した。このフィルター過した培養上清を遠心式フィルターユニット(メルクミリポア社製)で濃縮し、酵素精製の出発材料として用いた。

[0105] (2) カラムクロマトグラフィーによる分画

酵素の分画および精製は、以下の(a)～(c)に示すカラムクロマトグラフィーにより行った。分画した各画分のペプチドグリカン分解活性は、Lysozyme activity kit (Sigma-Aldrich社製)により測定した。得られた画分に含まれるタンパク質は、4～20%ミニプロティアンTGXプレキャストゲル(バイオラド社製)を用いて電気泳動し、CBB染色により確認した。

[0106] (a) 陽イオン交換クロマトグラフィー

(材料)

・試料: NITE BP-02779培養上清濃縮液

[0107] (方法)

遠心式フィルターユニット(メルクミリポア社製)により試料中の緩衝液を50mMリン酸緩衝液(pH5.8)に交換した。この試料を、同緩衝液を用いて平衡化したHiTrap Q HP, 5mLカラム(GE Hea

Healthcare社製)にアプライして、カラムを同緩衝液で洗浄した後、0～1.0Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出した。

[0108] (結果)

ペプチドグリカン分解活性を調べたところ、未吸着画分に活性が認められたため、未吸着画分を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供した。

[0109] (b) 疎水性相互作用クロマトグラフィー

・試料：陽イオン交換クロマトグラフィーの未吸着画分

[0110] (方法)

遠心式フィルターユニット(メルクミリポア社製)により、(a)陽イオン交換クロマトグラフィーの未吸着画分中の緩衝液を、1M硫酸アンモニウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH5.8)に交換した。この試料を、同緩衝液を用いて平衡化したHitrap HIC, 5mLカラム(GE Healthcare社製)にアプライした。カラムを同緩衝液で洗浄した後、1.0～0Mの硫酸アンモニウム直線濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出した。

[0111] (結果)

ペプチドグリカン分解活性を調べたところ、吸着画分に活性が認められたため、活性が認められた画分をゲルろ過クロマトグラフィーに供した。

[0112] (c) ゲルろ過クロマトグラフィー

・試料：疎水性相互作用クロマトグラフィーの吸着画分

[0113] (方法)

遠心式フィルターユニット(メルクミリポア社製)により、(b)疎水性相互作用クロマトグラフィーの吸着画分中の緩衝液を、66mMリン酸カリウム(pH6.24)に交換した。この試料を、同緩衝液を用いて平衡化したSuperdex™ 75 10/300 GL(GE Healthcare社製)にアプライし、同緩衝液により溶出した。

[0114] (結果)

ペプチドグリカン分解活性を調べたところ、図3に示すように、溶出画分に活性が認められた。

[0115] (3) 質量分析によるペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質の同定

(材料)

・試料：ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出画分

[0116] (方法)

活性が認められた溶出画分を遠心式フィルターユニット（メルクミリポア社製）により濃縮し、4～20%ミニプロティアンTGXプレキャストゲル（バイオラド社製）を用いて電気泳動を行った。その結果、図4に示すように、溶出画分に含まれるタンパク質由来のバンドは単一バンドであることを確認した。（c）ゲルろ過クロマトグラフィーの精製画分および電気泳動で分離したバンドを、それぞれトリプシンを用いて液相消化またはインゲル消化を行い、消化液を脱塩処理した。脱塩処理した試料をナノLC-MS（サーモサイエンティフィック社製、Q Exactive HF，ナノカラム：Acclaim PepMap RSLC C18（サーモサイエンティフィック社製））で、Data Dependent MS/MS Acquisition（DDA）測定を実施した。測定後、NITE BP-02779のゲノム情報から作成したタンパク質配列データベースを対象にProteome Discoverer 2.1を介したMascotサーチ（MS/MSイオンサーチ）を実施した。

[0117] (結果)

質量分析で検出されたトリプシン切断ペプチドを検索したところ、ID2839の部分配列である配列番号11～17のアミノ酸配列が検出された。これらの部分配列は、配列番号2の15～164位のアミノ酸配列の一部に相当する。以上より、NITE BP-02779が発現するタンパク質ID2839は、ペプチドグリカン分解活性を有することが示唆された。

[0118] (4) ID2839のN末端切断部位の同定

(方法)

さらに I D 2 8 3 9 が同定された D D A 測定データファイルを対象に、N 末端側が配列番号 2 の - 1 1 ~ 1 4 位の任意の部位で切断されたペプチドが含まれるか否かを検索した。

[0119] (結果)

最も高強度なシグナル値を持つペプチドとして配列番号 1 8 の部分配列を得た。配列番号 1 8 の部分配列は、配列番号 2 の 1 ~ 1 0 位に相当する。従って、配列番号 2 のアミノ酸配列全体は、I D 2 8 3 9 の前駆体（プロ配列）のアミノ酸配列と考えられた。I D 2 8 3 9 の成熟体のアミノ酸配列は、配列番号 2 の 1 ~ 1 6 4 位であり、配列番号 1 の 2 0 5 ~ 6 9 6 位の塩基配列でコードされと考えられた。配列番号 2 の - 6 8 ~ - 1 位は、シグナルペプチドと考えられた。以下、配列番号 2 の 1 ~ 1 6 4 位のアミノ酸配列からなるタンパク質を「I D 2 8 3 9 成熟体」と記し、配列番号 2 のアミノ酸配列全体（- 6 8 ~ 1 6 4 位）からなるタンパク質を「I D 2 8 3 9 前駆体」と記すことがある。I D 2 8 3 9 前駆体からシグナルペプチドが切断されると I D 2 8 3 9 成熟体になり、I D 2 8 3 9 成熟体は菌体外に分泌されて、ペプチドグリカン分解し得と考えられる。I D 2 8 3 9 前駆体の分子量は約 2 5 k D a であり、I D 2 8 3 9 成熟体の分子量は約 1 8 k D a であった。

[0120] [実験 7. I D 2 8 3 9 成熟体の比活性測定]

(材料)

- ・ I D 2 8 3 9 成熟体（ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出画分）

[0121] (方法)

I D 2 8 3 9 成熟体の活性測定 (U n i t s / m L) とタンパク質定量 (m g / m L) を行い、比活性 (U n i t s / m g) を算出した。対照として市販の溶菌酵素 2 種類 (S i g m a - A l d r i c h 社製) を用いた。ペプチドグリカン分解活性は、L y s o z y m e a c t i v i t y k i t (S i g m a - A l d r i c h 社製) を用いて、N - アセチルムラミン酸と N

ーアセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性により評価した。

[0122] (結果)

結果を表5に示す。ID2839成熟体は、Nーアセチルムラミン酸とNーアセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性を有し、比活性は市販のMutanolysinやLysostaphinより高いことが示された。

[0123] [表5]

検体	比活性 (Units/mg)
ID2839成熟体	78717
Mutanolysin (Sigma-Aldrich社製)	305
Lysostaphin (Sigma-Aldrich社製)	294

[0124] [実験8. ID2839成熟体のE. coliでの調製]

(1) ID2839成熟体発現株の構築

(材料)

・ID2839クローニング用プライマーFおよびR (配列番号19および20)

・LB寒天培地: 500mLの超純水に対し、LB Ager (Sigma-Aldrich社製) を10個の割合で溶解し、高圧蒸気滅菌後シャーレに分注した寒天培地

[0125] (方法)

NITE BP-02779のゲノムDNAを鋳型として、ID2839クローニング用プライマーFおよびRを用いてID2839成熟体 (配列番号2における1位のAlaをMetに置換) をコードする塩基配列を含む領域のPCR増幅を行った。PCR増幅はKOD FX (東洋紡社製) を用いて行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、(1) 94℃、2分間、(2) 98℃、10秒間、(3) 50℃、30秒間、(4) 6

8℃、1.5分間で行い、(2)～(4)の工程は25サイクル繰り返し行った。得られたPCR断片とpET-28a(+)ベクター(メルクミリポア社製)とをそれぞれNdeI、XhoIで消化し、ligation high Ver. 2(東洋紡社製)を用いて連結した。この連結反応液でE. coli DH5αを形質転換し、カナマイシン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。このプラスミドを用いてE. coli BL21(DE3)を形質転換し、ID2839成熟体の発現株(「BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体」と記すことがある。)を得た。BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体では、成熟タンパク質(配列番号2における1位のAlaをMetに置換)のN末端にHisタグおよびトロンピン切断部位を含むアミノ酸配列(MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHis:配列番号21)が付加されたタンパク質が発現される。対照株としてID2839成熟体を発現しない株(「BL21(DE3)/pET28a」と記すことがある。)も得た。

[0126] (2) ID2839成熟体の発現誘導および可溶性画分の調製

(材料)

・LB液体培地: 500mLの超純水に対し、LB Broth, 1.1 G PER TABLET (Sigma-Aldrich社製)を10個の割合で溶解し、高圧蒸気滅菌をした培地

・形質転換体: BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体

・形質転換体(対照): BL21(DE3)/pET28a

[0127] (方法)

各形質転換株をカナマイシン50mg/Lを含むLB培地5mLに植菌し、37℃で前培養を行った。得られた前培養液1.0mLをカナマイシン50mg/Lを含むLB培地100mLに植菌し、バッフルフラスコを用いて振とう培養を行った。OD660が0.6に達した時点でIPTGを添加し(終濃度0.1mM)、さらに18℃で16時間培養した。培養終了後、得

られた培養液より菌体を遠心分離により集め、湿菌体量あたり一定量の Bug Buster (Novagen 社製) を加えて菌体を破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。BL 21 (DE3) / pET28a-ID2839 成熟体からは、ID2839 成熟体を含む可溶性画分が得られた。BL 21 (DE3) / pET28a からは、ID2839 を含まない可溶性画分が得られた。

[0128] (3) 可溶性画分の活性評価

(材料)

・ BL 21 (DE3) / pET28a-ID2839 成熟体由来の可溶性画分

・ BL 21 (DE3) / pET28a 由来の可溶性画分

[0129] (方法)

Lysozyme activity kit (Sigma-Aldrich 社製) を用いて N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性 (Units/mL) を算出した。活性 (UNITS/mL) は、以下の式を用いて算出した。

N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性 (UNITS/mL) = $\{\Delta ABS_{450nm} / \text{分} (\text{可溶性画分を添加した標的細菌含有リン酸緩衝液}) - \Delta ABS_{450nm} / \text{分} (\text{可溶性画分無添加の標的細菌含有リン酸緩衝液})\} / (0.001 \times 0.1)$

[0130] (結果)

結果を表 6 に示す。BL 21 (DE3) / pET28a-ID2839 成熟体由来の可溶性画分には、N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性が認められたが、対照の BL 21 (DE3) / pET28a 由来の可溶性画分には、N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を分解する活性はほとんど認められなかった。ID2839 成熟体は、ペプチドグリカン分解活性を有し、N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミン間のグリコシド結

合を分解する活性を有することがわかった。

[0131] [表6]

試料	活性 (Units/mL)
B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a - I D 2 8 3 9 成熟体	2 6 4
B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a	0

[0132] [実験9. ペプチドグリカン分解活性を有するタンパク質 (I D 1 6 4 4) の同定]

(1) ゲノム情報からの同定

N I T E B P - 0 2 7 7 9 のゲノム配列の解読結果から、N - アセチルムラモイル - L - アラニンアミダーゼと同一性が高い酵素の遺伝子が見いだされた。この酵素を I D 1 6 4 4 と名付けた。I D 1 6 4 4 は、N I T E B P - 0 2 7 7 9 の培養上清中に分泌されていた。配列番号4のアミノ酸配列全体は、前駆体（プロ配列）のアミノ酸配列であると考えられた。成熟タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号4の1～493位であり、配列番号3の85～1563位の塩基配列にコードされると考えられた。配列番号4の-28～-1位は、シグナルペプチドと考えられた。以下、配列番号4の1～493位のアミノ酸配列からなるタンパク質を「I D 1 6 4 4 成熟体」と記し、配列番号4のアミノ酸配列全体（-28～493位）からなるタンパク質を「I D 1 6 4 4 前駆体」と記すことがある。I D 1 6 4 4 前駆体からシグナルペプチドが切断されると I D 1 6 4 4 成熟体になり、I D 1 6 4 4 成熟体は菌体外に分泌されて、ペプチドグリカン分解し得ると考えられる。I D 1 6 4 4 前駆体の分子量は約56 kDaであり、I D 1 6 4 4 成熟体の分子量は約53 kDaであった。

[0133] [実験10. I D 1 6 4 4 成熟体の E. coli での調製]

(1) I D 1 6 4 4 成熟体発現株の構築

(材料)

・ I D 1 6 4 4 クローニング用プライマー F および R (配列番号22および23)

・LB寒天培地

[0134] (方法)

NITE BP-02779のゲノムDNAを鋳型として、ID1644クローニング用プライマーFおよびRを用いてID1644成熟体をコードする塩基配列を含む領域のPCR増幅を行った。PCR増幅はKOD FX (東洋紡社製)を用いて行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、(1) 94℃、2分間、(2) 98℃、10秒間、(3) 50℃、30秒間、(4) 68℃、1.5分間で行い、(2)～(4)の工程は25サイクル繰り返し行った。得られたPCR断片とpET-22b (+)ベクター (メルクミリポア社製)とをそれぞれNdeI、XhoIで消化し、ligation high Ver. 2 (東洋紡社製)を用いて連結した。この連結反応液でE. coli DH5αを形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。このプラスミドを用いてE. coli BL21 (DE3)を形質転換し、ID1644成熟体の発現株 (「BL21 (DE3) / pET22b-ID1644成熟体」と記すことがある。)を得た。BL21 (DE3) / pET22b-ID1644成熟体では、成熟タンパク質 (配列番号4の1～493位)のN末端にメチオニンが付加されたタンパク質が発現される。対照株として、ID1644成熟体を発現しない株 (「BL21 (DE3) / pET22b」と記すことがある。)も得た。

[0135] (2) ID1644成熟体の発現誘導および可溶性画分の調製

(材料)

- ・LB液体培地
- ・形質転換体: BL21 (DE3) / pET22b-ID1644成熟体
- ・形質転換体 (対照): BL21 (DE3) / pET22b

[0136] (方法)

各形質転換株をアンピシリン100mg/Lを含むLB培地5mLに植菌し、37℃で前培養を行った。得られた前培養液1.0mLをアンピシリン

100 mg/Lを含むLB培地100 mLに植菌し、バッフルフラスコを用いて振とう培養を行った。OD₆₆₀が0.6に達した時点でIPTGを添加し（終濃度0.1 mM）、さらに18℃で16時間培養した。培養終了後、得られた培養液より菌体を遠心分離により集め、湿菌体量あたり一定量のBug Buster（Novagen社製）を加えて菌体を破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。BL21（DE3）/pET22b-ID1644成熟体からは、ID1644成熟体を含む可溶性画分が得られた。BL21（DE3）/pET22bからは、ID1644成熟体を含まない可溶性画分が得られた。

[0137] （3）可溶性画分の活性評価－1

（材料）

- ・BL21（DE3）/pET22b-ID1644成熟体由来の可溶性画分
- ・BL21（DE3）/pET22b由来の可溶性画分
- ・ペプチドグリカン溶液：50 mLのリン酸緩衝液（pH 7.0）に対し、ペプチドグリカン（Sigma-Aldrich社製）を10 mgの割合で溶解させた溶液

[0138] （方法）

ペプチドグリカン溶液5 mLと可溶性画分50 μLとを混合して、OD₄₅₀を経時的に測定し、ペプチドグリカン分解活性（Units/mL）を算出した。ペプチドグリカン分解活性（UNIT S/mL）は以下の式を用いて算出した。

$$\text{ペプチドグリカン分解活性 (UNIT S/mL)} = \{ \Delta \text{ABS}_{450 \text{ nm}} / \text{分} (\text{可溶性画分を添加したペプチドグリカン含有リン酸緩衝液}) - \Delta \text{ABS}_{450 \text{ nm}} / \text{分} (\text{可溶性画分無添加のペプチドグリカン含有リン酸緩衝液}) \} / (0.001 \times 0.05)$$

[0139] （結果）

結果を表7に示す。BL21（DE3）/pET22b-ID1644成

熟体由来の可用性画分にはペプチドグリカン分解活性が認められたが、対照のBL21 (DE3) / pET22b由来の可溶性画分にはペプチドグリカン分解活性は認められなかった。ID1644成熟体は、ペプチドグリカン分解活性を有することがわかった。

[0140] [表7]

試料	活性 (Units/mL)
BL21 (DE3) / pET22b-ID1644成熟体	100
BL21 (DE3) / pET22b	2

[0141] (4) 可溶性画分の活性評価-2

(材料)

・ BL21 (DE3) / pET22b-ID1644成熟体由来の可溶性画分

・ BL21 (DE3) / pET22b由来の可溶性画分

・ N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼの基質：L-アニリン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (Sigma-Aldrich社製)

[0142] (方法)

可溶性画分10 μ Lと1 mg/mL基質溶液10 μ Lと100 mM Tris-HCl (pH7.6) 80 μ Lとを37°Cで10分間静置し、マイクロプレートリーダー (Molecular Device社製) を用いて吸光度 (405 nm) を測定した。

[0143] (結果)

結果を表8に示す。BL21 (DE3) / pET22b-ID1644成熟体由来の可溶性画分は、BL21 (DE3) / pET22b由来の可溶性画分よりもABS405 nmは高い値を示した。ID1644成熟体は、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼの活性を有することがわかった。

[0144]

[表8]

試料	A B S 4 0 5 n m
B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 2 b - I D 1 6 4 4 成熟体	0 . 5 3 6
B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 2 b	0 . 1 4 2

[0145] [実験 1 1. I D 2 8 3 9 成熟体-2 の E. c o l i での調製]

(1) I D 2 8 3 9 成熟体-2 発現株の構築

(材料)

・ I D 2 8 3 9 クローニング用プライマー F および R (配列番号 2 4 および 2 5)

・ L B 寒天培地

[0146] (方法)

N I T E B P - 0 2 7 7 9 のゲノム DNA を鋳型として、I D 2 8 3 9 クローニング用プライマー (配列番号 2 4 および 2 5) を用いて I D 2 8 3 9 成熟体-2 (配列番号 2 の 1 ~ 1 6 4 位のアミノ酸配列において、1 位の A l a の N 末端に M e t が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質) をコードする塩基配列を含む領域の P C R 増幅を行った。P C R 増幅は K O D p l u s N E O (東洋紡社製) を用いて行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、(1) 9 4 ° C、2 分間、(2) 9 8 ° C、1 0 秒間、(3) 6 8 ° C、3 0 秒間で行い、(2) ~ (3) の工程は 3 0 サイクル繰り返し行った。得られた P C R 断片と p E T - 2 8 a (+) ベクター (メルクミリポア社製) を N c o l、X h o l で消化した断片とを、I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i t (タカラバイオ社製) を用いて連結した。この連結反応液で E. c o l i D H 5 α を形質転換し、カナマイシン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。このプラスミドを用いて E. c o l i B L 2 1 (D E 3) を形質転換し、I D 2 8 3 9 成熟体-2 の発現株 (「B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a - I D 2 8 3 9 成熟体-2」と記すことがある。) を得た。B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a - I D 2 8 3 9 成熟体-2 では、成熟タンパク質 (配列番号 2 の 1 ~ 1 6 4 位の

アミノ酸配列において、1位のA l aのN末端にM e t が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質）が発現される。

[0147] (2) I D 2 8 3 9成熟体－2の発現誘導および可溶性画分の調製

(材料)

- ・ L B液体培地
- ・ 形質転換体：B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a－I D 2 8 3 9成熟体－2
- ・ 形質転換体（対照）：B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a

[0148] (方法)

各形質転換株をカナマイシン50 m g / Lを含むL B培地5 m Lに植菌し、37℃で前培養を行った。得られた前培養液1.0 m Lをカナマイシン50 m g / Lを含むL B培地100 m Lに植菌し、バッフルフラスコを用いて振とう培養を行った。OD660が0.6に達した時点でIPTGを添加し（終濃度1 m M）、さらに24℃で20時間培養した。培養終了後、実験8と同様の方法で菌体の可溶性画分を得た。

[0149] (3) 可溶性画分の活性評価

(材料)

- ・ B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a－I D 2 8 3 9成熟体－2
- ・ B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a由来の可溶性画分

[0150] (方法)

実験8と同様の方法で行った。

[0151] (結果)

結果を表9に示す。B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a－I D 2 8 3 9成熟体－2の可溶性画分には、ペプチドグリカン分解活性が認められた。

[0152] [表9]

試料	活性 (U n i t s / m L)
B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a－I D 2 8 3 9成熟体－2	65.1
B L 2 1 (D E 3) / p E T 2 8 a	0

[0153] [実験12. ID2839成熟体-3のE. coliでの調製]

(1) ID2839成熟体-3発現株の構築

(材料)

・ ID2839クローニング用プライマーFおよびR (配列番号26および25)

・ LB寒天培地

[0154] (方法)

配列番号26および25に記載のクローニング用プライマーを使用した以外は、実験11と同様の方法でID2839成熟体-3の発現株(「BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体-3」と記すことがある。)を得た。BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体-3では、成熟タンパク質(配列番号2の1~164位のアミノ酸配列において、1位のAlaがMetに置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質)が発現される。

[0155] (2) ID2839成熟体の発現誘導および可溶性画分の調製

(材料)

・ LB液体培地

・ 形質転換体: BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体-3

・ 形質転換体(対照): BL21(DE3)/pET28a

[0156] (方法)

実験11と同様の方法で菌体の可溶性画分を得た。

[0157] (3) 可溶性画分の活性評価

(材料)

・ BL21(DE3)/pET28a-ID2839成熟体-3由来の可溶性画分

・ BL21(DE3)/pET28a由来の可溶性画分

[0158] (方法)

実験8と同様の方法で行った。

[0159] (結果)

結果を表10に示す。BL21(DE3)／pET28a-ID2839成熟体-3由来の可溶性画分には、ペプチドグリカン分解活性が認められた。

[0160] [表10]

試料	活性 (Units/mL)
BL21(DE3)／pET28a-ID2839成熟体-3	79.0
BL21(DE3)／pET28a	0