

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] 従来、 α -アミノ酸化合物の一つであるメチオニンは、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(A4)のいずれかのアミノ酸配列:

(A1) 配列番号1、3または5のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号1、3または5のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して45%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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号2、4または6のいずれか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を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号1、3または5のいずれか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. 配列番号2、4、6、15、16または17のいずれかで示される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と記すこともある。);

項5. 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4記載の組換えベクター；

項6. 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(B1)から(B3)のいずれかのアミノ酸配列である前項5記載の組換えベクター：

(B1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(B2) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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

(B3) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；

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8. 宿主細胞が微生物または大腸菌である前項7記載の形質転換体；

項9. 前項5または6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10. 宿主細胞が微生物または大腸菌である前項9記載の形質転換体；

項11. 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12. 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；及び、

i i) 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 1 3. 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 1 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または前項 4 から 6 のいずれか一項に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 1 5. 下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45% 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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれか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を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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 1 6. 下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45% 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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

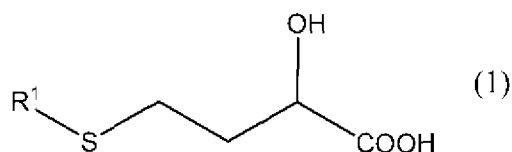
(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれかで示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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を、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させる工程を含む α -オキソカルボン酸化合物の製造方法（以下、本発明製造方法 1 と記すこともある。）；

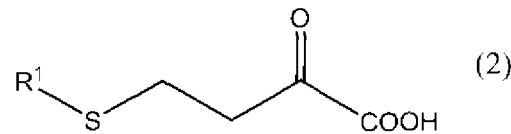
項 17. α -ヒドロキシカルボン酸化合物が含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が含硫 α -オキソカルボン酸化合物である前項 16 に記載の製造方法；

項 18. 含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物が式 (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、 R^1 は前記と同じ意味を表す；

で示される化合物である、前項17に記載の製造方法；

項19．前記（A1）から（A4）のいずれかのアミノ酸配列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16から18のいずれか一項に記載の製造方法；

項20．前記形質転換体が、前項7、8または11のいずれか一項に記載の形質転換体である前項19記載の製造方法；

項21．前記工程が、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の存在下で行われる前項16から20のいずれか一項に記載の製造方法；

項22．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がカタラーゼである前項21記載の製造方法；

項23．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21または22記載の製造方法；

項24．（1）下記（A1）から（A4）のいずれかのアミノ酸配列：

（A1）配列番号1、3または5のいずれかで示されるアミノ酸配列、

（A2）i）配列番号1、3または5のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して45%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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれか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-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有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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-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有するタンパク質のアミノ酸配列；

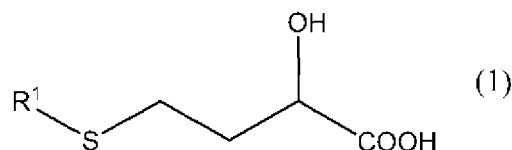
を有するタンパク質を、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させて、対応する α -オキソカルボン酸化合物を得る工程、及び

(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2と記すこともある。）；

項25. 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る前項24に記載の製造方法；

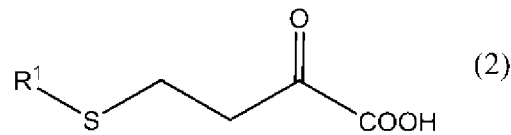
項26. 含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物が式(1)：



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

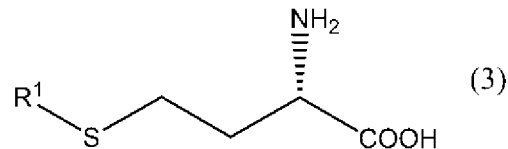
;

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、 R^1 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、前項25に記載の製造方法；

項27. 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24から26のいずれか一項に記載の製造方法；

項28. ロイシン脱水素酵素がバシラス・スファエリカス (*Bacillus sphaericus*) 由来のロイシン脱水素酵素である前項27に記載の製造方法；

項29. 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(B1)から(B3)のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(B2) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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

(B3) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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 24 から 27 のいずれか一項に記載の製造方法；

項 30. 前記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列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 24 から 29 のいずれか一項に記載の製造方法；

項 31. 前記形質転換体が、前項 7 から 12 のいずれか一項に記載の形質転換体である前項 30 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 24 から 31 のいずれか一項に記載の製造方法；

項 33. 前記形質転換体が、前項 9、10 または 12 のいずれか一項に記載の形質転換体である前項 32 記載の製造方法；

項 34. 工程 (1) が、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の存在下で行われる前項 24 から 33 のいずれか一項に記載の製造方法；

項 35. 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がカタラーゼである前項 34 記載の製造方法；

項 36. 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 34 または 35 記載の製造方法；

項 37. 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 24 から 36 のいずれか一項に記載の製造方法；

項 38. 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

ー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蟻酸脱水素酵素である前項 37 に記載の製造方法；

項 39. 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 37 または 38 に記載の製造方法；及び

項 40. 工程 (1) と工程 (2) とが一つの反応系で行われる前項 24 から 39 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] 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。

- [0008] 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、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。

- [0009] 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。

[0010] 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 Pulsar /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。

[0011] 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。

[0012] 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ラ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。acUV5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。

[0013] 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、ジャーファーメンター (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。

[0014] 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砕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砕法等によって破砕する。得られた破砕液から遠心分離、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。

[0015] 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。

[0016] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列:

(A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45% 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-オキソー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力を有するタンパク質のア

ミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれか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-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有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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-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有するタンパク質のアミノ酸配列；
をコードする。

[0017] 本発明タンパク質(A)は、下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45%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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれか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-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有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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-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有するタンパク質のアミノ酸配列；
を有する。

[0018] 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1、3または5のいずれか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、3または5のいずれか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、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(A4)または本発明タンパク質(A)のアミノ酸配列の(A4)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、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。

アミノ酸の改変を人為的に行う手法としては、例えば、配列番号1、3または5のいずれか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、Olfert Landt ら (Gene 96 125-128 1990)、Smith ら (Genetic Engineering 3 1 Setlow, J. and Hollaender, A Plenum: New York)、Vlasuk ら (Experimental Manipulation of Gene Expression, Inouye, M. : Academic Press, New York)、Hos. N. Hunt ら (Gene 77 51 1989) 等の方法や、Mutant-Express Km (タカラバイオ社製)、TaKaRa La PCR in vitro Mutagenesis Kit (タカラバイオ社製)、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (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、配列番号1、3または5のいずれか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のいずれかをコードするポリヌクレオチドを鋳型とし、それぞれの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dATP、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PCRを行う方法等が挙げられる。このようなPCR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。

[0019] 「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。

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「45%以上の配列同一性」としては、例えば45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、98または99%以上の配列同一性が挙げられる。

[0020] 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2、4または6のいずれか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、4または6のいずれか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、4、6、15、16または17のいずれか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、4、6、15、16または17のいずれか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、4、6、15、16または17のいずれか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。

[0021] 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。

[0022] 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。これら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。

[0023] 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 Microorganisms, 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。

[0024] 本発明ポリヌクレオチド(A)は、例えば、以下のようにして調製することができる。

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、3または5のいずれか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、3または5のいずれか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、4または6のいずれか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。

[0025] 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DNAライブラリーを鋳型として、かつ配列番号11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12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DNAライブラリーを鋳型として、かつ配列番号13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14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6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。

[0026] 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。

[0027] 上記DNAライブラリーを鋳型として配列番号1、3または5のいずれか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、3または5のいずれか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、3または5のいずれか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、3または5のいずれか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。

[0028] 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1、3または5のいずれか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、後述する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。

[0029] 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

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。

[0030] 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1.5M塩化ナトリウム、0.5M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、1.5M塩化ナトリウム、0.5Mトリスー塩酸緩衝液pH7.5）に約5分間浸す。次いで該メンブレンを洗浄液（例えば、0.3M塩化ナトリウム、30mMクエン酸、0.2Mトリスー塩酸緩衝液pH7.5）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。

[0031] このように調製されたメンブレンを用いて、上記DNAをプローブとして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. Fritsch, 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 - ^{32} P）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。

[0032] 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900mMの塩化ナトリウム及び45から90mM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900mMの塩化ナトリウム、90mM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1cm²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900mMの塩化ナトリウム及び45から90mM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、900mMの塩化ナトリウム、90mM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1cm²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1cm²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300mMの塩化ナトリウム、1.5から30mM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15mMの塩化ナトリウム、1.5mMのクエン酸ナトリウム及び1.0重量%のSDS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、本発明ポリヌクレオチド(A)を調製することができる。

[0033] 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。

[0034] 上記(A1)から(A4)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1、3または5のいずれか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。

[0035] 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ー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ードンを割り当てる。同一コードンがなるべく連続しないように、それぞれのコー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ードンを選び、そのアミノ酸残基のコードンと仮決定する。これらの手順を繰り返しC末端までの全アミノ酸のコードンを仮決定し、最後に終止コードンを配置する。仮決定されたコー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ードンを別の部分で使用したコードンと交換する。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15、16または17のいずれかで示される塩基配列を有する本発明の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。

[0036] 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。

[0037] 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-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸)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)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、含硫 α -ヒドロキシカルボン酸、より具体的には、2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸）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、含硫 α -オキソカルボン酸、より具体的には、2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸）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。

[0038] 本発明ポリヌクレオチド(A)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)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)の発現を制御しているプロモーターを利用してもよい。

[0039] 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を作製することができる。

[0040] 本発明組換えベクターは、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に加えて、 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(B)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含有することもできる。

[0041] 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、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39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39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。

[0042] 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(B1)から(B3)のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(B2) i) 配列番号7で示されるアミノ酸配列にして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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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

(B3) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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。

[0043] 本タンパク質(B)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、2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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(B)の上記アミノ酸配列の(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、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。

アミノ酸の改変を人為的に行う手法としては、例えば、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。

アミノ酸の改変を人為的に行う手法としては、例えば、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。

本タンパク質(B)の上記アミノ酸配列の (B2) 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。

[0044] 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(B)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。

[0045] *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39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39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(B)を調製することができる。

例えば、配列番号39で示されるアミノ酸配列をコードする配列番号40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39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20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21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PCRを行うことにより、配列番号40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40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20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21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39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。

[0046] 本ポリヌクレオチド(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。

上記(B1)から(B3)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(B)を調製することもできる。

[0047] 本ポリヌクレオチド(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。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(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] 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）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）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、含硫 α -オキソカルボン酸、より具体的には、2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸）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、含硫L- α -アミノ酸、より具体的には、L-メチオニン）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。

[0049] 本発明ポリヌクレオチド(A)、本ポリヌクレオチド(B)、または、これらポリヌクレオチドのいずれか若しくは両方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。

[0050] 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。

[0051] 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は、さらに、本ポリヌクレオチド(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こともできる。

上述のようにして、

i) 本ポリヌクレオチド(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；及び、

i i) 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、

i) 本ポリヌクレオチド(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；及び、

i i) 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。

上記 i) のポリヌクレオチドと ii) 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、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。上記 i) のポリヌクレオチドと ii) の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。

[0052] 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。

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

本発明ポリヌクレオチド(A)又は本ポリヌクレオチド(B)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)又は本タンパク質(B)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を指標にして選抜することができる。

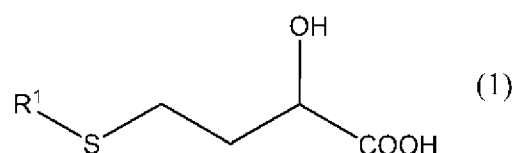
本タンパク質(B)を含む画分は、例えば、2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸をアミノ化してL-メチオニンを優先的に生産する能力を指標にして選抜することができる。

[0053] 本発明製造方法1は、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工程を含む、 α -オキソカルボン酸化合物の製造方法である。

上記 α -ヒドロキシカルボン酸化合物としては、含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物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、含硫 α -オキソカルボン酸化合物を挙げることができる。

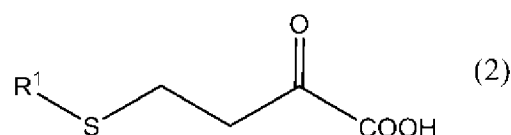
上記含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物としては、式(1)：



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)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。

[0054] 式(1)の含硫 α -ヒドロキシカルボン酸、及び、式(2)の含硫 α -オキソカルボン酸において、 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、等を挙げることができる。

[0055] 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。

本発明製造方法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、2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸が得られる。

[0056] 本発明製造方法1において、本発明タンパク質(A)は、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)は、精製されたタンパク質の形態で本発明製造方法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)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1の反応系に提供することができる。

る。

[0057] 本発明製造方法 1 は、通常、水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。

[0058] 本発明製造方法 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。

[0059] 本発明製造方法 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）の酸化反応の進行に伴い、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を作用させることにより元の分子状酸素に戻すことができるので、上記方法の反応系内に、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存在させてもよい。

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。カタラーゼとしては、大腸菌のカタラーゼを挙げることができ、より具体的には、配列番号 41 で示されるアミノ酸配列を有するカタラーゼを挙げることができる。

[0060] 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、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 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。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提供されてもよい。配列番号 4 1 で示されるアミノ酸配列を有するカタラーゼをコードする塩基配列としては、配列番号 4 2 で示される塩基配列を挙げることができる。

[0061] 本発明製造方法 1 において、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、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、 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てもよい。

本発明製造方法 1 において、本発明タンパク質(A)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、前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。本発明タンパク質(A)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。

[0062] 本発明製造方法 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-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）、本発明タンパク質(A)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。

[0063] 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るが、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るが、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。

[0064] 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）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るが、通常約 0.5 時間から約 10 日間の範囲である。

[0065] 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）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。

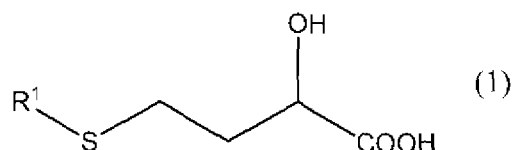
[0066] 本発明製造方法 2 は、

(1) 本発明タンパク質(A)を α -ヒドロキシカルボン酸化合物と反応させて、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（本タンパク質(B)）を、工程（1

) で得られた α -オキソカルボン酸化合物と反応させて、対応する L- α -アミノ酸化合物を得る工程、
を含む L-アミノ酸化合物の製造方法である。

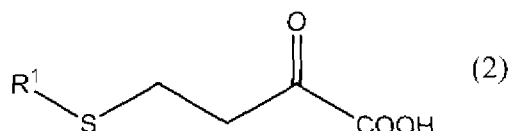
[0067] 上記 α -ヒドロキシカルボン酸としては、式 (1) :



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。

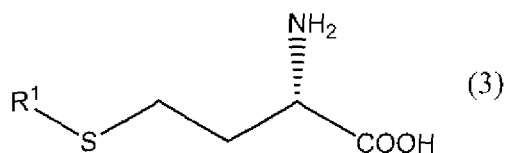
上記式 (1) で示される含硫 α -ヒドロキシカルボン酸に、本発明タンパク質(A)を作用させて得られる含硫 α -オキソカルボン酸化合物としては、式 (2) :



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(B)を作用させて得られる含硫 L-アミノ酸化合物としては、式 (3) :



で示される含硫 L-アミノ酸が例示される。

[0068] 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 C 1-8 のアルキル基における C 1-8 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。

[0069] R^1 で表される置換されていてもよい $C\ 1-8$ 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。

本発明製造方法２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。

[0070] 本発明製造方法２の工程（１）は、本発明製造方法１と同様に実施することができる。

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）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）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）を工程（２）に供することもできる。

[0071] 本発明製造方法２の工程（２）において、本タンパク質(B)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(B)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(B)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(B)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(B)、本タンパク質(B)の固定化物、本タンパク質(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、上記工程（２）の反応系に提供することができる。

[0072] 本発明製造方法２の工程（２）は、通常、水、アンモニウムイオン及び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２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。

[0073] 本発明製造方法2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。

[0074] 本発明製造方法2の工程(2)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、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。)や、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(以下、NADPH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。

[0075] 本発明製造方法2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)の還元的アミノ化反応の進行に伴い、反応液中のNADHは酸化型 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。)に変

換される。変換により生じたNAD⁺は、NAD⁺を還元型（NADH）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NADHに戻すことができるので、上記工程（2）の反応系内には、NAD⁺をNADH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、NAD⁺をNADH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。

NAD⁺をNADH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。蟻酸脱水素酵素としては、*Bacillus*属に属する微生物の蟻酸脱水素酵素を挙げることができ、より具体的には、配列番号43で示されるアミノ酸配列を有する蟻酸脱水素酵素を挙げることができる。

[0076] NAD⁺をNADH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2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。

[0077] 本発明製造方法2の工程（2）において、本タンパク質(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、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2の工程（2）において、本タンパク質(B)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(B)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(B)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。

[0078] 本発明製造方法2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)、本タンパク質(B)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む反応液を、攪拌、振盪等により混合することにより行われる。

NAD⁺をNADHに変換する能力を有するタンパク質がグルコース脱水素酵素である場合には、反応系内にグルコース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、反応液にグルコース等を加えてもよい。NAD⁺をNADHに変換する能力を有するタンパク質が蟻酸脱水素酵素である場合には、反応系内にアミノ基供与体として蟻酸アンモニウム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、反応液に蟻酸アンモニウムを加えてもよい。

[0079] 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るが、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るが、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。

[0080] 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）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るが、通常約0.5時間から約10日間の範囲である。

[0081] 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）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。

[0082] 本発明製造方法2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)と本タンパク質(B)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)及び本タンパク質(B)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)及び本タンパク質(B)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、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。

[0083] 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若しくはNAD⁺をNADHに変換する能力を有するタンパク質、又はこれら両タンパク質を、上記反応系内にさらに存在させてもよい。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及びNAD⁺をNADH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。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若しくは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。

本発明タンパク質(A)をコードするポリヌクレオチド、本タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチド、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、及び、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。

[0084] 本発明製造方法2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2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。

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)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るが、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)の回収は、上述の本発明製造方法2の工程(2)の場合と同様に行うことができる。

実施例

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 実施例1 (本発明ポリヌクレオチド(A)、本発明組換えベクター及び本発明の形質転換体の作製)

配列番号9から14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。

[0088] [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: CCATATGAGCCGGCTGGACCGCTGCCTGTC	配列番号10: GGATCCCTATGCCGGGCTGGCCGGCCGTATC
配列番号11: CCATATGAACTCAAAGAACTCTTGTGATAG	配列番号12: GGATCCCTAAGGGCGCGACACGATGAAGTCG
配列番号13: CCATATGACATCCATCCTTCGTCGTCACC	配列番号14: GGATCCCTAATCTGCCAGGCTCTCGCGGGCC

[0089] 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。

[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

[0090] 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. 2 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BamHIを加えてDNAを二重消化させ、酵素消化された約1.2 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NdeI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1.2 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1.2 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pET174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。

[0091] 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) を鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[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

[0092] 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1.2kb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1.2kb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NdeI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1.2kb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1.2kb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pET204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。

[0093] 配列番号13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 14 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

[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 (50 pmol/ 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

[0094] 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 1.2 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 BamHI を加えて DNA を二重消化させ、酵素消化された約 1.2 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 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 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 NdeI 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1.2 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1.2 kbp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6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pET436と名付けた。配列番号6で示される塩基配列は配列番号5で示されるアミノ酸配列をコードする。

[0095] 実施例2（本発明の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）

プラスミドpET174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 μ g/mlのアンプシリンとを含有する滅菌LB培地10 mlに接種し、37℃、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1 gを、0.1 M トリス-HClバッファー（pH8.0）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（0.1mm 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、遠心上清液約0.7 mlを得た。得られた遠心上清液0.45mlに、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）1.0 mg、NADH2.5 mg、100 mM Tris-HCl緩衝液（pH8.0）0.05 ml、硫酸アンモニウム0.2 mg、ロイシン脱水素酵素（和光社製）0.4 Uを混合し、30℃で22時間振とうした。この反応液を下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析に供した。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1.6%生成していることがわかった。

[0096]（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12mM1-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

[0097] プラスミド pET204 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 μ g / ml のアンピシリンとを含有する滅菌 LB 培地 10 ml に接種し、37℃、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 1 g を、0.1 M トリス-HCl バッファー (pH 8.0) 1 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 分間で破碎処理した。得られた破碎液を 8000 rpm、4℃ にて 10 分間遠心分離し、遠心上清液約 0.7 ml を得た。得られた遠心上清液 0.45 ml に、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) 1.0 mg、NADH 2.5 mg、100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 0.05 ml、硫酸アンモニウム 0.2 mg、ロイシン脱水素酵素 (和光社製) 0.4 U を混合し、30℃ で 22 時間振とうした。この反応液を下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析に供した。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 2.8% 生成していることがわかった。

[0098] (含量分析条件)

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

移動相：50 mM リン酸を含む 12 mM 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

[0099] プラスミド pET436 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 μ g / ml のアンピシリンと

を含有する滅菌LB培地10mlに接種し、37℃、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1gを、0.1M トリス-HClバッファー (pH8.0) 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0.45mlに、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) 1.0mg、NADH 2.5mg、100mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.0) 0.05ml、硫酸アンモニウム0.2mg、ロイシン脱水素酵素 (和光社製) 0.4Uを混合し、30℃で22時間振とうした。この反応液を下記条件で液体クロマトグラフィーによる含量分析に供した。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3.9%生成していることがわかった。

[0100] (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12mM1-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) とを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

実施例3 (本タンパク質(B)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、並びに、本タンパク質(B)の調製)

[0101] (1) 本タンパク質(B)のアミノ酸配列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)

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18で示される塩基配列（GCCATGGAAATCTTC AAGTATATGG）を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号19で示される塩基配列（GGGCCCGGGTTAACGGCCGTTCAAAATATT）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18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19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。

[0102] [反応液組成]

染色体DNA（B）溶液	1 μ l
dNTP(各2.5mMのmixture)	1 μ l
プライマー(20pmol/ μ l)	0.4 μ l
プライマー(4pmol/ μ l)	2 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	35.1 μ l

[0103] 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1.1 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SmaI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 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 1.1 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と名付けた。

[0104] (2) 本タンパク質(B)のアミノ酸配列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 (2)

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20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21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20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21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、上記(1)で調製された組換えベクター pTrcLDを鋳型にして、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis

s i s K i t (S T R A T A G E N E 社製) を用いた以下の反応液組成で P C R を行った。

[反応液組成]

p T r c L D の DNA 溶液 0.4 μ l
 d N T P m i x (上 記 K i t に 含 ま れ る) 1 μ l
 センスプライマー (5 0 μ M) 0.4 μ l
 アンチセンスプライマー (5 0 μ M) 0.4 μ l
 1 0 x b u f f e r (上 記 K i t に 含 ま れ る) 5 μ l
 P f u U l t r a (上 記 K i t に 含 ま れ る) 1 μ l
 超純水 4 1.8 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 (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、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 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 . c o l i D H 5 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 p T r c L D (A 1 1 3 G) 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。

[0105] (3) 本タンパク質(B)のアミノ酸配列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 (3)

(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 22 で示される塩基配列 (GATAGTATT CCAACCTATGTTGCGGC) 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 (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 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、上記 (2) で調製された組換えベクター 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。

[0106] (3-2) 本タンパク質(B)のアミノ酸配列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

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 24 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 25 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 24 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 25 で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用い、上記 (3-1) で調製された組換えベクター 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。

[0107] [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

[0108] 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-GenAmp 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. 1 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NdeI及びBamHIを加えてD N A を二重消化させ、酵素消化された約 1. 1 k b の D N A を精製した。

プラスミドベクター pET-1 5 b (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. c o l i D H 5 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. 1 k b の D N A 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 2 0 アミノ酸からなるアミノ酸配列 (配列番号 4 4 : 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。

[0109] (4) 本タンパク質(B)の調製

組換えベクター pETLD(A113G) を用いて E. c o l i B L 2 1 (D E 3) 株を形質転換した。得られた形質転換体を 0. 1 m M の I P T G と 5 0 μ g / m l のアンピシリンとを含有する滅菌 L B 培地 1 0 0 m l に接種し、3 0 $^{\circ}$ C、1 5 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、約 0. 8 g の湿菌体を得た。この湿菌体約 0. 8 g を、0. 5 M の NaCl と 5 m M イミダゾールとを含む 2 0 m M

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。) 10ml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7mlを得た。

得られた遠心上清液約7mlにバインディングバッファーを3ml追加して約10mlとした後、これを流速5ml/minでHisTrap HPカラム (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 (pH 7.4) 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1.5mlの画分を得た。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。

[0110] 実施例4 (本発明の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)

プラスミドpET174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のアンピシリンとを含有する滅菌LB培地10mlに接種し、37℃、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1gを、0.1M トリス-HClバッファー (pH8.0) 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0.4mlに、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0.02ml、NAD+10mg、蟻酸脱水素酵素(SIGMA社製)2U、蟻酸アンモニウム2.5mg、実施例3で得られたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(36gタンパク質/l)0.1mlを混合し、30℃で16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)酪酸の量に対してL-メチオニンが1.7%生成していることがわかった。

[0111] (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12mM1-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

[0112] プラスミドpET204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のアンピシリンとを含有する滅菌LB培地10mlに接種し、37℃、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1gを、0.1Mトリス-HClバッファー(pH8.0)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分間で破碎処理した。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0.4mlに、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸(東京化成社製)の40%水溶液を0.02ml、NAD+10mg、蟻酸脱水素酵素(SIGMA社製)2U、蟻酸アンモニウム2.5mg、実施例3で得られたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(36gタンパク質/l)0.1mlを混合し、30℃で16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)酪酸の量に対してL-メチオニンが9.7%生成していることがわかった。

[0113] (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12mM1-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

[0114] プラスミドpET436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のアンピシリンとを含有する滅菌LB培地10mlに接種し、37℃、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1gを、0.1Mトリス-HClバッファー(pH8.0)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0.4mlに、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸(東京化成社製)の40%水溶液を0.02ml、NAD⁺10mg、蟻酸脱水素酵素(SIGMA社製)2U、蟻酸アンモニウム2.5mg、実施例3で得られたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(36gタンパク質/l)0.1mlを混合し、30℃で16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)酪酸の量に対してL-メチオニンが6.7%生成していることがわかった。

[0115] (含量分析条件)

カラム：UNISON UK-C18(4.6 mm ϕ $\times$ 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

[0116] 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及び本発明の形質転換体の作製)

配列番号15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15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。

調製された上記二本鎖DNA(約1.2 kb)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1.2 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。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pTrc174と名付けた。

[0117] 配列番号 16 で示される塩基配列の 5' 末端側に塩基配列ccatggct、3' 末端側に塩基配列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 16 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。

調製された上記二本鎖DNA（約 1.2 kb）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 µg/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 µg/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1.2 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。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pTrc204と名付けた。

[0118] 配列番号 17 で示される塩基配列の 5' 末端側に塩基配列ccatggct、3' 末端側に塩基配列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 17 で示される塩基配列は配列番号 5 で示されるアミノ酸配列をコードする。

調製された上記二本鎖DNA（約 1.2 kb）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B

amHI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 µg/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 µg/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、それぞれ上記約1.2 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。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pTrc436と名付けた。

[0119] 実施例6 (酸化型β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを還元型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)

Journal of Applied Microbiology, 111 (2011) 1075-1085に記載されたBacillus sp. F1(2010)株由来の蟻酸脱水素酵素のアミノ酸配列をもとに、配列番号26で示される塩基配列を設計する。配列番号26で示される塩基配列は配列番号43で示されるアミノ酸配列をコードする。配列番号26で示される塩基配列の5'末端側に塩基配列ccatggct、3'末端側に塩基配列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。

調製された上記二本鎖DNA (約1.2 kb) 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 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 Nco I 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 1.2 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。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 pTrcFDH と名付けた。

[0120] プラスミド pTrcFDH 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 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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°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 0.7 g を、 0.1 M トリス-HCl バッファー ($\text{pH} 8.0$) 10 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 分間で破碎処理した。得られた破碎液を 8000 rpm 、 4°C にて 10 分間遠心分離し、遠心上清液約 0.7 ml を得た。

[0121] 実施例 7 (本発明の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)

プラスミド pTrc174 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 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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°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 0.1 g を、 0.1 M トリス-HCl バッファー ($\text{pH} 8.0$) 1 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°C にて 10 分間遠心分離し、遠心上清液約 0.7 ml を得た。得られた遠心上清液 0.4 ml に、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0.02ml、NAD⁺10mg、実施例6で得られた遠心上清液0.05ml、蟻酸アンモニウム2.5mg、実施例3で得られたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(36gタンパク質/l)0.05mlを混合し、30℃で17.5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)酪酸の量に対してL-メチオニンが5.6%生成していることがわかった。

[0122] (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12mM1-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

[0123] プラスミドpTrc204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、0.1Mトリス-HClバッファー(pH8.0)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0.4mlに、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0.02ml、NAD⁺10mg、実施例6で得られた遠心上清液0.05ml、蟻酸アンモニウム2.5mg、実施例3で得られたロイシン脱水素酵素(A113G)精製酵素液(36gタンパク質/l)0.

0.5 ml を混合し、30℃で17.5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)酪酸の量に対してL-メチオニンが30.2%生成していることがわかった。

[0124] (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

[0125] プラスミドpTrc436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0.1 gを、0.1 M トリス-HClバッファー (pH 8.0) 1 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、遠心上清液約0.7 mlを得た。得られた遠心上清液0.4 mlに、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0.02 ml、NAD⁺ 10 mg、実施例6で得られた遠心上清液0.05 ml、蟻酸アンモニウム2.5 mg、実施例3で得られたロイシン脱水素酵素 (A113G) 精製酵素液 (36gタンパク質/l) 0.05 mlを混合し、30℃で17.5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)酪酸の量に対してL-メチオニンが12.1%生成していることがわかった。

[0126] (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12mM1-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

[0127] 実施例8 (本発明ポリヌクレオチド(A)、本発明組換えベクター及び本発明の形質転換体の作製)

配列番号27から32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。

[0128] [表2]

センスプライマー	アンチセンスプライマー
配列番号27： CCATATGTCCTCGCCTGGACCGCTGTCTGAG	配列番号28： GGATCCTTAAGCCGGGCTGGCCGGACGG
配列番号29： CCATATGAACTCCAAGAACTGCTGTCTATC	配列番号30： GGATCCTTACGGACGAGAAACGATAAAG
配列番号31： CCATATGACCTCTATTCTGCCTTCTGTTAC	配列番号32： ACTCGAGGTCAGCCAGGGATTACGCGCCAG

[0129] 配列番号27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28で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、プラスミドpTrc174を鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[0130] [反応液組成]

pTrc174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

[0131] 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1.2kb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1.2kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpET-15b（ノバジェン社製）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1.2kb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pTrc174にコードされる本発明タンパク質(A)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pET174SCと名付けた。

[0132] 配列番号29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30で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、プラ

スミドpTrc204を鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[0133] [反応液組成]

pTrc204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

[0134] 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1.2kb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1.2kbのDNAを精製した。

プラスミドベクターpET-15b (ノバジェン社製) 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NcoIとBamHIにより2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1.2kb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pTrc204にコードされる本発明タンパク質(A)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pET204SCと名付けた。

[0135] 配列番号31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32で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、プラスミドpTrc436を鋳型にして下記反応液組成でPCRを行った。

[0136] [反応液組成]

pTrc436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

[0137] 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1.2kb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1.2kb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。

これらの酵素消化された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 Nco I と Xho I 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 1.2 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。このようにして得られるプラスミドは、組換えベクター pTrc436 にコードされる本発明タンパク質 (A) 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 pET436SC と名付けた。

[0138] 実施例 9 (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、当該タンパク質の調製)

(1) 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のアミノ酸配列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

大腸菌 BL21 (DE3) 株を滅菌した LB 培地 100 ml 中で培養し、菌体約 1.0 g 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 (C) と記す。) を精製した。

Journal of Bacteriology, 170(9) (1988) 4415-4419 に記載された E. coli 由来のカタラーゼをコードする塩基配列をもとに、配列番号 33 で示される塩基配列 (CCATATGAGCAGTCAGACGATATCCATAAC) を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号 34 で示される塩基配列 (ACTCGAGCAGCAGGTCGAAACGGTC

GAGGTTC) 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 33 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 34 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、前記染色体 DNA (C) 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。

[0139] [反応液組成]

染色体DNA (C) 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	33.7 μ l

[0140] 上記組成に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60℃にて30秒間次いで72℃にて2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65℃にて30秒間次いで72℃にて2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 2.2 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 2.2 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 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 Nde I 及び Xho I 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 2.2 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。このようにして得られるプラスミドは、上記カタラーゼ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 pETcatE と名付けた。

[0141] (2) 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の調製

組換えベクター pETcatE 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 20 ml に接種し、 37°C 、 15 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、約 0.8 g の湿菌体を得た。この湿菌体約 0.8 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 ($\text{pH } 7.4$) (即ち、バインディングバッファー) 10 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°C にて 10 分間遠心分離し、遠心上清液約 7 ml を得た。

得られた遠心上清液約 7 ml にバインディングバッファーを 3 ml 追加して約 10 ml とした後、これを流速 $1 \text{ ml}/\text{min}$ で HisTrap HP カラム (ゲルベッド 1 ml) (GEヘルスケア・ジャパン社製) にアプライした。このカラムに約 5 ml のバインディングバッファーを流速 $1 \text{ ml}/\text{min}$ 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、 0.5 M NaCl と 29.75 mM イミダゾールとを含む 20 mM リン酸バッファー ($\text{pH } 7.4$) 約 7 ml 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、 9.5 ml 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30mMから180mM付近の画分5ml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0.1M Tris-HCl（pH8）へのバッファー交換を行い、約1mlの画分を得た。この画分を以下、カタラーゼ精製酵素液と記す。

[0142] 実施例10（本発明の形質転換体の処理物を用いた α -オキソカルボン酸化合物の製造）

プラスミドpET174SC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のアンプ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、0.1Mトリス-HClバッファー（pH8.0）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（0.1mm ϕ ）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0.35mlに、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0.02ml、実施例9で得られたカタラーゼ精製酵素液（3.3gタンパク質/l）0.05ml、及び0.1Mトリス-HClバッファー（pH8.0）0.1mlを混合し、30℃で22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）酪酸の量に対して2-オキソ-4-（メチルチオ）酪酸が18.0%生成していることがわかった。

[0143]（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12mM1-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

[0144] プラスミド pET204SC 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 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 0.1 g を、0.1 M トリス-HCl バッファー (pH 8.0) 1 ml に懸濁しマルチビーズショッカー (安井器械社製)、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、遠心上清液約 0.7 ml を得た。得られた遠心上清液 0.35 ml に、アンモニア水を用い pH9 に調製した 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の 40% 水溶液を 0.02 ml、実施例 9 で得られたカタラーゼ精製酵素液 (3.3g タンパク質/l) 0.05 ml、及び 0.1 M トリス-HCl バッファー (pH 8.0) 0.1 ml を混合し、30℃ で 22 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)酪酸の量に対して 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸が 22.8% 生成していることがわかった。

[0145] (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

[0146] プラスミド pET436SC 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 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0.1 gを、0.1 Mトリス-HClバッファー (pH8.0) 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 (0.1mm 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、遠心上清液約0.7 mlを得た。得られた遠心上清液0.35 mlに、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の40%水溶液を0.02 ml、実施例9で得られたカタラーゼ精製酵素液 (3.3gタンパク質/l) 0.05 ml、及び0.1 Mトリス-HClバッファー (pH8.0) 0.1 mlを混合し、30℃で22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)酪酸の量に対して2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸が24.2%生成していることがわかった。

[0147] (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12 mM 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

[0148] 実施例11 (酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを還元型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、当該タンパク質の調製)

(1) 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを還元型に変換す

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

Journal of Applied Microbiology 111 (2011) 1075-1085に記載された*Bacillus* sp. F1(2010)株由来の蟻酸脱水素酵素のアミノ酸配列をもとに、そのコドン使用頻度が*大腸菌*におけるコドン使用頻度に近くなるように配列番号26で示される塩基配列を設計し、当該塩基配列に基づき、配列番号35で示される塩基配列 (CCATATGGCTAAGATCGTTTGC GTTCTGTAC) を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号36で示される塩基配列 (ACTCGAGAGCAGATTCTTGAAACGTGCAG) 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35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36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、組換えベクター pTrcFDH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。

[0149] [反応液組成]

pTrcFDH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	33.7 μ l

[0150] 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回を行い、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. 2 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. 2 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 断片を精製した。

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 $^{\circ}$ 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 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. 2 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。このようにして得られるプラスミドは、上記蟻酸脱水素酵素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 pETFDH と名付けた。

[0151] (2) 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを還元型に変換する能力を有するタンパク質の調製

組換えベクター pETFDH 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 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、37 $^{\circ}$ C、15 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離し、約 0. 8 g の湿菌体を得た。この湿菌体約 0. 8 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 (pH 7. 4) (即ち、バインディングバッファー) 10 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（0.1mmΦ）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7mlを得た。

得られた遠心上清液約7mlにバインディングバッファーを3ml追加して約10mlとした後、これを流速1ml/minでHisTrap HPカラム（ゲルベッド1ml）（GEヘルスケア社製）にアプライした。このカラムに約5mlのバインディングバッファーを流速1ml/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7ml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、9.5ml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30mMから230mM付近の画分4ml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0.1M Tris-HCl（pH8）へのバッファー交換を行い、約1mlの画分を得た。この画分を以下、蟻酸脱水素酵素精製酵素液と記す。

[0152] 実施例12（本発明の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）

プラスミドpET174SC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、0.1Mトリス-HClバッファー（pH8.0）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0.35mlに、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0.02ml、実施例9で得られたカタラーゼ精製酵素液（3.3gタンパク質/l）0.05ml、実施例11で

得られた蟻酸脱水素酵素精製酵素液（5.3gタンパク質/l）0.05ml、NAD+10mg、蟻酸アンモニウム2.5mg、及び実施例3で得られたロイシン脱水素酵素（A113G）精製酵素液（36gタンパク質/l）0.05mlを混合し、30℃で22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）酪酸の量に対してL-メチオニンが12.0%生成していることがわかった。

[0153] （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12mM1-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

[0154] プラスミドpET204SC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、0.1Mトリス-HClバッファー（pH8.0）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0.35mlに、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシ-4-（メチルチオ）酪酸（東京化成社製）の40%水溶液を0.02ml、実施例9で得られたカタラーゼ精製酵素液（3.3gタンパク質/l）0.05ml、実施例11で得られた蟻酸脱水素酵素精製酵素液（5.3gタンパク質/l）0.05ml、NAD+10mg、蟻酸アンモニウム2.5mg、及び実施例3で得られたロ

イシン脱水素酵素 (A113G) 精製酵素液 (36gタンパク質/l) 0.05 ml を混合し、30℃で22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)酪酸の量に対してL-メチオニンが7.7%生成していることがわかった。

[0155] (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12mM1-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

[0156] プラスミド pET4-36SC 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 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 0.1 g を、0.1 M トリス-HCl バッファー (pH 8.0) 1 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、遠心上清液約 0.7 ml を得た。得られた遠心上清液 0.35 ml に、アンモニア水を用い pH9 に調製した 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の 40% 水溶液を 0.02 ml、実施例 9 で得られたカタラーゼ精製酵素液 (3.3gタンパク質/l) 0.05 ml、実施例 11 で得られた蟻酸脱水素酵素精製酵素液 (5.3gタンパク質/l) 0.05 ml、NAD + 10 mg、蟻酸アンモニウム 2.5 mg、及び実施例 3 で得られたロイシン脱水素酵素 (A113G) 精製酵素液 (36gタンパク質/l) 0.05 ml を混合し、30℃で22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)酪酸の量に対して L-メチオニンが 33.9% 生成していることがわかった。

[0157] (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

実施例 13 (本発明組換えベクターの作製)

[0158] (1) 本タンパク質(B)をコードするポリヌクレオチドの調製

pTrc99A (GEヘルスケア社製) のシャインダルガノ配列付近の配列を参考に、配列番号 37 で示される塩基配列 (CGGATCCGAGGAAACAGACCATGG) を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 23 (2003) 239-247 に記載された *Bacillus sphaericus* IF 03525 株由来のロイシン脱水素酵素の配列をもとに、配列番号 38 で示される塩基配列 (ctcagagTTAACGGCCGTTCAAAATATT) を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。

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プライマーと配列番号 38 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとを用い、実施例 3 (2) に記載の組換えベクター pTrcLD(A113G) 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 を行う。

[0159] [反応液組成]

プラスミド pTrcLD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

[0160] 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分間保持する。

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する。約1.1kbのDNAのバンドが検出される。

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

[0161] (2) 本発明ベクターの作製

実施例5に記載の組換えベクターpTrc174を制限酵素BamHI及びXbaIにより二重消化させ、酵素消化されたDNAを精製する。

得られたDNAと上記(1)で精製される約1.1kbpのDNAとを混合し、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 を形質転換する。

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コロニーを無作為に選抜する。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時間振盪培養する。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す。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部をBamHI及びXbaIにより二重消化した後、アガロースゲル電気泳動に供する。得られたプラスミドに約1.1kbのDNAが挿入されていることを確認する。このようにして得られるプラスミドを以下、pTrc174LD(A113G)と記す。

[0162] 実施例5に記載の組換えベクターpTrc204を制限酵素BamHI及びXbaIにより

二重消化させ、酵素消化されたDNAを精製する。

得られたDNAと上記（１）で精製される約1.1 kbpのDNAとを混合し、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 を形質転換する。

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コロニーを無作為に選抜する。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時間振盪培養する。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す。取り出されたプラスミドのそれぞれの一部をBamHI及びXbaIにより二重消化した後、電気泳動に供する。得られたプラスミドに約1.1 kbpのDNAが挿入されていることを確認する。このようにして得られるプラスミドを以下、pTrc204LD(A113G)と記す。

[0163] 実施例5に記載のプラスミドベクターpTrc436を制限酵素BamHI及びXbaIにより二重消化させ、酵素消化されたDNAを精製する。

得られたDNAと上記（１）で精製される約1.1 kbpのDNAとを混合し、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 を形質転換する。

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コロニーを無作為に選抜する。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時間振盪培養する。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す。取り出したプラスミドのそれぞれの一部をBamHI及びXbaIにより二重消化した後、電気泳動に供する。得られたプラスミドに約1.1 kbpのDNAが挿入されていることを確認する。このようにして得られるプラスミドを以下、pTrc436LD(A113G)と記す。

[0164] 実施例14（本発明の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)

実施例 13 の (2) に記載のプラスミド pTrc174LD(A113G) を用いて *E. coli* JM109 株を形質転換する。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 時間振盪培養する。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得る。この湿菌体約 0.1 g を、0.1 M トリス-HCl バッファー (pH 8.0) 1 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 分間破砕処理する。得られた破砕液を 8000 rpm、4℃ にて 10 分間遠心分離し、遠心上清液約 0.7 ml を得る。得られた遠心上清液 0.35 ml に、アンモニア水を用い pH9 に調製した 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の 40% 水溶液を 0.02 ml、実施例 9 に記載のカタラーゼ精製酵素液 (3.3g タンパク質/l) 0.05 ml、実施例 11 に記載の蟻酸脱水素酵素精製酵素液 (5.3g タンパク質/l) 0.05 ml、NAD⁺ 10 mg、及び蟻酸アンモニウム 2.5 mg を混合し、30℃ で 22 時間振とうする。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う。反応に用いた 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸の量に対しての L-メチオニンの収率を確認する。

[0165] (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

[0166] 実施例 13 の (2) に記載のプラスミド pTrc204LD(A113G) を用いて *E. coli* JM109 株を形質転換する。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時間振盪培養する。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得る。この湿菌体約0.1gを、0.1Mトリス-HClバッファー (pH8.0) 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分間破碎処理する。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を得る。得られた遠心上清液0.35mlに、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸 (東京化成社製) の40%水溶液を0.02ml、実施例9に記載のカタラーゼ精製酵素液 (3.3gタンパク質/l) 0.05ml、実施例11に記載の蟻酸脱水素酵素精製酵素液 (5.3gタンパク質/l) 0.05ml、NAD⁺ 10mg、及び蟻酸アンモニウム 2.5mgを混合し、30℃で22時間振とうする。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う。反応に用いた2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸の量に対してのL-メチオニンの収率を確認する。

[0167] (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12mM1-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

[0168] 実施例13の(2)に記載のプラスミドpTrc436LD(A113G)を用いてE. coli JM109株を形質転換する。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時間振盪培養する。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体を得る。この湿菌体約0.1gを、0.1Mトリス-HClバッファー (pH8.0) 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分間破碎処理する。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を得る。得られた遠心上清液0.35mlに、アンモニア水を用いpH9に調製した2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸(東京化成社製)の40%水溶液を0.02ml、実施例9に記載のカタラーゼ精製酵素液(3.3gタンパク質/l)0.05ml、実施例11に記載の蟻酸脱水素酵素精製酵素液(5.3gタンパク質/l)0.05ml、NAD⁺10mg、及び蟻酸アンモニウム2.5mgを混合し、30℃で22時間振とうする。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う。反応に用いた2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸の量に対してのL-メチオニンの収率を確認する。

[0169] (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12mM1-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

[0170] 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]

[0171] 配列番号9-14

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15-17

オキシダーゼをコードするポリヌクレオチド

配列番号18-38

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 4 4 - 4 5

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 (A4) のいずれかのアミノ酸配列:
- (A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、
- (A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45% 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を有するタンパク質のアミノ酸配列、
- (A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれか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を有するタンパク質のアミノ酸配列、または
- (A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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] 配列番号 2、4、6、15、16 または 17 のいずれかで示される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] 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4記載の組換えベクター。

[請求項6]

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(B1)から(B3)のいずれかのアミノ酸配列である請求項5記載の組換えベクター：

(B1) 配列番号7で示されるアミノ酸配列、

(B2) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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

(B3) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

[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8]

宿主細胞が微生物または大腸菌である請求項7記載の形質転換体。

[請求項9]

請求項5または6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10]

宿主細胞が微生物または大腸菌である請求項9記載の形質転換体。

[請求項11]

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12〕 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；及び、

ii) 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13〕 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14〕 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から6のいずれか一項に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15〕 下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号1、3または5のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号1、3または5のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して45%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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号2、4または6のいずれか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を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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16]

下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、

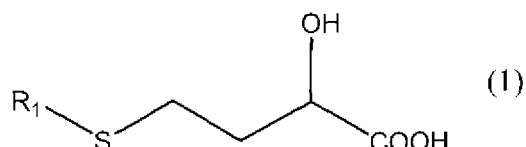
(A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、

(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれか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を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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を、 α -ヒドロキシカルボン酸化合物に作用させる工程を含む α -オキソカルボン酸化合物の製造方法。

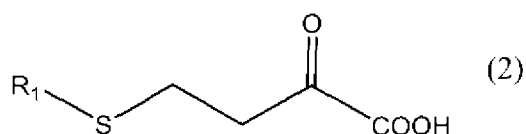
[請求項17] α -ヒドロキシカルボン酸化合物が含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が含硫 α -オキソカルボン酸化合物である請求項16に記載の製造方法。

[請求項18] 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る、請求項17に記載の製造方法。

[請求項19] 前記(A1)から(A4)のいずれかのアミノ酸配列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16から18のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項20] 前記形質転換体が、請求項7、8または11のいずれか一項に記載の形質転換体である請求項19記載の製造方法。

[請求項21] 前記工程が、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の存在下で行われる請求項16から20のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項22] 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がカタラーゼである請求項21記載の製造方法。

[請求項23] 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 2 1 または 2 2 記載の製造方法。

[請求項 24]

(1) 下記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列：

(A1) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列、

(A2) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 45% 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を有するタンパク質のアミノ酸配列、

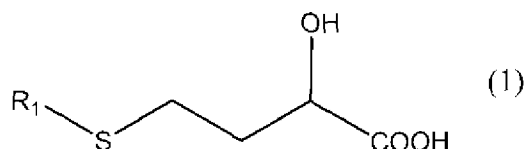
(A3) i) 配列番号 2、4 または 6 のいずれかで示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列であって、かつ、ii) 2-ヒドロキシー-4-(メチルチオ)酪酸誘導体を酸化して対応する 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、または

(A4) i) 配列番号 1、3 または 5 のいずれか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。

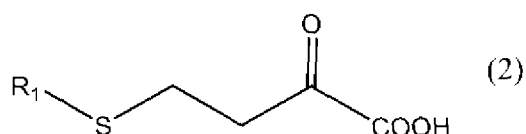
[請求項25] α -ヒドロキシカルボン酸化合物が含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物であり、対応する α -オキソカルボン酸化合物が含硫 α -オキソカルボン酸化合物であり、対応するL- α -アミノ酸化合物が含硫L- α -アミノ酸化合物である請求項24に記載の製造方法。

[請求項26] 含硫 α -ヒドロキシカルボン酸化合物が式(1)：



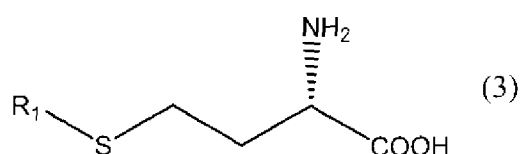
式中、R1は水素又は置換されていてもよい炭素数1-8のアルキル基を表す；

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、請求項23に記載の製造方法。

[請求項27] 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24から26のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項28] ロイシン脱水素酵素がバシラス・スファエリカス (Bacillus sphaericus) 由来のロイシン脱水素酵素である請求項27に記載の製造方法。

[請求項29] 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 (B1) から (B3) のいずれかのアミノ酸配列：

(B1) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列、

(B2) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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

(B3) 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) 2-オキソ-4-(メチルチオ)酪酸誘導体をアミノ化して対応するL-メチオニン誘導体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 24 から 27 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項30] 前記 (A1) から (A4) のいずれかのアミノ酸配列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 24 から 29 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項31] 前記形質転換体が、請求項 7 から 12 のいずれか一項に記載の形質転換体である請求項 30 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 24 から 31 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項33] 前記形質転換体が、請求項 9、10 または 12 のいずれか一項に記載の形質転換体である請求項 32 記載の製造方法。

- [請求項34] 工程（１）が、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の存在下で行われる請求項２４から３３のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項35] 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がカタラーゼである請求項３４記載の製造方法。
- [請求項36] 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３４または３５記載の製造方法。
- [請求項37] 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２４から３６のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項38] 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蟻酸脱水素酵素である請求項３７に記載の製造方法。
- [請求項39] 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３７または３８記載の製造方法。
- [請求項40] 工程（１）と工程（２）とが一つの反応系で行われる請求項２４から３９のいずれか一項に記載の製造方法。