

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-89097

(P2004-89097A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/06 B	
審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-256264 (P2002-256264)	(71) 出願人	391016967 島根大学長 島根県松江市西川津町1060
(22) 出願日	平成14年9月2日(2002.9.2)	(74) 代理人	100116861 弁理士 田邊 義博
特許法第30条第1項適用申請有り 2002年3月5日 発行の「日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会講演要旨集」に発表		(72) 発明者	澤 嘉弘 島根県松江市下東川津町266-13
		(72) 発明者	柴田 均 島根県松江市古志原6丁目22-54
		(72) 発明者	石川 孝博 島根県松江市西川津町694-1 合同宿舍西川津住宅4-2 04号
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素をコードするDNA、グルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物、および、グルタミン酸脱水素酵素の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 耐熱性があり、常温環境下における活性が高い酵素であって、NADを補酵素とするグルタミン酸脱水素酵素を得ること。

【解決手段】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質。(A)特定の配列を有するタンパク質。(B)上記記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

## 【請求項 2】

下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

## 【請求項 3】

下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質。

(C) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 27 番目のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

## 【請求項 4】

下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 27 番目のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

## 【請求項 5】

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質。

(E) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目と 27 番目の 2 つのアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

## 【請求項 6】

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目と 27 番目の 2 つのアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

## 【請求項 7】

請求項 2、請求項 4 又は請求項 6 に記載の DNA によりコードされるタンパク質が発現可能な形態で導入された微生物。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の微生物を培地で培養し、培養物中にグルタミン酸脱水素酵素を生成蓄積させ、該培養物よりグルタミン酸脱水素酵素を採取することを特徴とするグルタミン酸脱水素酵素の製造方法。

## 【請求項 9】

グルタミン酸脱水素酵素 yweB のアミノ酸残基を組み換えたグルタミン酸脱水素酵素であって、一对三組で六量体を形成する際に対を形成する相手方サブユニットのアミノ酸残基と水素結合するように、1 若しくは数個のアミノ酸残基を組み換えて野生型 yweB に比して耐熱性を備えたことを特徴とするグルタミン酸脱水素酵素。

## 【請求項 10】

10

20

30

40

50

配列番号 2 の先頭から 144 番目のアミノ酸残基をアルギニン残基に置換したことを特徴とする請求項 9 に記載のグルタミン酸脱水素酵素。

【請求項 11】

さらに、配列番号 2 の先頭から 27 番目のアミノ酸残基をフェニルアラニン残基に置換したことを特徴とする請求項 9 又は 10 に記載のグルタミン酸脱水素酵素。

【請求項 12】

請求項 9、10 又は 11 に記載のグルタミン酸脱水素酵素をコードする DNA を含み、当該 DNA によりコードされるグルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の微生物を培地で培養し、培養物中にグルタミン酸脱水素酵素を生成蓄積させ、該培養物よりグルタミン酸脱水素酵素を採取することを特徴とするグルタミン酸脱水素酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素をコードする DNA、グルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物、および、グルタミン酸脱水素酵素の製造方法に関し、特に、耐熱性があり NAD を補酵素とするグルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素をコードする DNA、グルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物、および、グルタミン酸脱水素酵素の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

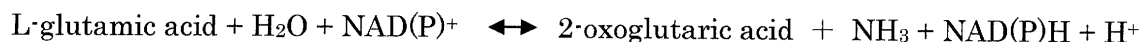
L-グルタミン酸 (L-glutamic acid) はタンパク質を構成するアミノ酸の一つであり、生体内で極めて有用なアミノ酸である。実際に、グルタミン酸を含めて、アミノ酸はアミノ酸輸液などの医薬としても広く用いられている。

【0003】

ここで、L-グルタミン酸と 2-オキソグルタル酸 (2-oxoglutaric acid) との間に、グルタミン酸脱水素酵素 (GluDH) と GluDH の補酵素 (NAD(P)) とを介した次の反応が知られている。

【0004】

【式 1】



・・・(式 1)

なお、式 1 では、NAD(P) を、NAD (ニコチンアミド - アデニンジヌクレオチド) と NADP (ニコチンアミド - アデニンジヌクレオチドリ酸) をまとめた表現として示している。これは、GluDH の補酵素要求性の違いによるものである。すなわち、GluDH は 3 種類の型があり、第一に、NAD を特異的に要求する酵素で動物組織、植物、細菌に分布するもの (NAD-GluDH: EC 1.4.1.2)、第二に、NADP を特異的に要求する酵素で酵母、細菌に存在するもの (NADP-GluDH: EC 1.4.1.4)、第三に、NAD, NADP のどちらも補酵素とすることができる酵素で動物の肝、腎などのミトコンドリアに局在するもの (NAD(P)-GluDH: EC 1.4.1.3) が知られている。

【0005】

従来では、このようなグルタミン酸を含んだ反応系を触媒する GluDH として、特開平 6-327471 「耐熱性グルタミン酸脱水素酵素及びその製造方法」に開示されるものが知られている。この公報では、Thermococcus litoralis Gl

10

20

30

40

50

u D H が開示され、極めて高い耐熱性を備えることが報告されている。

【0006】

同様に、グルタミン酸を含んだ反応系を触媒する G l u D H として、特開平 6 - 3 8 7 4 4 「新規な耐熱性グルタミン酸脱水素酵素及びその製造方法」に開示されるものが知られていた。この公報では、B a c i l l u s a c i d o c a l d a r i u s G l u D H が開示され、こちらも極めて高い耐熱性を備えることが報告されている。

【0007】

酵素が耐熱性を備えるということは、工業的な利便性が高いほか、保存性の観点からも好ましく定量試薬として用いるような場合でも操作性や取扱性に優れることを意味する。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

ここで、補酵素 N A D と N A D P を比較すると、N A D が N A D P に比して 1 / 3 の価格で提供されるので、式 1 の反応を用いる系では、N A D を補酵素とする G l u D H を用いることが好ましい。また、酵素は、一般に、長期間安定である（耐熱性がある）ことに加えて、加温や冷却が必要でないまたは僅かで済む温度領域、則ち、常温（15 ~ 40）付近で高い活性をもつものが望まれる。

【0009】

しかしながら、特開平 6 - 3 2 7 4 1 号公報に開示される T h e r m o c o c c u s l i t o r a l i s は、生育温度が 88 と極めて高温で、しかも嫌気環境を必要とするため、培養に特殊な装置が必要となり、大量に調製するのは困難であるという問題点があった。さらに、T h e r m o c o c c u s l i t o r a l i s G l u D H は、N A D P 型であるという問題点もある。

【0010】

一方、特開平 6 - 3 8 7 4 4 号公報に開示される B a c i l l u s a c i d o c a l d a r i u s G l u D H は N A D 型であるものの、B a c i l l u s a c i d o c a l d a r i u s の最適培養温度が 55 であり、必ずしも簡便には培養できないという問題点があった。しかも、B a c i l l u s a c i d o c a l d a r i u s G l u D H は、常温下での培養環境や試験環境で活性が低いという問題点があった。

【0011】

本発明は上記に鑑みてなされたものであって、耐熱性があり、常温環境下における活性が高い酵素であって、N A D を補酵素とするグルタミン酸脱水素酵素、当該グルタミン酸脱水素酵素をコードする D N A、当該グルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物、および、当該グルタミン酸脱水素酵素の製造方法を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意検討を行った結果、定方向進化（d i r e c t e d e v o l u t i o n）に基づく戦略を用い、B a c i l l u s s u b t i l i s（バチルスズブチルス：枯草菌）由来のグルタミン酸脱水素酵素（G l u D H）y w e B の一部のアミノ酸残基を変異させることにより本発明を完成するに至った。なお、y w e B は r o c G または i p a - 7 5 D と表現されるが、本願においては y w e B と表記することとする。

【0013】

すなわち本発明は以下のとおりである。

1.：

下記（A）又は（B）に示すタンパク質。

（A）配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から 144

10

20

30

40

50

番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号3の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基の位置が144番目からシフトしたとしてもこのアルギニン残基は残存させておくことを意味する。

【0014】

2. :

下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A)配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B)配列番号3に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から144番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号3の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基の位置が144番目からシフトしたとしてもこのアルギニン残基は残存させておくことを意味する。

10

【0015】

3. :

下記(C)又は(D)に示すタンパク質。

(C)配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D)配列番号4に記載のアミノ酸配列において、先頭から27番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から27番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号4の先頭から数えて27番目に位置するフェニルアラニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このフェニルアラニン残基の位置が27番目からシフトしたとしてもこのフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

20

【0016】

4. :

下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C)配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D)配列番号4に記載のアミノ酸配列において、先頭から27番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から27番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号4の先頭から数えて27番目に位置するフェニルアラニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このフェニルアラニン残基の位置が27番目からシフトしたとしてもこのフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

30

【0017】

5. :

下記(E)又は(F)に示すタンパク質。

(E)配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F)配列番号5に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目と27番目の2つのアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から144番目と27番目の2つのアミノ酸以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号5の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンと27番目に位置するフェニルアラニンを共に据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基とフェニルアラニン残基の位置がそれぞれ個別にシフトしたとしてもこのアルギニン残基とフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

40

50

## 【 0 0 1 8 】

6 . :

下記 ( E ) 又は ( F ) に示すタンパク質をコードする D N A。

( E ) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

( F ) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 1 4 4 番目と 2 7 番目の 2 つのアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から 1 4 4 番目と 2 7 番目の 2 つのアミノ酸以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号 5 の先頭から数えて 1 4 4 番目に位置するアルギニンと 2 7 番目に位置するフェニルアラニンを共に据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基とフェニルアラニン残基の位置がそれぞれ個別にシフトしたとしてもこのアルギニン残基とフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

10

## 【 0 0 1 9 】

7 . :

上記 2 . 4 . または 6 . に記載の D N A によりコードされるタンパク質が発現可能な形態で導入された微生物。

## 【 0 0 2 0 】

8 . :

上記 7 . に記載の微生物を培地で培養し、培養物中にグルタミン酸脱水素酵素を生成蓄積させ、該培養物よりグルタミン酸脱水素酵素を採取することを特徴とするグルタミン酸脱水素酵素の製造方法。

20

## 【 0 0 2 1 】

9 . :

グルタミン酸脱水素酵素 y w e B のアミノ酸残基を組み換えたグルタミン酸脱水素酵素であって、一对三組で六量体を形成する際に対を形成する相手方サブユニットのアミノ酸残基と水素結合するように、1 若しくは数個のアミノ酸残基を組み換えて野生型 y w e B に比して耐熱性を備えたことを特徴とするグルタミン酸脱水素酵素。ここで、組み換えるとは、アミノ酸配列の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位をいう。また、単に y w e B 又は野生型 y w e B と表現するときは、配列番号 1 又は 2 で表される G l u D H をいう。

30

## 【 0 0 2 2 】

1 0 . :

配列番号 2 の先頭から 1 4 4 番目のアミノ酸残基をアルギニン残基に置換したことを特徴とする上記 9 . に記載のグルタミン酸脱水素酵素。

## 【 0 0 2 3 】

1 1 . :

さらに、配列番号 2 の先頭から 2 7 番目のアミノ酸残基をフェニルアラニン残基に置換したことを特徴とする上記 9 . 又は 1 0 . に記載のグルタミン酸脱水素酵素。

## 【 0 0 2 4 】

1 2 . :

上記 9 . 1 0 . 又は 1 1 . に記載のグルタミン酸脱水素酵素をコードする D N A を含み、当該 D N A によりコードされるグルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物。

40

## 【 0 0 2 5 】

1 3 . :

上記 1 2 に記載の微生物を培地で培養し、培養物中にグルタミン酸脱水素酵素を生成蓄積させ、該培養物よりグルタミン酸脱水素酵素を採取することを特徴とするグルタミン酸脱水素酵素の製造方法。

## 【 0 0 2 6 】

なお、本発明では、耐熱性を有するとは、変異させる前、則ち野生型 ( W T ) の B a c i

50

*l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H ( y w e B )*に比して失活温度*T<sub>m</sub>*が上昇していることをいう。また、以降では*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H ( y w e B )*を単に*y w e B*とのみ表記する場合がある。

【0027】

【発明の実施の形態】

【0028】

以下、本発明の実施の形態を説明するが、本発明は記載した形態のみに限定されるものではなく、本明細書の記載および当分野で公知の技術に基づいて当業者が容易に修飾および改変し得る技術については本発明の範囲内に含まれるものである。なお、本明細書において、定方向進化とは、変異導入、選択、選択した変異体の増幅と、その変異体への更なる変異導入を繰り返し行うことにより、目的とする機能を向上させる手法をいう。 10

【0029】

ここでは、まず、*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H*遺伝子のクローニングについて述べ、続いて、*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H*の精製について言及する。そして、従来明らかでなかった*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H ( y w e B )*の性質について述べ、最後に、*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H ( y w e B )*の耐熱化について詳細に述べる。なお、遺伝子の単離およびこの遺伝子を含む組み換えベクターの作成、組み換えベクターによる形質転換体の作成、並びに形質転換体の培養等に関しては公知の方法、例えばモレキュラー・クローニング(コールドスプリングハーバー出版社、1989年)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(ウィリー・インターサイエンス出版社、1989年)等に挙げられている方法を組み合わせて行うことができるので、その詳細な記載を省略する。 20

【0030】

〔*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H*遺伝子のクローニング：染色体DNAの調製〕

まず、*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来グルタミン酸脱水素酵素遺伝子をクローニングするため、*B a c i l l u s s u b t i l i s A T C C 23857*をLB培地2 mlで37、18~20 hr振とう培養を行い、遠心(15000 rpm, 5分)にて集菌後、CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide)法(Nucleic Acids Research, 8, 4321-4325, 1980)を用いて染色体DNAの調製を行った。 30

【0031】

〔*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H*遺伝子のクローニング：PCRによる*G l u D H* 遺伝子の増幅〕

次に、目的遺伝子(*y w e B*, *y p c a*)の塩基配列情報(EMBL Z99123, EMBL L47648)に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いて*y w e B*および*y p c a*を含むDNA断片の増幅を行った。*y w e B*と*y p c a*は共に、*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来の*G l u D H*である。 40

【0032】

センスプライマーは図1に示す要領でデザインした。センスプライマー(配列番号6、7参照)の5'末端には*B a m H I*サイトを、アンチセンスプライマー(配列番号8、9参照)には*P s t I*サイトをつけてデザインした。

【0033】

図2に、実験に用いたPCR反応液の成分構成を示す。また、図3に、PCRサーマルサイクラー条件を示す。なお、実験では、*T a k a r a D N A T h e r m a l C y c l e r*のPCR装置を用いた。

【0034】

〔*B a c i l l u s s u b t i l i s*由来*G l u D H*遺伝子のクローニング：形質転換大腸菌の作製〕以上の手段ないし工程により、CTAB法によるゲノムDNAの調製を 50

行い、PCRにより増幅させた *yweB*、*ypcA* を得た。得られた PCR 増幅産物 (*yweB*、*ypcA* 共に約 1.4 kb) をアガロースゲル電気泳動で分離した後、そのバンドを切り出し、GENE CLEAN II (フナコシ社製) により精製した。これらの DNA 断片は、それぞれ pUC18 ベクター (タカラ酒造社製) の BamHI および PstI サイトにライゲーションし組み換え DNA を得た。得られた組み換え DNA を大腸菌 (*E. coli*) MV1184 コンピテントセル (日本ジーン社製) に導入し形質転換した。形質転換株は LB プレート (アンピシリン、X-Gal、IPTG 含有) 上でホワイトコロニーを形成することで選択した。この形質転換株からアルカリ-SDS 法によりプラスミド DNA を調製し、一部を BamHI と PstI で制限酵素処理し、電気泳動によりインサート DNA を確認した。これらの形質転換体の保持していたプラスミドを、*yweB* 形質転換体については pYWE、*ypcA* については pYPC と命名した。*yweB* 形質転換株については、SDS-PAGE でタンパク発現が確認でき、GluDH 活性も確認された。*ypcA* 形質転換株については SDS-PAGE での発現確認はできたが、GluDH 活性は全く検出されなかった。

10

## 【0035】

〔GluDH の活性測定〕

還元型補酵素 NADH は 340 nm に吸収極大をもつ。このことを利用して反応時の 340 nm における NADH (分子吸光係数  $6.2 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) の吸収の増減を追跡することにより活性測定を行った。活性 (Activity) の表示は、1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の  $\text{NAD}^+$  あるいは NADH の生成を触媒する酵素量を 1 unit と定義し、比活性は 1 mg protein 当たりの unit 数で  $\text{units}/(\text{mg protein})$  と表した。

20

## 【0036】

活性の評価式を式 2 に示す。

## 【式 2】

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{1 \text{ min 当たりの } A_{340} \text{ の変化量} \times 1000}{\text{酵素量 } (\mu\text{l}) / 6.2} \dots (\text{式 2})$$

30

また、アミノ化反応の概要を図 4 に、脱アミノ反応の概要を図 5 に示した。なお、タンパク量は、Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用い、牛血清アルブミンを標準タンパク質として検量線を作成し、そのタンパク量を求めた。

## 【0037】

〔Bacillus subtilis 由来 GluDH (*yweB*) の精製〕

精製にあたっては、*E. coli* MV1184 / *yweB* clone を、50 mg/ml Amp  $3 \mu\text{l}$  を含む LB 培地 3 ml で 37、18~20 hr 振とう培養を行い、次いで 50 mg/ml Amp  $750 \mu\text{l}$ 、1 M IPTG  $150 \mu\text{l}$  を含む LB 培地 750 ml にスケールアップし、18~20 hr、37 で振とう培養し、遠心 8,000 rpm 10 min で集菌した。最終的には、図 6 に示した方法 (30~40% 飽和硫酸沈殿工程、イオン交換 (DEAE) カラム工程、疎水性 (Butyl) カラム工程) で精製した。最終精製倍率は約 19 倍であり、図 7 に示したように、SDS-PAGE の結果からもほぼ均一に精製されていることが確認された。なお、精製表を図 8 に示した。

40

## 【0038】

〔Bacillus subtilis 由来 GluDH (*yweB*) の性質〕

次に、精製された *Bacillus subtilis* 由来 GluDH (*yweB*) の主な物理化学的および酵素化学的性質を調べた。

## 【0039】

50



〔*Bacillus subtilis* 由来 GluDH (yweB) の性質: N 末端アミノ酸配列決定〕

タンパク質の精製後、データベースに登録されている配列 (SWISS-PROT; P39633) と確認するために N 末端アミノ酸配列の確認を行った。方法として、PVDF 膜を用いたエレクトロブロットングによる調製を行った。サンプルを調製後、プロテインシーケンサー (島津製作所 PPSQ-10) による解析を行った。

【0040】

15 cycles 行った結果、N 末端より 15 残基についてデータベースに登録されている配列と同じであることを確認できた。なお、データベースに登録されている配列を、配列番号 2 に示す。

10

【0041】

〔*Bacillus subtilis* 由来 GluDH (yweB) の性質: 項分子量の検討〕

Native 酵素の分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用い、分子量マーカー (オリエンタル酵母工業社製: Glutamate dehydrogenase; 290,000、Lactate dehydrogenase; 142,000、Enolase; 67,000、Myokinase; 32,000、Cytochrome; 12,400) を流し、その溶出時間より作製したキャリブレーションカーブから換算した。サブユニット分子量は、最終精製酵素標品を 12.5% SDS-PAGE で泳動し、分子量マーカー (Pharmacia: Phosphorylase; 94,000、Albumin; 67,000、Ovalbumin; 43,000、Carbonic Anhydrase; 30,000) との相対移動度の比較および MALDI-TOF-Mass (PerSeptive Voyager DE-RP) スペクトル分析により算出した。

20

【0042】

その結果、Native 分子量は約 270,000 と算出された。サブユニット分子量は SDS-PAGE で約 46,000、MALDI-TOF-Mass スペクトルで 46,587 であり、アミノ酸配列より予想される分子量 46,638 と極めて近い値が得られた。この結果、他の多くの GluDH 同様、本酵素は六量体であると考えられる。なお、図 9 に、分子量の検討結果を示した。

30

【0043】

〔*Bacillus subtilis* 由来 GluDH (yweB) の性質: 最適 pH の測定〕

本酵素の最適 pH を、アミノ化、脱アミノ反応のそれぞれで活性測定を行うことにより決定した。Buffer は、pH 6.3~7.6 で KP Buffer、pH 7.0~8.8 で Tris-HCl Buffer、pH 8.8~9.6 で Carbonate Buffer を使用した。図 10 に示したように、yweB の最適 pH はアミノ化反応では pH 7.3 付近、脱アミノ反応では pH 7.7 付近であった。

【0044】

〔*Bacillus subtilis* 由来 GluDH (yweB) の性質: 反応速度論的解析〕

本酵素について、Kinetic Parameter の解析を行った。具体的には、 $k_{cat}$  と  $K_m$  を求めた。また、 $k_{cat}$  値は、酵素の代謝回転数 (turn number) または触媒定数と呼ばれ、酵素の活性部位が単位時間 (通常 1 秒) ごとに触媒する反応回数 (回転数) を表す。

40

【0045】

$k_{cat}$  と比活性と酵素の分子量の関係は式 3 で与えられる。

【式 3】

$$K_{cat} = \text{比活性} \times (1/60) \times \text{酵素の分子量} \times (1/1000) \quad \dots (式3)$$

なお、 $k_{cat} / K_m$  値は見かけの二次反応速度定数であり、遊離の酸素と基質との間の反応性を示すため、酸素の触媒効率を表す指標となる。

#### 【0046】

$K_m$  値は、アミノ化反応、脱アミノ反応の両反応でそれぞれの基質を様々な濃度で測定し、Lineweaver-Burk の逆数プロットから求めた。 $k_{cat}$  値は、サブユニットあたりの1分間1 mg の酵素により触媒される生成量として表した。結果を図11に示す。他の多くのアミノ酸脱水素酵素と同様、アミノ化反応の2-オキソグルタル酸に対する $k_{cat}$ 値は対応するL-グルタミン酸の脱アミノ反応に比べてかなり高いことが認められたが、その比率は20分の1と他のGluDHと比較して脱アミノ反応が低くなった。 $K_m$ 値においても、ほぼ他のGluDH同様の値でアンモニアに対する値がかなり高くなることが確認できた。

#### 【0047】

[Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の性質：基質特異性]

本酵素の基質特異性は、様々な補酵素、アミノ酸、ケト酸を指定濃度になるように加えて行った。反応はそれぞれのアミノ化、脱アミノ反応で行った。図12に示したように、本酵素はNADH およびNAD<sup>+</sup>を補酵素とし、2-オキソグルタル酸とL-グルタミン酸に対して高い特異性を示すことが確認された。

#### 【0048】

[Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の性質：耐熱性の検討]

酵素を各温度で20分間熱処理した後、アミノ化反応における残存活性を熱未処理の活性を100としたときの相対活性として示した。また各酵素を様々な温度で20 minの熱処理後、50%の残存活性を示す温度を失活温度 $T_m$ 値 (Melting Temperature)として求めた。また、NADHを0.4 mM加えて同様の処理を行い各酵素の残存活性を求めた。タンパク質濃度による保護効果の耐熱性への影響に考慮し、タンパク質濃度をほぼ等しくして実験を行った。図13に示したように、30℃付近より失活が認められた。50%の失活温度 ( $T_m$ )は41℃であった。NADH添加においても大幅な増強は見られなかった。

#### 【0049】

さらに、本酵素を様々な温度でインキュベート後の残存活性を検討した。図14に示したように、野生型のyweBは非常に不安定であり、37℃30 minで、20%程度にまで残存活性が低下することが確認された。また45℃以上では、最初の10 minで急激な失活が起こり、その後時間と共に緩やかに低下してゆくという、二相性も観察された。なお、図では、各温度の0 minでの活性を100としたときの相対活性を対数で表示している。

#### 【0050】

また、ここでは詳述しないが、本発明者は、別途検討により、尿素や塩酸グアニジンといったタンパク質の変性剤に対しても低い濃度で変性失活が生じることを確認している。また、酵素濃度の低下にしたがって、四次構造がくずれ、六量体から三量体あるいは二量体、単量体 (サブユニット) となり、失活するという知見を得ている。

#### 【0051】

[Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の耐熱化と解析：定方向進化戦略による耐熱化クローンの獲得]

次に、yweBを定方向進化に基づく戦略を用い耐熱化を図った。定方向進化法としてError-prone PCRによるランダム変異導入法を用いた。ランダム変異導入はLengらの方法に基づき、低濃度dATPでのError-prone PCR

10

20

30

40

50

法で行った。まず、各 0.25 mM dGTP、dCTP、dTTP と 4 μ の低濃度 dATP の状態で 10 cycles のミスセンスエラー誘発 PCR を行った。引き続き、0.25 mM dATP の添加により 25 cycles の増幅 PCR を行った。Primer は pUC18 に対する Sequencing Primers M13-RV (タカラ酒造社製)、M13-M4 (タカラ酒造社製) を用いた。

#### 【0052】

実験概要を図15に示した。耐熱化クローンのスクリーニングには Nitro blue tetrazolium (NBT) の還元による発色法を用いた。NBT の還元は一般的に NADH から Phenazine methosulfate (PMS) を介して好氣的条件下で O<sub>2</sub> の形成を通して起こる。GludH の反応により L-グルタミン酸 (L-glutamate) から 2-オキソグルタル酸 (2-OG) を生成する際に NAD<sup>+</sup> が NADH に還元し、図16に示した発色系が進行する。

#### 【0053】

PCR 産物を電気泳動で確認後、増幅産物を BamHI、PstI で制限酵素処理し、pUC18 にライゲーション後、得られた組み換え DNA を大腸菌 MV1184 コンピテントセル (日本ジーン社製) に導入し形質転換した。LB プレート (アンピシリン、X-Gal、IPTG 含有) 上のホワイトコロニーをピックアップし、50 mg/ml Amp 3 μl、1M IPTG 3 μl を含む LB 培地 3 ml で 37、一晩振とう培養を行い、遠心 15,000 rpm 5 min で集菌した。0.5 mg/ml Lysozyme を含む抽出バッファー [50 mM KP buffer pH 7.2 (2 mM EDTA)] 50 μl を加え Vortex で攪拌した。37 30 分間インキュベート後、遠心 (15,000 rpm 5 min) し、上清 10 μl を 96-well plate に添加した。続いて、抽出バッファー 140 μl を添加し、60 で、20 min 間インキュベートした。その後、GludH 反応液 (100 mM Tris buffer pH 7.7、0.5 mM NAD<sup>+</sup>、10 mM L-Glu、0.15% Triton X-100、0.3 mM NBT、0.1 mM PMS) を添加し、37 20 min インキュベート後のブルーフォルマザンの発色で耐熱化変異体を選択した。

#### 【0054】

最も耐熱性が見られた変異体を選択し、Error-prone PCR によるランダム変異導入処理および耐熱化 yweB のスクリーニングを計 5 回繰り返して行った。2 回目以降のスクリーニングは、それぞれ 70、20 min、75、20 min、80、20 min、80、40 min で行った。

#### 【0055】

最終的に 60 20 min の処理で残存活性約 60% を示す変異体を獲得した。図17に組み換え変異体と耐熱性の関係を示す。図示したように、野生型の残存活性は約 0.8% であった。得られたすべての変異体の全塩基配列決定を行い、明らかにした変異部位を図18に示す。表の左側の二つの数字 (A-B) は変異体の識別に用いたものであり、A はラウンド回数を、B はコロニーナンバーを示す。表に示したように、1-14 は E27V、2-26 は E27V と W100R、3-50 は E27V と R324A、4-18 は E27V と Q144R、5-12 は E27V と Q144R と G255A の変異が起きていることが確認された。すべての変異体に E27V 変異が保存されており、急激な耐熱性の増加が見られる 4-18 では Q144R の変異が確認されている。

#### 【0056】

[Bacillus subtilis 由来 GludH (yweB) の耐熱化と解析：変異酵素の作成]

続いて、変異の確認された E27V、W100R、R324A、Q144R、G255A それぞれの耐熱性への関与を検討するためにシングルミュータントの作製を行った。

#### 【0057】

変異導入するにあたり、プラスミド pYWE を制限酵素 BamHI と PstI で切断し、アガロースゲル電気泳動で yweB を分離した後、そのバンドを切り出し、GENE CLEAN II (フナコシ社製) により精製した。この DNA 断片を、pKF18k ベクター (タカラ社製) の BamHI および PstI サイトにライゲーションし組み換え DNA を得た。この際の宿主は E. coli JM109 を使用しカナマイシン含有培地を用いてブルー/ホワイト セレクションにより組み換え体を選択した。また、変異導入用合成オリゴヌクレオチド (Mutagenic oligonucleotide) は Selection Primer とは反対側の鎖にアニーリングさせなければならないので、lacZ 遺伝子の - 鎖と相補的になるよう設計した。変異導入に用いた合成オリゴヌクレオチドを、E27V に対しては配列番号 10 に、W100R に対しては配列番号 11 に、R324A に対しては配列番号 12 に、Q144R に対しては配列番号 13 に、G255A に対しては配列番号 14 にそれぞれ示す。

#### 【0058】

変異導入は Mutan-Super Express Km (タカラ酒造社製) を用いて行った。この PCR について図 19 に示した。これを E. coli MV118 に形質転換し、カナマイシン含有培地を用いて変異組み換え体を選択した。選択したシングルコロニーからプラスミド DNA を調製して DNA 塩基配列決定により変異の導入を確認した。

#### 【0059】

変異の確認には、ABI PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いる ABI PRISM 377 DNA Sequencer (ABI) を使用した。変異確認用 Primer は、ベクタープラスミドに対する Primer RV、および本酵素遺伝子の配列確認のために作製されたオリゴヌクレオチドより、E27V には M13 Primer RV (タカラ酒造社製)、W100R には Yw 5 (配列番号 15 参照)、R324A には Yw 6 (配列番号 16 参照)、Q144R には Yw 2 (配列番号 17 参照)、G255A には Yw 3 (配列番号 18 参照) を選んで使用した。

#### 【0060】

変異確認ができたコロニーよりプラスミドを調製し、BamHI と PstI で制限酵素処理、発現ベクター pUC18 へライゲーションし、E. coli MV1184 を形質転換した。このとき LB-プレート (アンピシリン、X-Gal、IPTG 含有) でブルー/ホワイトセレクションにより選択する。生育してきたコロニーからプラスミドを調製し、アガロースゲル電気泳動により、サイズ確認を行った。得られた形質転換株について SDS-PAGE を用いて発現確認を行ったところ、すべてに発現が確認され、GluDH 活性も認められたので耐熱性を含めて性質を調べた。

#### 【0061】

[ Bacillus subtilis 由来 GluDH (yweB) の耐熱化と解析：変異酵素の耐熱性検討 ]

各変異酵素の耐熱性を Crude extract で検討した。LB 培地 40 ml (50 mg/ml Amp 40 μl、1 M IPTG 40 μl) で 18 ~ 20 hr、37 で振とう培養後、超音波破碎し、遠心分離により Crude extract を調製した。50、60、20 min の熱処理後の残存活性を検討した。ここで、熱未処理のものの活性を 100 としたときの相対活性で示した。図 20 に結果を示す。

#### 【0062】

図に示したように、Q144R 変異体について顕著な耐熱性の上昇が確認された。統合計算化学システム MOE (Chemical Computing Group Inc.) のホモロジーモデリング機能で、Thermococcus litoralis GluDH の三次元座標をテンプレートとして yweB およびこれらの変異酵素の三次元構造モデル並びに四次構造モデルを作製した。図 21 は、作製した yweB 四次構造モデ

ルの概観図である。なお、図は、二量体を示しており、上下のサブユニットが上下対称となっていることがわかる。また、図の中央にQ (グルタミン)を明示したように、本酵素は144番目のアミノ酸残基がきわめて近接した場所に位置している。六量体はこの上下の対が三組束になった構造をとる。

#### 【0063】

解析の結果、Q144は構造上でサブユニット間のインターフェース部分(上下のサブユニット対の境界面部分)に位置しており、この部位が塩基性残基のArgに置換されることで、相手方のサブユニットの主鎖とArgのグアニジノ基との間で水素結合が形成され、サブユニットインターフェースが安定化したと思料される。また、E27Vについても僅かながら耐熱性の増加が見られた。E27は構造上で二つのドメイン間のヒンジ領域に位置している。この部位が疎水性アミノ酸に置換され、疎水性コアパッキングが増すことで安定化に影響を与えたと思料される。

10

#### 【0064】

[*Bacillus subtilis* 由来GlDH(yweB)の耐熱化と解析: 変異酵素の作製]

次に、より高い熱安定性をもった変異体を獲得するために、さらに変異体の作製を行った。Q144に関しては、正電荷を与えるK、H、負電荷を与えるD、E、疎水性残基であるL、サブユニット間のスペースを大きくするA、N、そしてサブユニット間のジスルフィド結合が期待されるCへの置換を行った。E27に関しては、疎水性残基であるF、正電荷を与えるK、R、そして構造上サイズの小さくなるAへの置換を行った。変異体の作製については前述のシングルミュータントの作製と同様に行った。

20

#### 【0065】

変異導入に用いた合成オリゴヌクレオチドを、Q144Dに対しては配列番号19に、Q144Eに対しては配列番号20に、Q144Kに対しては配列番号21に、Q144Hに対しては配列番号22に、Q144Nに対しては配列番号23に、Q144Aに対しては配列番号24に、Q144Lに対しては配列番号25に、Q144Cに対しては配列番号26に、E27Kに対しては配列番号27に、E27Rに対しては配列番号28に、E27Aに対しては配列番号29に、E27Fに対しては配列番号30にそれぞれ示す。

#### 【0066】

[*Bacillus subtilis* 由来GlDH(yweB)の耐熱化と解析: 変異酵素の耐熱性検討]

得られた各変異酵素の耐熱性をCrude extractで検討した。LB培地40 ml (50 mg/ml Amp 40  $\mu$ l、1 M IPTG 40  $\mu$ l)で18~20 hr、37で振とう培養後、超音波破碎し、遠心分離によりCrude extractを調製した。50、60、70 20 minの熱処理後の残存活性を検討した。ここで熱未処理のものの活性を100としたときの相対活性で示した。

30

#### 【0067】

図22および図23に結果を示す。図に示したように、Q144に関しては、元々の変異体であるQ144Rが最も高い熱安定性を示した。E27に関しては、E27Fが50での残存活性が約66%と最も高い値を示した。

40

#### 【0068】

よって、Q144については、50での残存活性が30%以上を示したQ144R、C、D、および正電荷を与えるものとしてKを選び、E27については、50での残存活性が30%以上を示したE27F、Kおよび元々の変異体であるVを選び更なる検討を行った。検討に際しては、変異酵素Q144R、C、D、K、E27F、K、Vそして変異体獲得における最終産物5-12の培養を行い、硫安沈殿、DEAEカラムまでの部分精製(純度60%以上)を行い、耐熱性の検討、および反応速度論的解析を行った。Q144RおよびE27Fについては、上記精製工程の後にButylカラム工程を加え純度95%以上にまで精製したものをを用いた。耐熱性の検討については、様々な温度で20 min インキュベート後の残存活性を検討し、それぞれの50%の残

50

存活性を示す温度を  $T_m$  値 (Melting Temperature) として求めた。熱未処理のものの活性を 100 としたときの相対活性で示した。反応速度論的解析については、アミノ化反応における各基質の  $K_m$  値の測定を行った。また、変異酵素 Q144R、E27F について、酵素を様々な濃度の下で 430 min 放置した前後の残存活性を検討した。

#### 【0069】

図24～図27に結果を示す。図示したように、Q144については、Q144Rが  $T_m$  値約62と野生型と比べて約20の上昇が見られた。他の変異酵素についても、多少の上昇が見られた。前述のように、Q144は構造上でサブユニット間のインターフェース部分に位置しており、この部位が塩基性残基の Arg に置換されることで、対を形成する相手方のサブユニットの主鎖と Arg のグアニジノ基との間で水素結合が形成され、イオン対ネットワーク (ion-pair network) 効果によりサブユニットインターフェースが安定化したと思料される。

10

#### 【0070】

E27については、E27Fが  $T_m$  値約48と野生型と比べて約7の上昇が見られた。E27は構造上で分子表面に位置している。始めに見つかったE27VよりもE27Fの方が  $T_m$  値の増加(約7)が見られることから、同じ疎水性残基でも構造的に大きいサイズのものになることによって分子内の空洞 (Cavity) をなくし、このスペースを最密充填に近づけ安定性の増加につながったのではないかと示唆される。

20

#### 【0071】

$K_m$  値について野生型のものと比較して大幅な変化は見られなかった。精製標品としてQ144R、E27Fについての  $k_{cat}$  値を算出した結果、野生型よりも増加が見られた(図24および図25参照)。これは安定性が増加したことで、反応速度に影響を及ぼしたためと考えられる。また、これらの変異部位では模型図の観察などから酵素活性に与える影響は少ないと思料された。

#### 【0072】

注目すべきは比活性である。ここで、Q144Rタイプが、耐熱性を有する従来の GluDH と比較し、常温で著しく高活性であることを示す。図25で示した  $k_{cat}$  はアミノ化の際の値であるが、Q144Rの脱アミノ (deaminating) の  $k_{cat}$  は37で22.8であった。これを式3に当てはめると、Q144Rの脱アミノの比活性が29.8 U / (mg protein) であることが分かる。一方、従来技術で挙げた特開平6-38744号に開示される *Bacillus acidocaldarius* GluDH の37における脱アミノの比活性は2.1 U / (mg protein) である。したがって、どちらの GluDH も NAD 型で、著しい耐熱性を示すが、本変異酵素は37で比活性が29.8 / 2.1 = 14倍高いことが確認された。

30

#### 【0073】

また、Q144R、E27Fについて、タンパク濃度の影響を検討してみたところ、低タンパク濃度下で野生型に比して安定性の増強が見られる(図27参照)。この結果からも、変異によりサブユニット間の相互作用が安定化され、四次構造の解離を防ぐ結果となったと思料される。

40

#### 【0074】

なお、図28に二量体構造を、図29に六量体構造の概念図を示した。計算機上で二量体を回転させたところ、Q144は二量体の二回軸近傍に位置していることが確認できた。二回軸とは二量体を180度回転させたときに一致する対象軸である。Q144Rが  $T_m$  値の著しい上昇をもたらす一因として、二回軸近傍に上下のサブユニットの橋渡しをする水素結合が形成されたことが挙げられる。したがって、本発明では、適宜Q144前後のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入、付加などして、サブユニット間の境界面付近または回転軸付近に水素結合の数を増やすように設計した酵素としても良い。

#### 【0075】

#### 【発明の効果】

50

以上説明したように、グルタミン酸脱水素酵素 y w e B の耐熱化を目的として、ランダム PCR と N B T の還元発色によるスクリーニングとを組み合わせ、合計 5 ラウンドの変異導入を行い、最終的に 60 20 min の処理で残存活性約 60 % を示す変異体が獲得できた。これは、野生型と比較して T m 値が 22 も上昇した変異体であり、酵素の耐熱化が種々報告されている中、類を見ないほどの上昇であることが確認できた。

【 0 0 7 6 】

また、全塩基配列決定し変異確認を行ったところ、Q 1 4 4 および E 2 7 の変異が耐熱性に貢献していたので、この部位のアミノ酸残基を種々置換して検討を行った結果、Q 1 4 4 R 変異体の T m 値が野生型と比べて 20 上昇し、E 2 7 F 変異体の T m 値は野生型と比べて約 7 上昇することが確認できた。

10

【 0 0 7 7 】

Q 1 4 4 R、E 2 7 F 変異体について、タンパク濃度の影響を検討してみたところ、野生型と比して明らかに低タンパク濃度下で安定性の増強が見られた。

【 0 0 7 8 】

また、耐熱性を備え N A D 型の G l u D H である B a c i l l u s a c i d o c a l d a r i u s G l u D H と比較しても、37 における脱アミノの比活性が 1.4 倍高く、高い活性を示すことが確認できた。

【 0 0 7 9 】

したがって、本発明によれば、耐熱性があり、常温 ( 15 - 40 ) 程度の温度環境下における活性が高い酵素であって、N A D を補酵素とするグルタミン酸脱水素酵素、当該グルタミン酸脱水素酵素をコードする D N A、当該グルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物、および、当該グルタミン酸脱水素酵素の製造方法を提供できた。

20

【 0 0 8 0 】

【 配列表 】

<110> Shimane University

<120> グルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素をコードするDNA、  
グルタミン酸脱水素酵素が発現可能な形態で導入された微生物、および、グルタ  
ミン酸脱水素酵素の製造方法

<130> P1SWA02022

10

<140>

<141>

<160> 30

<210> 1

20

<211> 1272

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1272)

30

<400> 1

atg tca gca aag caa gtc tcg aaa gat gaa gaa aaa gaa gct ctt aac 48

Met Ser Ala Lys Gln Val Ser Lys Asp Glu Glu Lys Glu Ala Leu Asn

1

5

10

15

tta ttt ctg tct acc caa aca atc att aag gaa gcc ctt cgg aag ctg 96

Leu Phe Leu Ser Thr Gln Thr Ile Ile Lys Glu Ala Leu Arg Lys Leu

40



20	25	30	
ggt tat ccg gga gat atg tat gaa ctc atg aaa gag ccg cag aga atg			144
Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met			
35	40	45	
ctc act gtc cgc att ccg gtc aaa atg gac aat ggg agc gtc aaa gtg			192
Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val			10
50	55	60	
ttc aca ggc tac cgg tca cag cac aat gat gct gtc ggt ccg aca aag			240
Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys			
65	70	75	20
ggg ggc gtt cgc ttc cat cca gaa gtt aat gaa gag gaa gta aag gca			288
Gly Gly Val Arg Phe His Pro Glu Val Asn Glu Glu Glu Val Lys Ala			
85	90	95	
tta tcc att tgg atg acg ctc aaa tgc ggg att gcc aat ctt cct tac			336
Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr			30
100	105	110	
ggc ggc ggg aag ggc ggt att att tgt gat ccg cgg aca atg tca ttt			384
Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe			
115	120	125	
gga gaa ctg gaa agg ctg agc agg ggg tat gtc cgt gcc atc agc cag			432
Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Gln			40
130	135	140	



ctc tac aac cca gac ggc ctt gat atc cct tat ttg ctc gat aaa cgg	816	
Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Leu Asp Ile Pro Tyr Leu Leu Asp Lys Arg		
260 265 270		
gac agc ttt ggt atg gtc acc aat tta ttt act gac gtc atc aca aat	864	
Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn		
275 280 285		10
gag gag ctg ctt gaa aag gat tgc gat att tta gtg cct gcc gcg atc	912	
Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile		
290 295 300		
icc aat caa atc aca gcc aaa aac gca cat aac att cag gcg tca atc	960	
Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile		20
305 310 315 320		
gtc gtt gaa cgg gcg aac ggc ccg aca acc att gat gcc act aag atc	1008	
Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile		
325 330 335		
ctg aat gaa aga ggc gtg ctg ctt gtg ccg gat atc cta gcg agt gcc	1056	30
Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala		
340 345 350		
ggc ggc gtc acg gtt tct tat ttt gaa tgg gtg caa aac aac caa gga	1104	
Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly		
355 360 365		40
tat tat tgg tcg gaa gaa gag gtt gca gaa aaa ctg aga agc gtc atg	1152	

Tyr Tyr Trp Ser Glu Glu Glu Val Ala Glu Lys Leu Arg Ser Val Met  
 370 375 380

gtc agc tcg ttc gaa aca att tat caa aca gcg gca aca cat aaa gtg 1200  
 Val Ser Ser Phe Glu Thr Ile Tyr Gln Thr Ala Ala Thr His Lys Val  
 385 390 395 400

gat atg cgt ttg gcg gct tac atg acg ggc atc aga aaa tcg gca gaa 1248  
 Asp Met Arg Leu Ala Ala Tyr Met Thr Gly Ile Arg Lys Ser Ala Glu  
 405 410 415

gca tcg cgt ttc cgc gga tgg gtc 1272  
 Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

10

20

<210> 2

<211> 424

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

Met Ser Ala Lys Gln Val Ser Lys Asp Glu Glu Lys Glu Ala Leu Asn  
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Thr Gln Thr Ile Ile Lys Glu Ala Leu Arg Lys Leu  
 20 25 30

Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met  
 35 40 45

30

40

Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val  
 50 55 60

Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys  
 65 70 75 80

Gly Gly Val Arg Phe His Pro Glu Val Asn Glu Glu Glu Val Lys Ala  
 85 90 95

Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr  
 100 105 110

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe  
 115 120 125

Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Gln  
 130 135 140

Ile Val Gly Pro Thr Lys Asp Ile Pro Ala Pro Asp Val Tyr Thr Asn  
 145 150 155 160

Ser Gln Ile Met Ala Trp Met Met Asp Glu Tyr Ser Arg Leu Arg Glu  
 165 170 175

Phe Asp Ser Pro Gly Phe Ile Thr Gly Lys Pro Leu Val Leu Gly Gly  
 180 185 190

Ser Gln Gly Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gln Gly Val Thr Ile Cys Ile

10

20

30

40

195	200	205	
Glu Glu Ala Val Lys Lys Lys Gly Ile Lys Leu Gln Asn Ala Arg Ile			
210	215	220	
Ile Ile Gln Gly Phe Gly Asn Ala Gly Ser Phe Leu Ala Lys Phe Met			
225	230	235	10
His Asp Ala Gly Ala Lys Val Ile Gly Ile Ser Asp Ala Asn Gly Gly			
245	250	255	
Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Leu Asp Ile Pro Tyr Leu Leu Asp Lys Arg			
260	265	270	20
Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn			
275	280	285	
Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile			
290	295	300	
Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile			
305	310	315	30
Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile			
325	330	335	
Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala			
340	345	350	40

Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly  
 355 360 365

Tyr Tyr Trp Ser Glu Glu Glu Val Ala Glu Lys Leu Arg Ser Val Met  
 370 375 380

Val Ser Ser Phe Glu Thr Ile Tyr Gln Thr Ala Ala Thr His Lys Val  
 385 390 395 400

10

Asp Met Arg Leu Ala Ala Tyr Met Thr Gly Ile Arg Lys Ser Ala Glu  
 405 410 415

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

20

<210> 3

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Mutant enzyme obtained by introduction of point mutation into  
 wild type GluDH gene (yweB) and its expression

<400>

Met Ser Ala Lys Gln Val Ser Lys Asp Glu Glu Lys Glu Ala Leu Asn  
 1 5 10 15

40

Leu Phe Leu Ser Thr Gln Thr Ile Ile Lys Glu Ala Leu Arg Lys Leu  
 20 25 30

Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met  
 35 40 45

Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val  
 50 55 60

10

Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys  
 65 70 75 80

Gly Gly Val Arg Phe His Pro Glu Val Asn Glu Glu Glu Val Lys Ala  
 85 90 95

20

Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr  
 100 105 110

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe  
 115 120 125

30

Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Arg  
 130 135 140

Ile Val Gly Pro Thr Lys Asp Ile Pro Ala Pro Asp Val Tyr Thr Asn  
 145 150 155 160

Ser Gln Ile Met Ala Trp Met Met Asp Glu Tyr Ser Arg Leu Arg Glu  
 165 170 175

40



Phe Asp Ser Pro Gly Phe Ile Thr Gly Lys Pro Leu Val Leu Gly Gly  
 180 185 190

Ser Gln Gly Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gln Gly Val Thr Ile Cys Ile  
 195 200 205

Glu Glu Ala Val Lys Lys Lys Gly Ile Lys Leu Gln Asn Ala Arg Ile  
 210 215 220

Ile Ile Gln Gly Phe Gly Asn Ala Gly Ser Phe Leu Ala Lys Phe Met  
 225 230 235 240

His Asp Ala Gly Ala Lys Val Ile Gly Ile Ser Asp Ala Asn Gly Gly  
 245 250 255

Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Leu Asp Ile Pro Tyr Leu Leu Asp Lys Arg  
 260 265 270

Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn  
 275 280 285

Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile  
 290 295 300

Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile  
 305 310 315 320

Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile

10

20

30

40

325

330

335

Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala  
 340 345 350

Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly  
 355 360 365

10

Tyr Tyr Trp Ser Glu Glu Glu Val Ala Glu Lys Leu Arg Ser Val Met  
 370 375 380

Val Ser Ser Phe Glu Thr Ile Tyr Gln Thr Ala Ala Thr His Lys Val  
 385 390 395 400

20

Asp Met Arg Leu Ala Ala Tyr Met Thr Gly Ile Arg Lys Ser Ala Glu  
 405 410 415

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

<210> 4

30

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant enzyme obtained by introduction of point mutation into  
 wild type GluDH gene (yweB) and its expression

40

<400> 2

Met Ser Ala Lys Gln Val Ser Lys Asp Glu Glu Lys Glu Ala Leu Asn  
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Thr Gln Thr Ile Ile Lys Phe Ala Leu Arg Lys Leu  
 20 25 30

Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met  
 35 40 45

Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val  
 50 55 60

Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys  
 65 70 75 80

Gly Gly Val Arg Phe His Pro Glu Val Asn Glu Glu Glu Val Lys Ala  
 85 90 95

Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr  
 100 105 110

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe  
 115 120 125

Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Gln  
 130 135 140

Ile Val Gly Pro Thr Lys Asp Ile Pro Ala Pro Asp Val Tyr Thr Asn

10

20

30

40

145	150	155	160	
Ser Gln Ile Met Ala Trp Met Met Asp Glu Tyr Ser Arg Leu Arg Glu				
	165	170	175	
Phe Asp Ser Pro Gly Phe Ile Thr Gly Lys Pro Leu Val Leu Gly Gly				
	180	185	190	10
Ser Gln Gly Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gln Gly Val Thr Ile Cys Ile				
	195	200	205	
Glu Glu Ala Val Lys Lys Lys Gly Ile Lys Leu Gln Asn Ala Arg Ile				
	210	215	220	20
Ile Ile Gln Gly Phe Gly Asn Ala Gly Ser Phe Leu Ala Lys Phe Met				
225	230	235	240	
His Asp Ala Gly Ala Lys Val Ile Gly Ile Ser Asp Ala Asn Gly Gly				
	245	250	255	
Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Leu Asp Ile Pro Tyr Leu Leu Asp Lys Arg				
	260	265	270	30
Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn				
	275	280	285	
Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile				
	290	295	300	40

Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile  
 305 310 315 320

Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile  
 325 330 335

Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala  
 340 345 350

10

Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly  
 355 360 365

Tyr Tyr Trp Ser Glu Glu Glu Val Ala Glu Lys Leu Arg Ser Val Met  
 370 375 380

20

Val Ser Ser Phe Glu Thr Ile Tyr Gln Thr Ala Ala Thr His Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Met Arg Leu Ala Ala Tyr Met Thr Gly Ile Arg Lys Ser Ala Glu  
 405 410 415

30

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

<210> 5

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Mutant enzyme obtained by introduction of point mutation into wild type GluDH gene (yweB) and its expression

<400>

Met Ser Ala Lys Gln Val Ser Lys Asp Glu Glu Lys Glu Ala Leu Asn  
 1 5 10 15

10

Leu Phe Leu Ser Thr Gln Thr Ile Ile Lys Phe Ala Leu Arg Lys Leu  
 20 25 30

Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met  
 35 40 45

20

Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val  
 50 55 60

Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys  
 65 70 75 80

Gly Gly Val Arg Phe His Pro Glu Val Asn Glu Glu Glu Val Lys Ala  
 85 90 95

30

Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr  
 100 105 110

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe  
 115 120 125

40

Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Arg  
 130 135 140

Ile Val Gly Pro Thr Lys Asp Ile Pro Ala Pro Asp Val Tyr Thr Asn  
 145 150 155 160

Ser Gln Ile Met Ala Trp Met Met Asp Glu Tyr Ser Arg Leu Arg Glu  
 165 170 175

10

Phe Asp Ser Pro Gly Phe Ile Thr Gly Lys Pro Leu Val Leu Gly Gly  
 180 185 190

Ser Gln Gly Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gln Gly Val Thr Ile Cys Ile  
 195 200 205

20

Glu Glu Ala Val Lys Lys Lys Gly Ile Lys Leu Gln Asn Ala Arg Ile  
 210 215 220

Ile Ile Gln Gly Phe Gly Asn Ala Gly Ser Phe Leu Ala Lys Phe Met  
 225 230 235 240

30

His Asp Ala Gly Ala Lys Val Ile Gly Ile Ser Asp Ala Asn Gly Gly  
 245 250 255

Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Leu Asp Ile Pro Tyr Leu Leu Asp Lys Arg  
 260 265 270

Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn  
 275 280 285

40

Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile  
 290 295 300

Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile  
 305 310 315 320

Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile  
 325 330 335

Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala  
 340 345 350

Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly  
 355 360 365

Tyr Tyr Trp Ser Glu Glu Glu Val Ala Glu Lys Leu Arg Ser Val Met  
 370 375 380

Val Ser Ser Phe Glu Thr Ile Tyr Gln Thr Ala Ala Thr His Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Met Arg Leu Ala Ala Tyr Met Thr Gly Ile Arg Lys Ser Ala Glu  
 405 410 415

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

10

20

30

40



<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
(sense) containing a BamHI restriction site for  
amplification of yweB

10

<400>

~~cgg~~atccgt agaggagaaa aagatgtcag ca

32

20

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
(sense) containing a BamHI restriction site for  
amplification of ypcA

30

<400>

~~cgg~~atccgt agaggaaact caaatggcag cc

32

40

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
(antisense) containing a PstI restriction site for  
amplification of yweB

10

<400>

cagctgcagg gtagcacct ttctct

26

<210> 9

20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
(antisense) containing a PstI restriction site for  
amplification of ypcA

30

<400>

cagctgcagc tgcaactcc tgcgat

26

<210> 10

40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

10

<400>

atcattaagg tagcccttcg g

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

<400>

ttatccattc ggatgacgct c

21

30

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

<400>

gtcgttgaag cggcgaacgg c

21

10

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

20

<400>

gccatcagcc ggatcgtcgg t

21

30

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

40

<b>&lt;400&gt;</b>		
<b>gatgccaatg ccgggctcta c</b>	<b>21</b>	
<b>&lt;210&gt; 15</b>		
<b>&lt;211&gt; 21</b>		10
<b>&lt;212&gt; DNA</b>		
<b>&lt;213&gt; Artificial Sequence</b>		
<b>&lt;220&gt;</b>		
<b>&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Designed DNA for sequencing of mutated yweB</b>		20
<b>&lt;400&gt;</b>		
<b>glatgaactc atgaaagagc c</b>	<b>21</b>	
<b>&lt;210&gt; 16</b>		
<b>&lt;211&gt; 21</b>		
<b>&lt;212&gt; DNA</b>		30
<b>&lt;213&gt; Artificial Sequence</b>		
<b>&lt;220&gt;</b>		
<b>&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Designed DNA for sequencing of mutated yweB</b>		
<b>&lt;400&gt;</b>		40
<b>gcttctcagt tttctgcaa c</b>	<b>21</b>	

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for sequencing of mutated yweB

<400>

cattatccat ttggatgacg c

21

20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for sequencing of mutated yweB

<400>

ctgtgatttg attggagatc g

21

40

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

10

<400>

gccatcagcg acatcgtcgg t

21

<210> 20

<211> 21

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

30

<400>

gccatcagcg agatcgtcgg t

21

<210> 21

<211> 21

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

<400>

gccatcagca agatcgtcgg t

21

10

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

<400>

gccatcagcc acatcgtcgg t

21

30

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA



for mutagenesis of yweB

<400>

gccatcagca acatcgtcgg t

21

<210> 24

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

20

<400>

gccatcagcg cgatcgtcgg t

21

<210> 25

<211> 21

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

40

<400>

gccatcagcc tgatcgtcgg t

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

<400>

gccatcagct gcatcgtcgg t

21

20

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

<400>

atcattaaga aagcccttcg g

21

40

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

10

<400>

atcattaaga gagcccttcg g

21

<210> 29

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB

30

<400>

atcattaagg cagcccttcg g

21

<210> 30

<211> 21

40

<212> DNA

**<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA  
for mutagenesis of yweB****<400>****atcattaagt ttgcccttcg g****21**

10

20

30

40

**【図面の簡単な説明】****【図 1】** プライマーのデザインを示した図である。**【図 2】** 実験に用いた PCR 反応液の成分構成を示した図である。**【図 3】** PCR サーマルサイクラー条件を示した図である。**【図 4】** アミノ化反応の概要を示した図である。**【図 5】** 脱アミノ反応の概要を示した図である。**【図 6】** 精製法の手順を示した図である。**【図 7】** SDS - PAGE により精製の確認を示した図である。**【図 8】** 精製表を示した図である。**【図 9】** 分子量の検討結果を示した図である。**【図 10】** 最適 pH の検討結果を示した図である。**【図 11】** GluDH のカイネティックパラメーターを示した図である。**【図 12】** 基質特異性の検討結果を示した図である。**【図 13】** 耐熱性の検討結果を示した図である。**【図 14】** GluDH 安定性における熱と時間効果の検討結果を示した図である。**【図 15】** 耐熱化クローンを得るための実験概要を示した図である。**【図 16】** 活性染色法によるスクリーニング系を示した図である。**【図 17】** 野生型 (WT) および変異体 GluDH の耐熱性検討結果を示した図である。**【図 18】** 変異酵素の変異部位を示した図である。**【図 19】** 変異導入 PCR のプロトコルを示した図である。**【図 20】** 変異酵素の残存活性について示した図である。**【図 21】** yweB 四次構造モデルの概観図である。**【図 22】** Q144 の変異酵素の耐熱性を示した図である。**【図 23】** E27 の変異酵素の耐熱性を示した図である。**【図 24】** 野生型および変異酵素のカイネティックパラメーターと T<sub>M</sub> 値を示した図である。**【図 25】** 野生型および変異酵素のカイネティックパラメーターを示した図である。**【図 26】** 野生型および各変異酵素の耐熱性を示した図である。**【図 27】** 野生型および変異酵素のタンパク濃度の関係を示した図である。**【図 28】** 四次構造 (二量体) の変異部位を拡大した図である。**【図 29】** 六量体構造の概念図を示した図である。

【 図 1 】

※ センズプライマーのデザイン

5'... \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*...3'  
 1 2 3 4 5 6 7

- 1...目的に応じた制限酵素サイトをおく。
- 2...クロニングする配列に対してフレーム調整のために塩基 (G) をおく。
- 3...Vector の *lac* プロモーターの働きを止めるために終止コドン (TAG) をおく。
- 4...pUC18 にクロニングするため pUC18 の *lacZ*SD 配列 (AGGA) をおく。
- 5...pUC18 の *lacZ*SD 配列から開始コドンまで 7 塩基であるために、それに対応させて組み込む。この配列は、目的遺伝子に由来する。
- 6...目的遺伝子の開始コドン (ATG)。
- 7...目的遺伝子の開始コドンに続く配列を 6 塩基程度おく。

【 図 2 】

(PCR Reaction Mixture)

Template dsDNA	1 μl (10 ng/μl)
Primer	各 5 μl (1 pmol/μl)
10×Ex PCR Buffer	5 μl
dNTP Mix	8 μl
<i>Ex Taq</i>	0.5 μl
滅菌蒸留水	25.5 μl
<b>total</b>	<b>50 μl</b>

【 図 3 】

(PCR サーマルサイクラー条件)

<i>yweB</i>		<i>ypeA</i>	
94°C 1 min	} 25 cycles	94°C 1 min	} 25 cycles
50°C 1 min		55°C 1 min	
72°C 3 min		72°C 3 min	

(PCR 装置 : TaKaRa DNA Thermal Cycler)

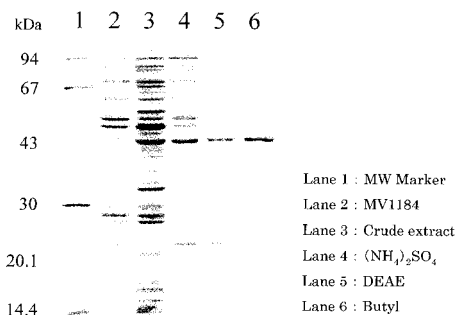
【 図 6 】

*yweB* の精製手順

- E.coli* MV1184 [GluDH Clone (*yweB*)]
  - 50 mM KP buffer pH 7.2 2 vol. (2 mM EDTA)
  - French Press (1,500 kg/cm<sup>2</sup>, 2 times)
  - centri. 37,000 rpm 60 min
  - sup.
  - 30%飽和硫酸
  - centri. 12,000 rpm 15 min
  - sup.
  - 40%飽和硫酸
  - centri. 12,000 rpm 15 min
  - 30%~40%硫酸沈殿を回収
  - できるだけ少ない 50 mM KP buffer pH 7.2 に懸濁
  - Dialysis (外液 50 mM KP buffer 2 mM EDTA)
- DEAE-TOYOPEARL 650S (HPLC)
  - Flow 4 ml/min
  - 0-0.5 M KCl で 60 min グラジエントにより溶出
- Butyl-TOYOPEARL (HPLC)
  - Flow 2 ml/min
  - 20-0% 硫酸で 30 min グラジエントにより溶出
- Purified GluDH

【 図 7 】

SDS-PAGE による精製確認結果



【 図 4 】

アミノ化反応 (Aminating)

500 mM Tris-HCl pH 7.3	200 μl	} 100 mM	
400 mM NH <sub>4</sub> Cl	250 μl		} 100 mM
4 mM NADH	25 μl		
GluDH	X μl		
蒸留水	425-X μl		
100 mM 2-oxoglutaric acid		100 μl (10 mM) pH 7.3	

340 nm の吸光度測定 測定温度 37°C

【 図 5 】

脱アミノ反応 (Deaminating)

500 mM Tris-HCl pH 7.7	200 μl	} 100 mM
50 mM NAD <sup>+</sup>	10 μl	
GluDH	X μl	
蒸留水	790-X μl	
100 mM L-glutamic acid		100 μl (10 mM) pH 7.7

340 nm の吸光度測定 測定温度 37°C

【 図 8 】

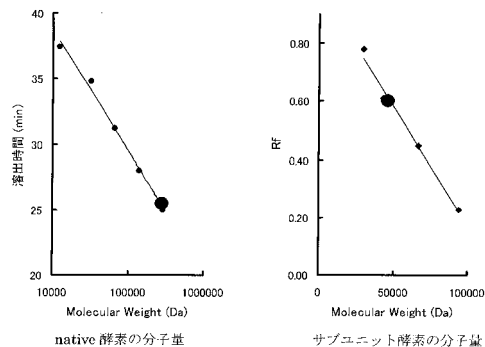
精製表

Step	Total protein (mg)	Total Act. (U)	S.A (U/mg)	Purify (fold)	Yield (%)
Crude extract	3734.58	42251.6	11.31	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1331.78	20895.2	15.69	1.4	49.5
DEAE-Toyopearl 650S	114.21	16040.3	140.45	12.42	37.9
Butyl-TOYOPEARL	21.06	7983.9	381.83	29.34	18.9

\*凍結菌体 26.3 g 使用

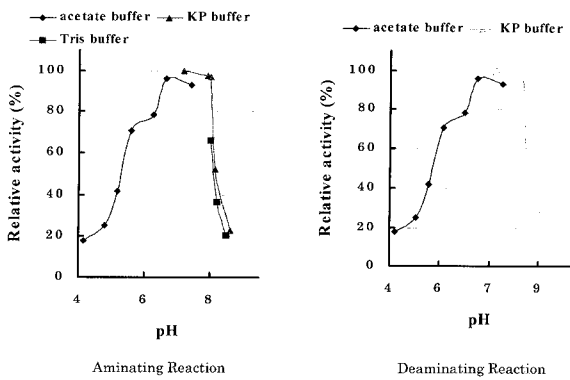
【 図 9 】

*yweB* 分子量の決定



【 図 1 0 】

*yweB* の反応指標 pH



【 図 1 2 】

基質特異性

Substrates	Concn (mM)	Relative Activity (%)
NADH	0.1	100
NADPH	0.1	0
NAD <sup>+</sup>	0.5	100
NADP <sup>+</sup>	0.5	0
2-Oxoglutarate	10	100
Oxaloacetate	10	4.88
Pyruvate	10	2.17
2-Ketobutyrate	10	1.08
L-Glutamate	10	100
D-Glutamate	10	0
L-Aspartate	10	0
L-Alanine	10	0
L-Valine	10	0
L-Serine	10	0

【 図 1 1 】

*yweB* のカインेटクスパラメータ

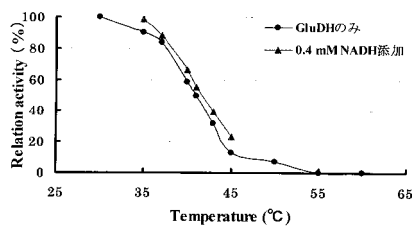
<i>k<sub>cat</sub></i> (s <sup>-1</sup> )		<i>K<sub>m</sub></i> (mM)			
Aminating	Deaminating	NADH	2-oxoglutaric acid	NH <sub>4</sub> Cl	L-Glutamic Acid
256.41	13.44	0.07	0.64	55.56	0.08

<i>k<sub>cat</sub></i> / <i>K<sub>m</sub></i> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )				
NADH	2-oxoglutaric acid	NH <sub>4</sub> Cl	NAD <sup>+</sup>	L-Glutamic Acid
3663	400.64	4.61	168	39.53

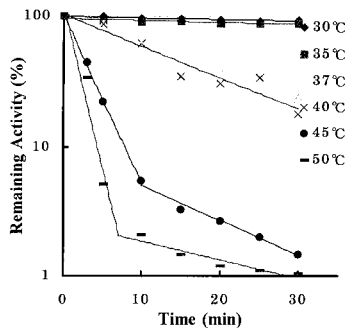
【 図 1 3 】

耐熱性の検討結果



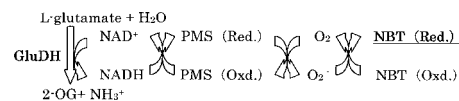
【 図 1 4 】

GluDH 安定性における熱・時間効果の検討結果

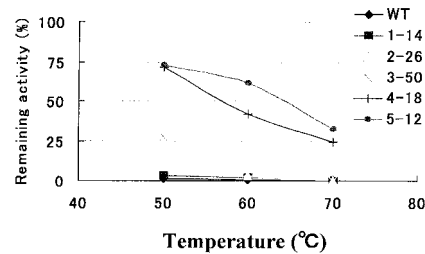


【 図 1 6 】

活性染色法によるスクリーニング



【 図 1 7 】

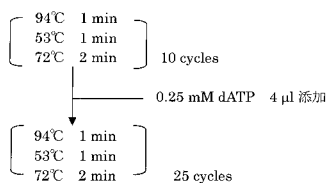


野生型及び変異体GluDHの耐熱性

【 図 1 5 】

Error-prone PCR の反応手順

Template DNA (プラスミド)	3 μl (1 ng)
M13 Primer RV	1 μl (10 pmol)
M13 Primer M4	1 μl (10 pmol)
Mg <sup>2+</sup> free Buffer	3 μl
dGTP, dCTP, dTTP	2.4 μl (0.25 mM each)
dATP	3 μl (4 μM)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.8 μl
<i>rTag</i>	0.5 μl
滅菌蒸留水	X μl
total	30 μl



【 図 1 8 】

変異酵素の変異部位

1-14	E27V
2-26	E27V W100R
3-50	E27V R324A
4-18	E27V Q144R
5-12	E27V Q144R G255A

【 図 19 】

「変異導入 PCR Mutan Super Express Km」

Template	2 $\mu$ l (10 ng)
primer soln.	4 $\mu$ l
10 $\times$ Ex Taq buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP mix	8 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq	0.5 $\mu$ l
滅菌蒸留水	30.5 $\mu$ l
total 50 $\mu$ l	
ミネラルオイル適量	
94 $^{\circ}$ C 1 min	25 cycles
55 $^{\circ}$ C 1 min	
72 $^{\circ}$ C 3 min	

【 図 21 】



【 図 20 】

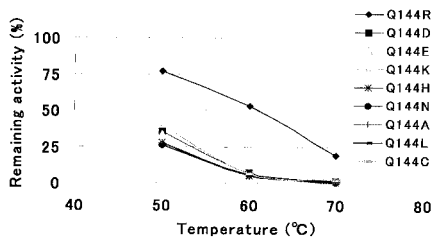
変異酵素の残存活性

	残存活性 (%)	
	50 $^{\circ}$ C	60 $^{\circ}$ C
WT	1.41	0.68
E27V	4.61	2.19
W100R	2.71	0.85
R324A	1.84	0.33
Q144R	76.71	52.73
G255A	12.67	1.77

yweBのダイマーモデル

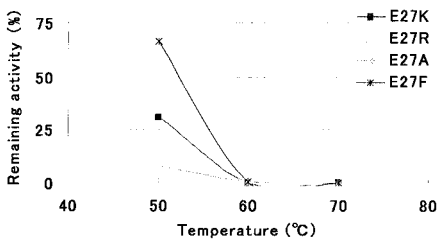
【 図 22 】

Q144シリーズ変異酵素の耐熱性試験結果



【 図 23 】

E27シリーズ変異酵素の耐熱性試験結果



【 図 24 】

野生型及び変異酵素のカイネティックパラメーターと Tm 値

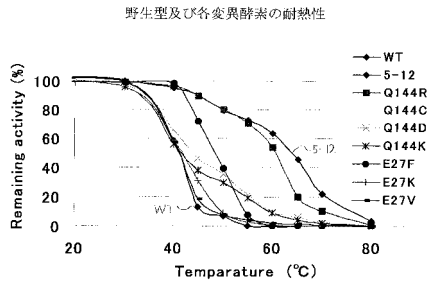
Enzyme	Km (mM)			Tm
	2-OG	NADH	NH <sub>4</sub> Cl	
WT	0.64	0.07	55.56	41
5-12	1.98	0.12	57.65	63
Q144R	1.22	0.41	56.84	61
Q144C	1.57	0.06	61.28	47
Q144D	2.31	0.22	59.23	43
Q144K	2.33	0.11	53.20	40
E27F	0.93	0.16	52.33	49
E27K	0.79	0.13	51.09	43
E27V	0.72	0.08	48.14	41

【 図 25 】

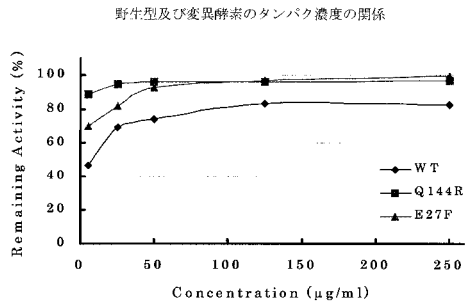
野生型及び変異酵素のカイネティックパラメーター

Enzyme	kcat (s <sup>-1</sup> )	kcat/Km (s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )		
		NADH	2-OG	NH <sub>4</sub> Cl
Wild Type	256.41	3663 (1)	400.64 (1)	4.61 (1)
Q144R	434.78	1060 (0.29)	356.38 (0.89)	7.65 (1.66)
E27F	344.02	2150 (0.59)	369.91 (0.92)	6.57 (1.43)

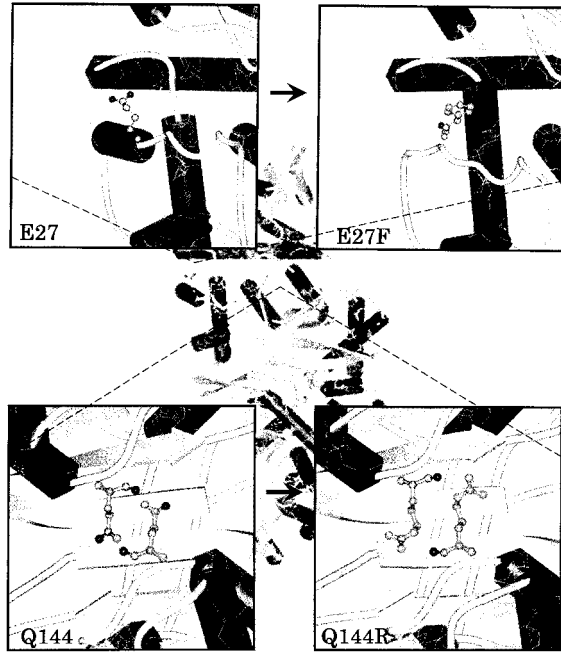
【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



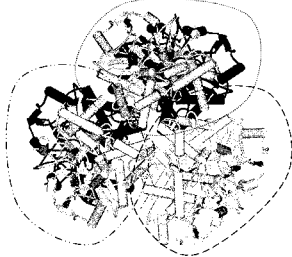
変異部位拡大図

【 図 2 9 】

六量体の上下の対を横から見た図  
 (上下の対をそれぞれ種類の異なる線で便宜的に囲んでいる)



六量体の上下対の3組を上から見た図





## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 9/06 C 1 2 N 5/00 A

(72)発明者 芦田 裕之

島根県松江市西川津町4 2 8 7

シャルマンらくざん I - 1 0 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 BA08 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04  
GA11 HA01  
4B050 CC03 DD02 LL01 LL02 LL03  
4B065 AA01X AA19Y AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA28 CA41 CA44  
CA46