

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5246639号  
(P5246639)

(45) 発行日 平成25年7月24日(2013.7.24)

(24) 登録日 平成25年4月19日(2013.4.19)

(51) Int. Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 P 13/06 (2006.01)	C 1 2 P 13/06	C
C 1 2 R 1/07 (2006.01)	C 1 2 P 13/06	C
C 1 2 R 1/10 (2006.01)	C 1 2 R 1:07	

請求項の数 15 外国語出願 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-254762 (P2007-254762)	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成19年9月28日(2007.9.28)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開2008-173116 (P2008-173116A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成20年7月31日(2008.7.31)	(73) 特許権者	504132272
審査請求日	平成22年5月19日(2010.5.19)		国立大学法人京都大学
(31) 優先権主張番号	2007104645		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(32) 優先日	平成19年2月7日(2007.2.7)	(74) 代理人	100100549
(33) 優先権主張国	ロシア(RU)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	特願2006-265452 (P2006-265452)	(74) 代理人	100089244
(32) 優先日	平成18年9月28日(2006.9.28)		弁理士 遠山 勉
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	小寺 智博
(31) 優先権主張番号	特願2006-345461 (P2006-345461)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(32) 優先日	平成18年12月22日(2006.12.22)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物由来の、イソロイシンから4-ヒドロキシイソロイシンを生成する水酸化酵素存在下でイソロイシン又はその塩を水酸化反応に供し、4-ヒドロキシイソロイシンを生成させる工程を含むことを特徴とする、4-ヒドロキシイソロイシン又はその塩の製造方法であって、

水酸化反応が、

- (f) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列を有するタンパク質、
- (g) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、
- (h) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列に対し少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種のL-イソロイシンジオキシゲナーゼの存在下または当該L-イソロイシンジオキシゲナーゼを含む細菌の存在下で水性溶媒中で行われる、方法。

【請求項2】

微生物がバチルス属に属する微生物である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

バチルス属に属する微生物がBacillus thuringiensis、Bacillus licheniformis、及び

、*Bacillus sphaericus*から選択される微生物である、請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】

水酸化反応が、微生物の対数増殖期細胞から調製された破砕液の存在下で行われる請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項5】

L-イソロイシンを水酸化反応に供する、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項6】

水酸化酵素が、ジオキシゲナーゼである、請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項7】

水酸化酵素が以下の性質を有する、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。

(a) 補因子として、酸素、 $Fe^{2+}$ 、アスコルビン酸、及び、2-オキソグルタル酸を要求する。

(b) 反応至適pHがpH5～pH8。

(c) 反応至適温度が45以下。

(d) 50以上で失活する。

(e) EDTAや $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ により阻害される。

【請求項8】

(f) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(g) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、

(h) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列に対し少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種のL-イソロイシンジオキシゲナーゼの存在下で水性溶媒中でL-イソロイシンを反応させ、生成した(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを単離することを含む(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン又はその塩の製造方法。

【請求項9】

(f) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(g) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、

(h) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列に対し少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群から選ばれるL-イソロイシンジオキシゲナーゼを含む細菌の存在下で水性溶媒中でL-イソロイシンを反応させ、生成した(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを単離することを含む(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン又はその塩の製造方法。

【請求項10】

前記細菌がL-イソロイシンジオキシゲナーゼの活性が増強されるように改変されている請求項9に記載の方法。

【請求項11】

L-イソロイシンジオキシゲナーゼの活性が、前記L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子の発現の増大により増強されている請求項10に記載の方法。

【請求項12】

L-イソロイシンジオキシゲナーゼの活性が、前記L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子の発現調節配列の改変、又は、前記L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子のコピー数の増大により増強されている請求項11に記載の方法。

【請求項13】

10

20

30

40

50

前記細菌が、Escherichia, Pseudomonas, Corynebacterium, Arthrobacter, Aspergillus又は Bacillus属に属する請求項9 ~ 12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記細菌が、Escherichia coli, Arthrobacter simplex, Corynebacterium glutamicum, Arthrobacter globiformis, Arthrobacter sulfureus, Arthrobacter viscosus 又は Bacillus subtilisに属する請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記細菌が、細菌培養物、細胞、細胞処理物又は細胞破碎液である請求項9 ~ 14のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物産業に関し、詳しくは、新規なジオキシゲナーゼ及び4-ヒドロキシ-L-イソロイシン又はその塩の製造法に関する。

【背景技術】

【0002】

4-ヒドロキシ-L-イソロイシンは、コロハ(フェヌグリーク)種子(Trigonella foenum-graecum L. leguminosae)から抽出、精製できるアミノ酸である。4-ヒドロキシ-L-イソロイシンは、興味深いインスリン分泌性(insulintropic)活性を示すが、これは、単離灌流ラット膵臓及びヒトの膵島の両者で実証されているように、その促進効果がミディアム中の血漿グルコース濃度に明白に依存するからである(Sauvaire, Y.ら, Diabetes, 47: 206-210, (1998))。そのようなグルコース依存性は、2型糖尿病[非インスリン依存性糖尿病、(NIDD) mellitus (NIDDM)]の治療に現在使用されている唯一のインスリン分泌活性薬であるスルホニル尿素(Drucker, D. J., Diabetes 47: 159-169, (1998))では確認されていない。その結果、低血糖症が依然として、スルホニル尿素治療の通常望ましくない副作用である。(Jackson, J., and Bessler, R. Drugs, 22: 211-245; 295-320, (1981); Jennings, A.ら. Diabetes Care, 12: 203-208, (1989))。またグルコース耐性の改善も知られている。(Am. J. Physiol. Endocrinol., Vol. 287, E463-E471, 2004)。このグルコース代謝増強活性とその医薬品と健康食品への応用の可能性が報告された(特開平6-157302号公報; US2007-000463A1)。

20

30

【0003】

植物にのみ発見されている4-ヒドロキシ-L-イソロイシンは、その特別なインスリン分泌性作用のために、様々な程度のインスリン耐性に関連するインスリン分泌不全を特徴とする疾病である2型糖尿病の治療用の可能性を秘めた新規分泌促進剤と見なしてもよい(Broca, C.ら, Am. J. Physiol. 277 (Endocrinol. Metab. 40): E617-E623, (1999))。

【0004】

フェヌグリーク抽出液中のジオキシゲナーゼ活性を利用する鉄、アスコルビン酸、2-オキシグルタル酸、酸素に依存するイソロイシンの酸化法が4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造法として、報告されている(Phytochemistry, Vol. 44, No. 4, pp. 563-566, 1997)。しかし、この方法は、20mM以上のイソロイシン濃度で酵素活性が基質で阻害され、この酵素が同定されていなく、酵素は植物の抽出液から誘導され、たやすく大量に得られなく、かつ、この酵素が安定でないために、4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造法として不十分である。

40

【0005】

光学的に純粋な(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンが全収率39%で得られる効率的な8工程合成が開示されている。この合成の重要な工程は、エチル2-メチルアセトアセテートをGeotrichum candidumでエチル(2S,3S)-2-メチル-3-ヒドロキシブタノエートに生物変換すること、及び不斉Strecker合成を含む(Wang, Q.ら, Eur. J. Org. Chem., 834-839 (2002))。

50

## 【 0 0 0 6 】

短い6工程で立体化学を完全に制御した(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシイソロイシンの化学酵素的合成も発表されているが、最終工程は市販のEupergit C(E-PAC)上固定化ペニシリン・アシラーゼGを使用したN-フェニルアセチルラクトン誘導体の加水分解による酵素的分割である(Rolland-Fulcrand, V. ら, J. Org. Chem., 873-877 (2004))。

## 【 0 0 0 7 】

しかし、現在、L-イソロイシンジオキシゲナーゼのクローニング、及び、L-イソロイシンジオキシゲナーゼを用いるL-イソロイシンの直接的酵素水酸化により(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを生成する報告はない。

## 【 0 0 0 8 】

微生物によるイソロイシン類似体の生産については、バチルス属細菌による2-アミノ-3-ケト-4-メチルペンタン酸(AMKP)生産の報告がある[Bioorganic Chemistry, Vol. 6, pp.263-271 (1977)]。しかしながら、微生物由来イソロイシン水酸化酵素に関する報告はない。

## 【 発明の開示 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の課題は、大量調製が可能な微生物由来の酵素を用いて4-ヒドロキシイソロイシン(遊離形態及びその塩形態の両方を含む意味で用い、「4HIL」とも呼ぶ。以下、同じ)を製造する方法を提供することにある。

## 【 0 0 1 0 】

本発明の課題には、イソロイシンから4-ヒドロキシイソロイシンを生成する酵素活性を有する微生物、及び、微生物由来酵素を用いる水酸化反応によりイソロイシンから4-ヒドロキシイソロイシンを製造する方法を提供することも包含される。上記の課題は、イソロイシンから4-ヒドロキシイソロイシンを生成する酵素活性を有する微生物を見出すことにより達成された。

## 【 0 0 1 1 】

本発明の課題は、(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン(遊離形態及びその塩形態の両方を含む意味で用い、「(2S,3R,4S)-4HIL」とも呼ぶ。以下、同じ)の製造を改良することであり、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ又はL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有する微生物を用いてL-イソロイシンの直接的酵素水酸化により(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン又はその塩を製造する方法を提供することにある。上記課題を解決すべく鋭意研究された結果、本願の発明者は、自然から、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性の高い細菌を単離し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子をクローニングし、目的の(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの合成に好ましくは用いることができるL-イソロイシンジオキシゲナーゼを見出し、本発明を完成した。

## 【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明の目的は、新規L-イソロイシンジオキシゲナーゼ及びL-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードするDNAwo提供し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼを用いる(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造方法を提供することである。上記の目的は、本発明の新規L-イソロイシンジオキシゲナーゼを見出すことにより達成された。

## 【 0 0 1 3 】

本発明の目的の一つは、微生物由来の、イソロイシンから4-ヒドロキシイソロイシンを生成する水酸化酵素存在下でイソロイシン又はその塩を水酸化反応に供し、4-ヒドロキシイソロイシンを生成させる工程を含むことを特徴とする、4-ヒドロキシイソロイシン又はその塩の製造方法を提供することである。

## 【 0 0 1 4 】

本発明のさらなる目的は、微生物がバチルス属に属する微生物である、上記の製造方法を提供することである。

## 【 0 0 1 5 】

本発明のさらなる目的は、バチルス属に属する微生物が*Bacillus thuringiensis*、*Bacillus licheniformis*、及び、*Bacillus sphaericus*から選択される微生物である、上記の製造方法を提供することである。

## 【0016】

本発明のさらなる目的は、水酸化反応が、微生物の対数増殖期細胞から調製された破砕液の存在下で行われる、上記の製造方法を提供することである。

## 【0017】

本発明のさらなる目的は、L-イソロイシンを水酸化反応に供する、上記の製造方法を提供することである。

## 【0018】

本発明のさらなる目的は、水酸化酵素が、ジオキシゲナーゼである、上記の製造方法を提供することである。

## 【0019】

本発明のさらなる目的は、水酸化酵素が以下の性質を有する、上記の製造方法を提供することである。

(a) 補因子として、酸素、 $Fe^{2+}$ 、アスコルビン酸、及び、2-オキソグルタル酸を要求する。

(b) 反応至適pHがpH5～pH8。

(c) 反応至適温度が45以下。

(d) 50以上で失活する。

(e) EDTAや $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ により阻害される。

## 【0020】

本発明のさらなる目的は、以下の性質を有し、バチルス属細菌から単離されうるジオキシゲナーゼを提供することである。

(a) 補因子として、酸素、 $Fe^{2+}$ 、アスコルビン酸、及び、2-オキソグルタル酸を要求する。

(b) 反応至適pHがpH5～pH8。

(c) 反応至適温度が45以下。

(d) 50以上で失活する。

(e) EDTAや $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ により阻害される。

(f) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定される分子量が31,000±20,000のサブユニットからなる。

(g) 配列番号2に示すアミノ酸配列をN末端に有する。

## 【0021】

本発明のさらなる目的は、バチルス属細菌が*Bacillus thuringiensis*である、上記のジオキシゲナーゼを提供することである。

## 【0022】

本発明のさらなる目的は、

(a) 配列番号1の塩基配列を含むDNA、

(b) 配列番号1の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(c) 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、

(d) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA、及び、

(e) 配列番号2のアミノ酸配列に対し少なくとも98%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる群から選ばれるDNAを提供することである。

## 【0023】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる目的は、上記を含むDNAとベクターDNAとを連結することにより得られる組換えDNAを提供することである。

【0024】

本発明のさらなる目的は、上記を含む組換えDNAにより形質転換された細胞を提供することである。

【0025】

本発明のさらなる目的は、上記組換えDNAを含む細胞を培地に培養し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質を、培地、細胞又はそれらの両方に蓄積させることを含む、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質の製造方法を提供することである。

10

【0026】

本発明のさらなる目的は、

(f) 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(g) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、

(h) 配列番号2のアミノ酸配列に対し少なくとも98%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群から選ばれるタンパク質を提供することである。

【0027】

20

本発明のさらなる目的は、下記の性質を有するタンパク質を提供することである。

(A) L-イソロイシンの水酸化により(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを生成する反応を触媒する活性を有する。

(B) 前記活性が二価カチオン $Fe^{2+}$ に依存する。

(C) SDS-PAGEにより測定した分子量が約 $29 \pm 2.0$  kDaである。

【0028】

本発明のさらなる目的は、

(f) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(g) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、

(h) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列に対し少なくとも70%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種のL-イソロイシンジオキシゲナーゼの存在下で水性溶媒中でL-イソロイシンを反応させ、生成した(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを単離することを含む(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン又はその塩の製造方法を提供することである。

30

【0029】

本発明のさらなる目的は、

(f) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(g) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、

(h) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列に対し少なくとも70%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群から選ばれるL-イソロイシンジオキシゲナーゼを含む細菌の存在下で水性溶媒中でL-イソロイシンを反応させ、生成した(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを単離することを含む(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン又はその塩の製造方法を提供することである。

40

【0030】

50

本発明のさらなる目的は、前記細菌がL-イソロイシンジオキシゲナーゼの活性が増強されるように改変されている上記の方法を提供することである。

【0031】

本発明のさらなる目的は、L-イソロイシンジオキシゲナーゼの活性が、前記L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子の発現の増大により増強されている上記の方法を提供することである。

【0032】

本発明のさらなる目的は、L-イソロイシンジオキシゲナーゼの活性が、前記L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子の発現調節配列の改変、又は、前記L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子のコピー数の増大により増強されている上記の方法を提供することである。

10

【0033】

本発明のさらなる目的は、前記細菌が、*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*又は*Bacillus*属に属する上記の方法を提供することである。

【0034】

本発明のさらなる目的は、前記細菌が、*Escherichia coli*, *Arthrobacter simplex*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter sulfureus*, *Arthrobacter viscosus* 又は*Bacillus subtilis*に属する上記の方法を提供することである。

【0035】

本発明のさらなる目的は、前記細菌が、細菌培養物、細胞、細胞処理物又は細胞破碎液である上記の方法を提供することである。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

本明細書において、4-ヒドロキシイソロイシンとは、(2S,3S,4S)-4-ヒドロキシイソロイシン[(2S,3S,4S)-4-hydroxyisoleucine]、(2S,3R,4R)-4-ヒドロキシイソロイシン[(2S,3R,4R)-4-hydroxyisoleucine]、(2S,3S,4R)-4-ヒドロキシイソロイシン [(2S,3S,4R)-4-hydroxyisoleucine]及び(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシイソロイシン [(2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine]からなる群より選ばれる1種、又は2種以上のジアステレオマー混合物をいう。4-ヒドロキシイソロイシンは、好ましくは、(2S,3R,4S)もしくは(2R,3R,4S) -4-ヒドロキシイソロイシン、又は、それらの混合物であり、更に好ましくは、(2S,3R,4S) -4-ヒドロキシイソロイシンである。

30

【0037】

特に、「(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン」又は「(2S,3R,4S)-4-HIL」は、単一の化合物又は(2S,3R,4S) -4-ヒドロキシイソロイシンを含む混合物をいうことがある。

【0038】

本明細書で用いる「細菌」又は「微生物」の語は、酵素生産細菌又は微生物、このような細菌又は微生物の、目的酵素活性がある又は増強されている変異体及び遺伝子組換え体を包含する。

【0039】

< I > イソロイシンから4HILを生成する酵素活性

本発明の水酸化酵素によるイソロイシン水酸化反応を介した4-ヒドロキシイソロイシン製造方法において用いる水酸化酵素としては、イソロイシンを4-ヒドロキシイソロイシンに変換する酵素活性を有する限り、微生物の培養物、菌体、細胞破碎液による粗精製酵素、又は精製酵素のいずれでも用いることが出来るが、細胞破碎粗酵素や精製酵素であることが望ましい。

40

【0040】

水酸化酵素としては、オキシゲナーゼやジオキシゲナーゼ等が挙げられるが、好ましくは、ジオキシゲナーゼである。さらに好ましくは、2-e-2菌株から単離され得る、下記の性質を有する水酸化酵素である。

50

## 【0041】

(a) 補因子として、酸素、 $Fe^{2+}$ 、アスコルビン酸、及び、2-オキソグルタル酸を要求する。

(b) 反応至適pHがpH5～pH8。

(c) 反応至適温度が45以下。

(d) 50以上で失活する。

(e) EDTAや $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ により阻害される。

## 【0042】

2-e-2菌株から単離され得る水酸化酵素はさらに以下の性質を有する。

(f) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定される分子量が31,000±20,000のサブユニットからなる。

(g) 配列番号2に示すアミノ酸配列をN末端に有する。

10

## 【0043】

水酸化酵素が補因子を要求する場合には、系に補因子を添加又は供給することが好ましい。補因子としては、例えば、ジオキシゲナーゼの場合には、 $Fe^{2+}$ 、アスコルビン酸、及び、2-ケトグルタル酸が挙げられる。これらの補因子は、塩となり得る場合には、塩として系に添加又は供給してもよい。

## 【0044】

微生物としては水酸化反応条件下、イソロイシンを4-ヒドロキシイソロイシンに変換する酵素活性を有する微生物であれば、いずれの微生物でも用いることができる。

20

## 【0045】

用いられる微生物として、バチルス属に属する微生物、あるいはその突然変異体や誘導体などが挙げられる。また当該水酸化酵素を組換え発現させた微生物であって、4-ヒドロキシイソロイシンを生成する活性を有するものであってもよい。

## 【0046】

具体的には*Bacillus thuringiensis*(2-e-2株、AKU238株、NBRC3958株、ATCC35646株等)や、*Bacillus licheniformis*(AKU223株、IAM11054株等)、*Bacillus sphaericus*(AKU227株、NBRC3526株等)があげられる。2-e-2株は、AJ110584株と命名され、ブタペスト条約に基づいて2006年9月27日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6)にFERM BP-10688として寄託されている。

30

## 【0047】

なお、上記微生物について、株名がAKUから始まるものは、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究室より分譲を受けることができる。株名がIAMから始まるものは、東京大学分子細胞生物学研究所バイオリソシス研究分野IAMコレクションに保管されていて、登録番号を利用して、分譲を受けることができる。各菌株に対応する登録番号は、IAMのカタログに記載されている(IAM Catalogue of strain Third Edition,2004)。株名がNBRCから始まるものは、独立行政法人製品評価技術基盤機構(〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)より分譲を受けることができる。株名がATCCから始まるものは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)より分譲を受けることができる(住所 ATCC, Address: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1,United States of America)。

40

## 【0048】

*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株は、本発明者らによって京都市の土壌より新たに分離された菌株であって、その科学的性質を以下に示す。

## 【0049】

*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株の分類学的性質

## 1. 表現形質

## 細胞形態

桿菌(大きさ:1.0-1.2×2.0-3.0 μm)

50



グラム染色	+
内生孢子	+
酸素に対する態度	好気性
生育温度	20-35 で良好な生育
至適	pH 7.0 ~ 7.5

## 【 0 0 5 0 】

## 2. 16S rDNAの塩基配列に基づく分子系統解析

本2-e-2菌株の16S rDNAの塩基配列（配列番号1）を用いて、BLASTにより細菌基準株データベース（エヌシーアイエムピー・ジャパン、静岡）及び国際塩基配列データベース（GeneBank/DDBJ/EMBL）に対し相同検索を行い、それぞれ相同率の上位30株を決定した。その後、細菌基準株データベースで検索された上位30株と各検体の16S rDNA塩基配列を用いて近隣結合法により分子系統樹を作成した。相同性検索及び簡易分子系統樹の作成にはDNASISpro（日立ソフトウェアエンジニアリング、東京）を使用した。

10

## 【 0 0 5 1 】

BLASTを用いた細菌基準株データベースに対する相同性検索の結果、2-e-2株の16S rDNA部分塩基配列は相同性100%で、*Bacillus thuringiensis* ATCC10792株の16S rDNAと一致した。GenBank/DDBJ/EMBLに対する相同性検索の結果においても、2-e-2株の16S rDNAは*Bacillus thuringiensis*に対し、高い相同性を示した。また、2-e-2株の16SrDNAと細菌基準株データベースに対する相同性検索上位30株の16S rDNAを用いた簡易分子系統解析の結果、2-e-2株は*Bacillus thuringiensis*の16S rDNAとほぼ同一の系統枝を形成し、非常に近縁である事が示された。

20

## 【 0 0 5 2 】

## 3. 分類・同定の結果

簡易形態観察の結果、2-e-2株は*Bacillus*の一般的な性状を示し、16S rDNA部分配列解析の結果からも、2-e-2株は*Bacillus thuringiensis*に帰属する事が示された。2-e-2と同一レベルのAMKP生産活性を示す微生物は見出されなかったため、本株を新規の株と同定した。

## 【 0 0 5 3 】

本発明で用いられる微生物の培養は、通常の培養方法に従って行うことができる。培養に用いられる培地は、用いる微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

30

## 【 0 0 5 4 】

炭素源としては、用いる微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、シュークロース、マルトース、澱粉、澱粉加水分解物、糖蜜などの糖類や、酢酸、乳酸、グルコン酸などの有機酸、あるいはエタノール、プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。窒素源としては、用いる微生物が資化しうるかぎり、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物等を用いることができる。

40

## 【 0 0 5 5 】

無機塩としては、用いる微生物が利用しうるかぎり、リン酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどを用いることができる。他に微量元素としてカルシウム、亜鉛、ほう素、銅、コバルト、モリブデンなどの塩類を加えてもよい。また必要に応じてチアミン、ビオチンのようなビタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸のようなアミノ酸、アデニン、グアニンのような核酸関連物質などを添加してもよい。

## 【 0 0 5 6 】

培養は、振盪培養又は深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は10 ~ 37 がよく、培養時間は5 ~ 40時間である。培養中pHは、5.0 ~ 9.0に保持す

50

る。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0057】

本発明において用いられる細胞破碎粗酵素、すなわち微生物の細胞破碎液としては、菌体外の水酸化酵素を含むものであればよく、菌体の界面活性剤又は有機溶剤処理物、酵素処理物、超音波処理物、機械的摩砕処理物、溶媒処理物、菌体の蛋白質分画、菌体処理物の固定化物などがあげられる。細胞破碎液は、対数増殖期細胞から調製することが好ましい。

【0058】

細胞破碎液の調製法に関して、培養菌体は生理食塩水などの等張液で洗浄した後、フレンチ・プレス、ガラスビーズ、超音波破碎器、マントン・ガウリン・ホモゲナイザー、乳鉢などによる圧搾粉碎や、これらの組み合わせなど、如何なる方法でも良い。更に効率的な破碎のため、細胞を凍結処理や、酵素処理などにより細胞膜表面に物理的、化学的処理を行っても良い。細胞破碎時は、常に低温を維持し、破碎処理により破碎液の温度が上昇した場合は、速やかに冷却すれば良い。

10

【0059】

細胞破碎液の水性媒体としては、水、ホウ酸塩、酢酸塩、炭酸塩、トリス、リン酸塩、クエン酸塩、Goodバッファー等の緩衝液があげられるが、これらに限定されるものではない。また酵素安定化剤としてグリセロールやDTT等を添加しても良いし、プロテアーゼ阻害剤として、EDTA、EGTA、PMSF、ペプスタチン、E-64等を添加しても良いし、阻害剤の組み合わせや、阻害剤カクテルなどを添加しても良い。

20

【0060】

上記の細胞破碎液を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成反応する場合の基質液組成は、5mM イソロイシン、5mM 2-ケトグルタル酸、5mM アスコルビン酸、5mM  $Fe^{2+}$  を含有する100mM HEPES緩衝液(pH7.0)、液量100 $\mu$ lとし、30、60分間反応する。緩衝液はHEPES以外にも、MESやGTA広域緩衝液など如何なる緩衝液でも良い。反応液は必要に応じて酵素失活し、遠心上清画分をフィルター濾過し、高速液体クロマトグラフィーやTLCを用いて4-ヒドロキシイソロイシンの生成を確認する。

【0061】

4-ヒドロキシイソロイシンの定量は、他の成分との分離可能な分析系であればどのような方法を用いても良いが、例えばTLCや高速液体クロマトグラフィーがあげられる。この内、高速液体クロマトグラフィーは高感度・高分離であることから定量分析には優れている。例えばアミノ酸分析法のウォーターズ AccQ・Tag<sup>TM</sup>メソッド等があげられる。ウォーターズ AccQ・Tag<sup>TM</sup>メソッドの改変法(後記実施例参照)により、4-ヒドロキシイソロイシンのジアステレオマー分離や、天然体4-ヒドロキシイソロイシンと4-ヒドロキシイソロイシンの水酸基が酸化されたケト体である、2-アミノ-3-メチル-4-ケトペンタン酸の分離が可能である。

30

【0062】

本発明により製造された4-ヒドロキシイソロイシンは、通常用いられるアミノ酸の精製法を用いて単離することができる。例えば、遠心分離により固形物を除いた反応液上清から、イオン交換樹脂や膜処理法、晶析法などの操作を組み合わせ、4-ヒドロキシイソロイシンを単離することができる。

40

【0063】

本発明の製造法において、イソロイシン水酸化反応のpHはpH5~8である事が好ましい。反応液の組成として、酵素反応に必須な因子が存在することが好ましい。因子として $Fe^{2+}$ が必須の場合には、HEPESバッファー、MESバッファー、GTA広域バッファーなど $Fe^{2+}$ とキレートする可能性が少ない反応液組成が望ましいが、 $Fe^{2+}$ の作用が保持されていれば何ら制限を受けない。

【0064】

本発明の製造法において、イソロイシン水酸化反応の温度は、通常には15~30で

50

あり、45 以下である事が好ましい。反応時間は、酵素量により異なるが通常には、5分～200時間である。

水酸化反応に供するイソロイシンとしては、L-イソロイシンを用いることが好ましい。

【0065】

反応を実施する溶媒としては、水、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液等の水性溶媒、ならびに、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などの有機溶媒や、これらを含有了水性溶媒があげられる。また必要に応じて水酸化反応活性化因子を添加しても良い。

【0066】

本発明の製造法において用いられる微生物の細胞破砕液のタンパク質濃度は0.1～50mg/ml、好ましくは0.5～20mg/ml（微生物菌体（湿重量）換算）である。水性媒体に、当該微生物破砕液、基質、補因子を適切な濃度添加し、温度45以下、好ましくは30、pH5～12、好ましくはpH5～7.5の条件下で、5分～120時間反応させ、4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを製造することができる。

【0067】

<II>L-イソロイシンジオキシゲナーゼ及びL-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードするDNA並びにそれらの用途

以下に、[I]L-イソロイシンジオキシゲナーゼ及び[II]本発明のL-イソロイシンジオキシゲナーゼを用いる(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造法について、図面を参照しながら詳細に説明する。

【0068】

[I]L-イソロイシンジオキシゲナーゼ

本発明の発明者らの研究により、Bacillus属の細菌株に、(2S,3R,4S)-4HILの生成能を有するL-イソロイシンジオキシゲナーゼが確認された。微生物細胞由来のL-イソロイシンジオキシゲナーゼを、以下、IDOと略記する。

【0069】

上述のように、本発明の発明者らにより準備された環境微生物のスクリーニングにより、独自の微生物であるBacillus thuringiensis 2-e-2株が、L-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを直接生成する反応を触媒できる活性を有することが明らかになった。本発明の発明者らは、微生物の培養細胞から新規なL-イソロイシンジオキシゲナーゼを精製、単離した。以下、これをIDO(Lys,23)と略記する。

【0070】

さらに、本発明の発明者らは、Bacillus thuringiensis 2-e-2株由来ジオキシゲナーゼを精製することによりIDO(Lys,23)のN-末端アミノ酸配列を決定した。Bacillus thuringiensis 2-e-2株はBacillus thuringiensis AJ110584と命名され、ブタペスト条約に基づいて2006年9月27日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）にFERM BP-10688として寄託されている。

【0071】

さらに、本発明の発明者らは、IDO(Lys,23)のアミノ酸配列から推定される約30塩基対の合成DNA分子を合成し、Bacillus thuringiensis 2-e-2株の染色体DNAを用いて、IDO(Lys,23)をコードする全長DNA、及び、コントロールとしてBacillus thuringiensis (serovar israelensis) 株(ATCC 35646)由来のL-イソロイシンジオキシゲナーゼ（以下、IDO(Lys,32)と略記する）を単離、取得し、組換えプラスミド及びそれらによるE. coliの形質転換細胞を構築した。組換えE. coli IDO活性の、その後の分析により、Bacillus thuringiensis 2-e-2株由来のIDO(Lys,23)遺伝子における独自の変異の結果として、IDO(Lys,23)の活性が、IDO(Lys,32)に比べて極めて高い（5倍高い）ことが判明した。

【0072】

実施例に記載されたように同定された本発明のIDO(Lys,23)をコードするDNAは、配列表

10

20

30

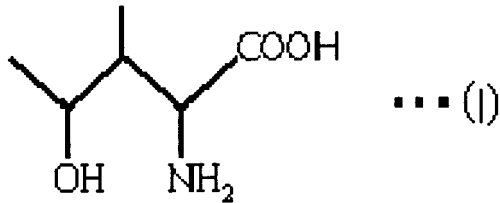
40

50

の配列番号 1 に示される。さらに、配列番号 1 の塩基配列によりコードされる ID0(Lys,23) のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示される。配列番号 2 は、配列番号 1 の塩基配列によりコードされる ID0(Lys,23) のアミノ酸配列である。配列番号 2 の ID0(Lys,23) は L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有し、下記式 (1) に示す (2S,3R,4S)-4HIL を、L-イソロイシン分子から直接合成する反応を触媒する。

【 0 0 7 3 】

【 化 1 】



10

【 0 0 7 4 】

次に、(1)L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする DNA、(2)L-イソロイシンジオキシゲナーゼの性質、及び(3)L-イソロイシンジオキシゲナーゼの製造方法について順に詳細に説明する。

【 0 0 7 5 】

20

( 1 ) L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする DNA

配列番号 1 の塩基配列を有する本発明の ID0(Lys,23) 遺伝子は、実施例に記載するように、*Bacillus thuringiensis* 2-e-2 株の染色体 DNA から単離された。ID0(Lys,23) をコードする *Bacillus thuringiensis* 2-e-2 株由来の配列番号 1 の塩基配列は、*Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis) 株 (ATCC 35646) 由来のゲノム塩基配列の非注釈部分に対して、塩基配列 (図 1 9) 及びアミノ酸配列 (図 1 8) において高い相同性を示した。そのゲノム配列の一つは、2007年1月17日に National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA (Accession No: AAJM00000000.1, GI:74494335) に提出されたものであり、また、別の一つが、VKPM B-197 の受託番号で Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) に保存され、そこから受領した同一 *Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis) 株の、ID0(Lys,32) をコードするゲノム DNA の配列決定の結果として得られたものであった。ID0(Lys,32) をコードする *Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis) 株 VKPM B-197 由来の塩基配列は、配列番号 7 に示される。

30

【 0 0 7 6 】

以下に、ID0 生産細菌から ID0 のアミノ酸配列を得る方法について説明する。

主要タンパク質をゲルから回収し、MS 分析により、*Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis) ATCC 35646 株由来の推定 RBTH\_06809 タンパク質と同定した (図 1 3)。

【 0 0 7 7 】

SDS-PAGE から抽出したタンパク質試料の質量分析を行った。ゲルの処理、トリプシン分解、タンパク質抽出及び、飛行時間マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量分析 (MALDI-TOF) は、Govorun, V.M. et al, (The proteome comparative analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Biochemistry (Mosc)*, 68, 1, 42-49 (2003)) のプロトコルに従って行った。タンパク質は、Mascot software (Matrix Science, USA) の Peptide Fingerprint オプションを用いて、光分解ペプチド質量のセットにより同定された。

40

【 0 0 7 8 】

ID0 をコードする DNA 断片は、*Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis) 株 (ATCC 35646) の配列に基づき設計した適切なプライマーを用いる PCR により得ることができる。

【 0 0 7 9 】

50

PCRに用いる手順は、White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)等の文献に記載されている。染色体を単離する方法、及び、DNA分子をプローブとして遺伝子ライブラリーから目的のDNA分子を単離する方法は、Molecular Cloning, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等の文献に記載されている。

【 0 0 8 0 】

IDOをコードする単離DNAの塩基配列を決定する方法は、A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Inc. (1985)に記載されている。さらに、塩基配列は、Applied Biosystems製のDNAシーケンサーを用いて決定できる。Bacillus thuringiensis 2-e-2株由来のIDO(Lys,23)をコードするDNAは配列番号1に示される。Bacillus thuringiensis (serovar israelensis) 株VKPM B-197由来のIDO(Lys,32)をコードする塩基配列は配列番号7に示される。

10

【 0 0 8 1 】

L-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを生成する反応を触媒するIDOをコードするDNAは配列番号1に示されるDNAに限られない。これは、L-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを生成する反応を触媒するIDOを生産する種や、Bacillus種の株のそれぞれに見られる塩基配列の相違があるはずだからである。

【 0 0 8 2 】

本発明のDNAは、IDOをコードする単離DNAを含むだけでなく、IDO生産微生物の染色体DNAから単離されたIDOをコードするDNAに人工的に変異が加えられたDNAも、前記反応を触媒する活性を有するIDOをコードする限り、本発明のDNAに含まれる。人工的に変異を加える方法には、Method. in Enzymol., 154 (1987)に記載されている部位特異的変異を導入する方法などの通常に用いられる方法が含まれる。

20

【 0 0 8 3 】

配列番号1の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、IDO活性を有するタンパク質をコードするDNAも、本発明のDNAに含まれる。ここで、「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。これらの条件を数値で示すことは難しいが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である37、0.1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、60、0.1×SSC、0.1%SDS、さらに好ましくは、65、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度が挙げられる。プローブの長さは、ハイブリダイゼーションの条件により適宜選択されるが、通常には、100bp~1Kbpである。さらに「L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性」は、L-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを合成する活性であればよい。しかし、配列番号1の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合には、配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質に対して、37、pH8の条件で、10%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上のL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を保持することが好ましい。

30

40

【 0 0 8 4 】

さらに配列番号1のDNAによりコードされるIDOに実質的に同一なタンパク質をコードするDNAも本発明のDNAに含まれる。すなわち、以下のDNAも本発明のDNAに含まれる。

- (a) 配列番号1の塩基配列を含むDNA、
- (b) 配列番号1の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA、
- (c) 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (d) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有す

50

るタンパク質をコードするDNA、及び、

(e)配列番号2のアミノ酸配列に対し少なくとも98%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる群から選ばれるDNA。

【0085】

ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の3D構造又はL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性が実質的に損なわれない範囲であり、具体的には1から78個、好ましくは、1から52個、より好ましくは1から25個、さらに好ましくは1から13個である。

【0086】

上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加は、酵素活性が維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換の例としては、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからAsn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

【0087】

さらに、「L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性」は、上述のようにL-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを合成する活性を意味する。しかし、配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列の場合には、配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質に対して、37、pH6.0の条件で、10%以上、好ましく30%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上のL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を保持することが好ましい。本発明のIDOのL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いるL-イソロイシンからの(2S,3R,4S)-4HIL生成の分析により測定することができる。

【0088】

さらに、配列番号1のホモログDNAも、本発明のL-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子として用いることができる。ホモログDNAがL-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードするか否かは、細胞破砕液、又は、ホモログDNAを過剰発現させた微生物の細胞破砕液のL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を測定することにより確認できる。

【0089】

配列番号1のホモログDNAは、本発明のL-イソロイシンジオキシゲナーゼとして、他のBacillus種、例えば、Bacillus cereus, Bacillus weihenstephanensisのゲノムから調製することもできる。

【0090】

Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, Bacillus weihenstephanensisのアミノ酸配列のアライメントを図20に示す。また、Bacillus属で保存された配列を配列番号6に示す。

【0091】

他の細菌由来のコードするホモログDNAは、Bacillus, Escherichia, Corynebacterium, Arthrobacter, Aspergillus, Pseudomonas, Granulibacter, Methylobacillus, Granulibacter, Acidiphilium, Agrobacterium, Gluconobacter, Caulobacter, Stigmatella, Myxococcus, Polaromonas, Caulobacter, Polaromonas, Sphingomonas, Acidovorax, Mycobacterium, Azotobacter, Vibrio, Polynucleobacter, Streptomycesなどから、下記(表

10

20

30

40

50

1) にリストする遺伝子の相同性に基づきクローニングすることにより得ることができる。ホモログDNAは、例えば、配列番号3及び4に示す合成オリゴヌクレオチドを用いるPCRにより増幅できる。

【0092】

【表1-1】

表1. L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードする推定DNAのリスト

遺伝子	微生物	説明	GenBank Accession No.
RBTH_06809	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis ATCC 35646	仮想タンパク質 RBTH_06809	AAJM01000012.1 GI: 75758796
BC1061	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	仮想タンパク質	NC_004722.1 GI:30019216
-	<i>Bacillus</i> <i>weihenstephanensis</i> KBAB4	保存仮想タンパク質	ZP_01182590.1  GI:89204011
PSPPH_3986	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A	仮想タンパク質	NC_005773.3 GI: 71735316
GbCGDNIH1 2096	<i>Granulibacter bethesdensis</i> CGDNIH1	仮想タンパク質	NC_008343.1 GI: 114328760
Mfla_2629	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	仮想タンパク質	NC_007947.1 GI: 91776977
GbCGDNIH1_ 2096	<i>Granulibacter bethesdensis</i> CGDNIH1	仮想タンパク質	NC_008343.1 GI: 114328760
-	<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	保存仮想タンパク質	ZP_01144511.1 GI:  88939060
-	<i>Agrobacterium vitis</i>	仮想タンパク質	ABG82019.1 GI:110671820
GOX1674	<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	仮想タンパク質	YP:192070.1 GI:58040106
-	<i>Caulobacter</i> sp. K31	保存仮想タンパク質	ZP:01420729.1 GI:113934829
-	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	保存仮想タンパク質	ZP_01462001.1 GI:115374724
MXAN_6813	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	仮想タンパク質	YP:634930. GI:108759113

【0093】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

表 1. (続き)

遺伝子	微生物	説明	GenBank Accession No.
Bpro_0594	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	仮想タンパク質	YP:547452.1 GI:91786500
CC3057	<i>Caulobacter crescentus</i> CB1	仮想タンパク質	NP_421851.1 GI:16127287
-	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	細菌で保存された未 解明タンパク質に類 似	ZP_01022090.1 GI:84714798
-	<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58	推定ファージレプレ ッサー	ZP_01302473 GI:94495894
	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	保存仮想タンパク質	ZP_01384166.1 GI:110595841
	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	保存仮想タンパク質	ZP_01276363.1 GI: 92907583
	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	細菌で保存された未 解明タンパク質に類 似	ZP_00417642.1 GI 67156016
VV21380	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	仮想タンパク質	NP_763273.1 GI 27367746
VVA0217	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	仮想タンパク質	NP_936273.1 GI 37675877
-	<i>Polynucleobacter</i> sp. QLW-P1DMWA-1	保存仮想タンパク質	ZP_01493168.1 GI 116268923
AF484556_24	<i>Streptomyces atroolivaceus</i>	保存仮想タンパク質	AAN85502.1 GI: 26541515

10

20

30

40

## 【 0 0 9 4 】

## ( 2 ) ID0の性質

次に、精製した、*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株由来のL-イソロイシンジオキシゲナーゼ(ID0(Lys,23))の性質について説明する。

## 【 0 0 9 5 】

本発明のID0(Lys,23)は、上述の遺伝子単離及び分析により決定されたように、配列番号2のアミノ酸配列を有する。しかし、本発明は、配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位

50



を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質を含む。

【0096】

すなわち、本発明のIDOは下記のタンパク質を含む。

(f) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(g) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質、及び、

(h) 配列番号2、8、13、17又は21のアミノ酸配列に対し少なくとも70%の相同性を示すアミノ酸配列を有し、L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質

10

【0097】

ここで、「数個」及び「L-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性」の定義は、上記(1)L-イソロイシンジオキシゲナーゼをコードするDNAのセクションで定義したのと同様である。

【0098】

本発明のIDOは、水酸化反応によりL-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを合成する反応を触媒する。

【0099】

本発明のIDOのL-イソロイシンジオキシゲナーゼ活性は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いるL-イソロイシンからの(2S,3R,4S)-4HIL生成の分析により測定することができる。

20

【0100】

本発明のIDOは、水酸化反応によりL-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを合成する反応を触媒する。ジオキシゲナーゼにより触媒される水酸化反応において、分子酸素の一原子がL-イソロイシンに導入され、他の酸素原子が他の酸素受容体例えば $\alpha$ -ケトグルタル酸に導入される。その結果、二酸化炭素が遊離するとともに(2S,3R,4S)-4HIL及びコハク酸が形成される。ジオキシゲナーゼは、脂肪族炭素鎖を立体特異的に水酸化できる。L-イソロイシンを基質とする水酸化反応を触媒できる植物酵素の一例が、フェヌグreek抽出液由来のL-イソロイシンジオキシゲナーゼに関して報告されている(Phytochemistry, Vol. 44, No. 4, pp. 563-566, 1997)。しかし、この方法は、20mM以上のイソロイシン濃度で酵素活性が基質で阻害され、この酵素が同定されていなく、酵素は植物の抽出液から誘導され、たやすく大量に得られなく、かつ、この酵素が安定でないために、4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造法として不十分である。

30

【0101】

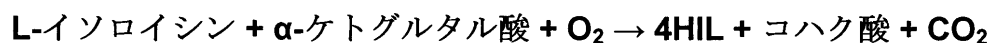
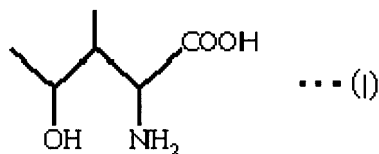
次に、精製IDO(Lys,23)について調べられた酵素的性質について説明する。

IDO(Lys,23)は、下記の反応でL-イソロイシンから下記(I)で表わされる(2S,3R,4S)-4HILを生成する反応を触媒する。

【0102】

【化2】

40



【0103】

ゆえに、本発明のIDO(Lys,23)を用いて、L-イソロイシンから(2S,3R,4S)-4HILを製造す

50

る方法も本願発明に含まれる。

【0104】

さらに、本発明のIDO(Lys,23)の活性は、二価カチオン $Fe^{2+}$ に厳密に依存し、EDTAの存在により完全に阻害される。IDO(Lys,23)は、L-イソロイシンに酸素原子の一つを転移させ、他の酸素原子を、受容分子である  $\alpha$ -ケトグルタル酸に転移させる。従って、IDO(Lys,23)は  $\alpha$ -ケトグルタミン酸依存ジオキシゲナーゼに属する。

【0105】

SDS-PAGEで測定したIDO(Lys,23)のサブユニット分子量は、約 $29 \pm 2.0$  kDaである。従って、本発明は下記の性質で定義されるタンパク質も包含する。

(A)L-イソロイシンの水酸化により(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを生成する反応を触媒する活性を有する。

(B)前記活性が二価カチオン $Fe^{2+}$ に依存する。

(C)SDS-PAGEにより測定した分子量が約 $29 \pm 2.0$  kDaである。

【0106】

*Bacillus thuringiensis* (serovar *israelensis*) 株 VKPM B-197由来のIDO(Lys,32)は、配列番号8のアミノ酸配列を有する。

【0107】

(3)L-イソロイシンジオキシゲナーゼの製造法

次に、本発明のIDOの製造法について説明する。本発明のIDOを製造するには二つの方法がある。これらは、(i)IDO生産微生物を培養し、IDOを生成蓄積させる方法、及び(ii)組換えDNA技術によりIDOを生産する形質転換体を調製し、形質顕待を培養してIDOを蓄積する方法である。

【0108】

(i) 微生物培養によりIDOを生成蓄積する方法

IDO生産微生物を培養することによりIDOを生成蓄積する方法において、IDOの取得源になる微生物の例には、*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*又は*Bacillus*属に属する微生物が含まれる。

【0109】

*Bacillus*, *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Granulibacter*, *Methylobacillus*, *Granulibacter*, *Acidiphilium*, *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Caulobacter*, *Stigmatella*, *Myxococcus*, *Polaromonas*, *Caulobacter*, *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Mycobacterium*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Polynucl eobacter*, *Streptomyces*属に属する微生物が、L-イソロイシンと  $\alpha$ -ケトグルタル酸から(2S,3R,4S)-4HILを合成する反応を触媒するIDOを生成する限り、本発明で使用できる。好ましい微生物は、*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株及び*Bacillus thuringiensis* (serovar *israelensis*; ATCC 35646) 株を含む。これらのうち、*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株が特に好ましい。

【0110】

IDOの取得源としての微生物は、液体培養、固体培養等の任意の形態で培養できるが、工業的に有利な方法は、深部通気攪拌培養である。微生物培養において通常に使用される炭素源、窒素源、無機塩類、及び他の微量栄養素を栄養培地の栄養成分として使用できる。全ての栄養源は、用いる微生物が利用可能である限り使用できる。

【0111】

培養は、振盪培養、深部換気攪拌培養等の好氣的条件で実施する。培養温度は、微生物が生育し、IDOが生産される範囲であればよい。従って、条件は厳密ではないが、培養温度は、通常には、 $10 \sim 50$  °Cであり、好ましくは $15 \sim 42$  °Cである。培養時間は、他の培養条件により変わる。例えば、多量のIDOが生成するまで培養してよく、通常には約5時間から7日であり、好ましくは約 $10 \sim 96$ 時間である。

【0112】

培養後、微生物細胞を遠心( $10,000 \times g$ , 10分)で回収する。IDOの大部分は、細胞内に

10

20

30

40

50

存在するので、微生物細胞を破碎又は溶解することによりIDOを可溶化する。超音波破碎、フレンチプレス破碎又はガラスビーズ破碎を、微生物細胞の破碎に使用できる。細胞を溶解する場合には、卵白リゾチーム、ペプチダーゼ処理やそれらの適切な組み合わせを採用できる。

【0113】

IDO生産微生物由来のIDOを精製する場合、IDOは出発材料の酵素可溶化溶液を用いて精製することもできるが、非破碎又は非溶解残渣が残るときには、可溶化液を再遠心して、残渣を沈殿させることが精製に有利である。

【0114】

通常酵素を精製するために通常に使用される方法の全てをIDOの精製に使用できる。それらの例としては、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーがある。結果として、より高い比活性を有するIDO含有画分が得られる。

【0115】

(ii)組換えDNA技術を用いる製造法

次に、組換えDNA技術を用いるIDOの製造法について説明する。組換えDNA技術を用いて、酵素や生理学的活性物質などの有用なタンパク質を製造する数多くの既知例がある。組換えDNA技術の使用は、天然には痕跡量しか存在しない有用タンパク質の大量生産を可能にする。

【0116】

図11は、本発明のIDOを製造する方法のフローチャートである。

最初に、本発明のIDOをコードするDNAを調製する(ステップS1)。

【0117】

次に、調製したDNAをベクターDNAと連結し、組換えDNAを作成し(ステップS2)、組換えDNAにより細胞を形質転換して形質転換体を作成する(ステップS3)。続いて、形質転換体を培地で培養し、IDOを、培地、細胞、又はその両方に生成、蓄積させる(ステップS4)。

【0118】

その後、方法はステップS5に進み、酵素を回収、精製することにより精製IDOが製造される。

【0119】

目的の(2S,3R,4S)-4HILは、ステップS5で製造された精製IDO又はステップS4でIDOが蓄積した培地、細胞もしくは両方を用いて、水酸化反応で大量に製造できる(ステップS6)。

【0120】

ベクターDNAと連結したDNAは、本発明のIDOを発現させ得る。

ここで、ベクターDNAに連結したIDO遺伝子の例としては、先に[1]に記載したDNAが含まれる。

【0121】

組換えDNA技術を用いる大規模タンパク質製造の場合、細菌細胞、Actinomyces細胞、酵素細胞、真菌細胞、植物細胞、及び動物細胞などの細胞が、形質転換される宿主細胞として使用できる。宿主-ベクター系が開発されている細菌細胞の例には、Escherichia種、Pseudomonas種、Corynebacterium種、Arthrobacter種、Aspergillus種及びBacillus種がある。好ましくは、Escherichia coli又はCorynebacterium glutamicumが使用される。形質転換E. coliを用いるL-イソロイシンジオキシゲナーゼの製造法を以下に説明する。以下のE. coliに関する方法は、Corynebacterium glutamicumやBacillus細菌に適用できる。

【0122】

E. coliによる異種タンパク質生産に通常に使用されるプロモーターをIDOをコードするDNAを発現させるプロモーターとして使用できる。それらの例には、T7プロモーター、trp

10

20

30

40

50

プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター及びPLプロモーターがある。

【0123】

IDOを、融合タンパク質封入体の形態で製造する場合には、他のタンパク質、好ましくは親水性ペプチドをコードする遺伝子をIDO遺伝子上流又は下流に連結し融合タンパク質遺伝子とする。他のタンパク質をコードする遺伝子は、蓄積する融合タンパク質の量を増加させたり、変性及び再生工程後の融合タンパク質の溶解性を増大させたり遺伝子でよい。それらの例としては、T7遺伝子10、 $\lambda$ -ガラクトシダーゼ、デヒドロフォーレートレダクターゼ遺伝子、インターフェロン $\gamma$ 遺伝子、インターロイキン2遺伝子及びプロキモシン遺伝子がある。

【0124】

これらの遺伝子を、IDOをコードする遺伝子と連結するときには、コドン読み取り枠を適合させる。遺伝子は、適切な制限酵素部位で連結してもよいし、適切な配列の合成DNAを用いてもよい。

【0125】

製造量を増加させるために、融合タンパク質遺伝子の下流にターミネーターの形態で転写終結配列を組み合わせることが好ましい。このようなターミネーターの例には、T7ターミネーター、fdファージターミネーター、T4ターミネーター、テトラサイクリン耐性遺伝子ターミネーター及びE. coli trpA遺伝子ターミネーターがある。

【0126】

IDO又はIDOと他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子をE. coliに導入するのに用いるベクターとしてはマルチコピーベクターが好ましい。このようなものの例としては、pUCプラスミド、pBR322プラスミド、それらの誘導体などのCol E1由来複製開始点を有するプラスミドがある。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位により改変を受けたプラスミドを意味する。ここでの改変には、変異原物質やUV照射を用いる変異誘発処理や、自然突然変異、ランダム変異により生じる改変を含む。

【0127】

ベクターは、形質転換体を選択するために、アンピシリン耐性遺伝子などのマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドの例には、市販の強力なプロモーターを有する発現ベクター（例えば、pUC (Takara), pPROK (Clontech)及びpKK233-2 (Clontech)）がある。

【0128】

組換えDNAは、プロモーター、IDO又はIDOと他のタンパク質の融合タンパク質をコードする遺伝子、及び、ターミネーターをこの順に連結したDNAフラグメントをベクターDNAと連結することによって得ることができる。

【0129】

E. coliを組換えDNAで形質転換し、次いで培養する場合、IDO又はIDOと他のタンパク質との融合タンパク質が発現し生成する。異種遺伝子の発現に通常に使用される株を形質転換の宿主として使用でき、E. coli JM109 (DE3)株及びE. coli JM109株が特に好ましい。形質転換方法及び形質転換体を選択する方法は、例えば、Molecular Cloning, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。

【0130】

融合タンパク質の発現の場合、IDOを、IDOに存在しない配列を認識配列とする、血液凝固因子Xaやカリクレインなどの制限的プロテアーゼで切り出してもよい。

【0131】

E. coliの培養に通常に用いられる培地を生産培地に用いることができる。このようなものの例としては、M9-カザミノ酸培地、LB培地がある。さらに、培養及び生産誘導の条件は、用いるベクターのマーカー及びプロモーターの種類、並びに、用いる宿主微生物の種類に応じて適切に選択すればよい。

【0132】

以下の方法は、IDO又はIDOと他のタンパク質との融合タンパク質を回収するために使用

10

20

30

40

50

できる。IDO又はその融合タンパク質が微生物細胞内で可溶の場合には、微生物細胞を回収し、回収した細胞を破碎又は溶解した後の粗酵素溶液の形態で使用できる。さらに、IDO又はその融合タンパク質は、必要に応じて、沈殿、ろ過、カラムクロマトグラフィー、その他の通常の技術により精製した後に使用することもできる。この場合、精製方法は、IDO又はその融合タンパク質に対する抗体を用いるものであってもよい。

【0133】

タンパク質封入体が形成される場合には、変性剤により可溶化する。細菌細胞タンパク質と共に可溶化してもよいが、その後の精製の手順を考慮すると、封入体を取り出し、次いで可溶化することが好ましい。従来技術で既知の方法が細菌細胞から封入体を回収するために使用できる。例えば、封入体を、細菌細胞を破碎し、次いで遠心分離することにより回収できる。タンパク質封入体を可溶化する変性剤の例としては、グアニジン塩酸(例えば 6 M, pH 5-8)及び尿素(例えば 8 M)がある。

10

【0134】

タンパク質封入体は、透析などの処理によりこれらの変性剤を除くことにより活性タンパク質として再生させることができる。Tris-HCl緩衝液やリン酸緩衝液などの透析溶液を透析に使用でき、濃度は、20 mM~0.5 M、pHは、5~8でよい。

【0135】

再生工程におけるタンパク質濃度は、約500 µg/ml以下に保持することが好ましい。再生したIDOが自己架橋するのを防ぐために、透析温度は5以下が好ましい。さらに活性は、上述の透析に加えて、希釈や限外ろ過のような変性剤を除く他の方法によって回復すると予測できる。

20

【0136】

IDO遺伝子が、Bacillus属に属する細菌由来である場合、好ましい態様の一つでは、IDOを、Escherichia, Pseudomonas, Corynebacterium, Arthrobacter, Aspergillus又はBacillus属の細菌を宿主として用いて発現させ生産することができる。

【0137】

遺伝子のコピー数は、遺伝子をマルチコピーベクターに挿入し、ベクターを微生物に導入することによって増加させることができる。使用できるベクターには、pMW118, pBR322, pUC19, pBluescript KS+, pACYC177, pACYC184, pAYC32, pMW119, pET22bなどのE. coliプラスミド、pHY300PLK, pGK12, pLF14, pLF22などのE. coli-B. subtilisシャトルベクター、I1059, IBF101, M13mp9, Mu phage (特開平2-109985)などのファージベクター、及び、Mu, Tn10, Tn5などのトランスポゾン(Berg, D.E. and Berg, C.M., Bio/Technol., 1, 417 (1983))がある。また、プラスミドを用いる相同組換えにより遺伝子を染色体に組み込むことにより遺伝子のコピー数を増加させることができる。この場合の宿主細胞及び発現系の例には、Shaw P. C. et al. (J Gen Microbiol. 134 (1988) p.903-911)によるArthrobacter nicotinovoransでの組換え発現法の報告、Morikawa, M. et al. (Appl Microbiol Biotechnol., 42 (1994), p.300-303)によるArthrobacter sp.での組換え発現法の報告がある。また、コリネ型細菌のために開発された発現系がArthrobacter種にも使用できるといくつかの報告がある(Sandu C. et al.)。しかし、宿主細胞として使用されるBacillus種細菌及びBacillus IDO用に使用される発現系はこれらのものに限定されない。

30

40

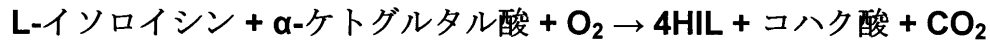
【0138】

[II] (2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの製造法

本発明の、一般式(I)で表わされる(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン ((2S,3R,4S)-4HIL)の製造法は、下記の反応で示される、(2S,3R,4S)-4HILを生成するL-イソロイシンの直接的酵素水酸化の一工程反応を含む。

【0139】

## 【化3】



## 【0140】

上記反応は、酸素原子の一つの受容分子としてL-イソロイシン、他の酸素原子の受容分子として $\alpha$ -ケトグルタル酸、二つの酸素原子の供与体として一つの酸素分子、及び、反応を触媒するIDOの存在下で行われる。

## 【0141】

本発明において、「酵素水酸化」は、IDO酵素により行われる水酸化反応を意味する。特に細菌IDOが好ましい。 10

## 【0142】

反応を触媒するIDOは特に限定されず、 $\alpha$ -ケトグルタル酸及び酸素の存在下でL-イソロイシンの水酸化反応を触媒できるタンパク質である限り、使用可能である。

## 【0143】

このようなIDOの好ましい例は、IDOについて記載したセクション[1]で説明したIDOである。本発明の方法において、上述の(2S,3R,4S)-4HILを生産する反応を触媒する上記IDOを含む限り、細菌(培養物、培養細胞、処理細胞を含む)、精製酵素、粗酵素などの任意の形態でIDOを使用できる。IDOの源として細菌を用いる場合、(1) Bacillus属に属する微生物などの天然にIDOを産生する細菌、及び(2)セクション[1]に記載したような組換えDNAで形質転換した組換え微生物の両方を、該微生物を培養することによりIDOを蓄積させるために使用できる。 20

## 【0144】

IDOの性質決定に用いたタンパク質配列は、L-イソロイシンジオキシゲナーゼに分類される(配列番号2、配列番号8、表1)。

## 【0145】

本発明のL-イソロイシンジオキシゲナーゼは、下記の性質により定義されるタンパク質も含む。

(A)L-イソロイシンの水酸化により(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンを生成する反応を触媒する活性を有する。 30

(B)前記活性が二価カチオン $\text{Fe}^{2+}$ に依存する。

(C)SDS-PAGEにより測定した分子量が約 $29 \pm 2.0$  kDaである。

## 【0146】

例えば、IDOを生産する細菌又は組換えDNAにより形質転換された細菌細胞を用いる(2S,3R,4S)-4HILの製造工程において、培養中に、直接、基質を培養培地に加えてもよいし、培養物から分離した菌体又は洗浄菌体の形態で用いてもよい。さらに、破碎又は溶解した菌体処理物を、直接に用いてもよいし、菌体処理物からIDOを回収して、粗酵素溶液として用いてもよいし、酵素を精製した後に用いてもよい。すなわち、IDOを有する画分の形態である限り、本発明の(2S,3R,4S)-4HILの製造法に用いることができる。 40

## 【0147】

IDOを用いる水酸化反応を実施するために、L-イソロイシン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、反応を触媒するタンパク質又はIDO含有組成物を含む反応液を20~50℃の適切な温度に調整し、pHを5~12に維持して、30分から5日、静置、振盪又は攪拌する。

## 【0148】

反応速度を、 $\text{Fe}^{2+}$ などの二価カチオンを反応液に加えることで改善することもできる。これらの二価カチオンを反応液に加えた場合、反応を妨げない限り、塩も使用できる。好ましくは、 $\text{FeSO}_4$ などが使用できる。これらの二価カチオンの濃度は、当業者が行う単純な予備試験で決めることができる。これらの二価カチオンは、0.01 mM ~ 50 mM、好ましくは0.1 mM ~ 25 mMの範囲で加えることができる。

## 【0149】

培養中、培養容量の規則的な攪拌の結果として、酸素は、空気から反応に供給される。

【0150】

反応液で生成した一般式(1)の(2S,3R,4S)-4HILは、既知の技術により分離又は精製でき、あるいは、IDOを発現する組換え微生物を用いて反応を行う場合には特に、そのまま使用してもよい。

【0151】

分離及び精製法の例としては、(2S,3R,4S)-4HILをイオン交換樹脂に接触させ、塩基性アミノ酸を吸着させ、次いで溶出及び結晶化する方法、及び、溶出により得られる産物を脱色し、活性炭でろ過し、結晶化して、(2S,3R,4S)-4HILを得る方法がある。

【0152】

他の微生物に由来する非解明遺伝子を、既知のIDO遺伝子との相同性に基づき同定し、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を評価することにより同定できる。

【0153】

二つのアミノ酸配列の間の相同性は、周知の方法、例えば、スコア、同一性及び類似性の3つのパラメーターを計算するコンピュータプログラムBLAST 2.0を用いて決定できる。

【0154】

従って、*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株及び*Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis; ATCC 35646)株由来の、全長IDOをコードするDNA断片を、既知断片のアミノ酸及び塩基配列に基づき調製したプライマーを用いるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応、White, T. J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)により得ることができる。他の微生物由来のIDOをコードするDNA断片を同様にして得ることができる。

【0155】

細菌株間でDNA配列に相違があり得るため、使用される、上述のIDOをコードする断片は、配列番号1、7、12、16、20、図18又は表1に示される塩基配列に限定されず、配列番号1、7、12、16、20、図18又は表1に示した塩基配列に類似した塩基配列も含まれる。従って、上記の遺伝子によりコードされるタンパク質変異体は、配列番号2、8、13、17、21、図18又は表1に示されるアミノ酸配列に対し、タンパク質の、前記反応を触媒する能力が維持される限り、80%以上、好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の類似性を有し得る。

【0156】

さらに、上記DNA断片は、配列番号1、7、12、16、20、図18又は表1に示した塩基配列に塩基配列又はこれらの塩基配列に基づき調製されたプローブにストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る変異体により示され得る。ここで、「ストリンジェントな条件」は、[1](1)IDOをコードするDNAのセクションに記載したのと同様である。

【0157】

本発明で使用される菌体処理物の形態としては、乾燥菌体、凍結乾燥菌体、界面活性剤又は有機溶剤処理物、酵素処理物、超音波処理物、機械的摩砕物、溶媒処理物、菌体のタンパク質分画、菌体の固定化物、菌体加工物があげられる。

【0158】

IDOは、上述のように分離して調製し、反応液に添加してもよい。IDOをコードするDNAを発現する細菌(宿主細胞)は、それらの活性を有する宿主細胞で発現できる形態でIDOをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターのトランスフェクションにより調製できる。さらに、IDOをコードする遺伝子の発現を増加することによりIDOの活性が増大した宿主細胞が好ましくは用いられる。

【0159】

「遺伝子の発現を増加する」という語句は、遺伝子の発現が非改変菌株、例えば野生型菌株より高いことを意味する。そのような改変の例は、細胞1個当たりの発現された遺伝子のコピー数を増加させること、遺伝子の発現レベルを増加させることなどを含む。発現された遺伝子のコピー数の量は、例えば、染色体のDNAの制限後、遺伝子配列に基づいた

10

20

30

40

50

プローブを用いたサザンブロッティング、蛍光in situハイブリッド法 (FISH) 等で測定する。遺伝子発現のレベルは、ノーザンブロッティング、定量的RT-PCRなどを含む様々な既知の方法で測定することができる。遺伝子によってコードされたタンパク質の量は、SD S-PAGE後イムノブロッティング法検定(ウェスタンブロッティング分析)等を含む既知の方法で測定することができる。

**【 0 1 6 0 】**

「タンパク質をコードするDNAによる細菌の形質転換」とは、細菌にDNAを例えば、従来  
の方法で導入することを意味する。このDNAの形質転換は、本発明のタンパク質をコード  
する遺伝子の発現の増加をもたらす、細菌の細胞中のタンパク質の活性を増強すること  
になる。形質転換の方法は、従来報告されたすべての既知の方法を含む。例えば、細胞のDN  
Aに対する浸透性を増加させるために塩化カルシウムで受容体細胞を処理する方法がエシ  
ェリヒア・コリK-12株について報告されており、使用できる。(Mandel, M. and Higa, A.  
, J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)).

10

**【 0 1 6 1 】**

遺伝子発現を増強する方法は遺伝子コピー数を増加させることを含む。本発明の細菌中  
で機能できるベクターへ遺伝子を導入すれば、遺伝子のコピー数が増加する。そのような  
目的のために、好ましくは多コピーベクターが使用できる。多コピーベクターは、pBR322  
、pMW119、pUC19、pET22b等が例示される。

**【 0 1 6 2 】**

遺伝子発現の増強は、例えば相同的組み換え、または、Mu組込みなどにより細菌の染色  
体へ、遺伝子の多数のコピーを導入することでも達成できる。例えば、Mu組込み1回の実  
行で、細菌の染色体中に遺伝子のコピーが3個まで導入できる。

20

**【 0 1 6 3 】**

遺伝子のコピー数を増加させることは、細菌の染色体のDNAへ遺伝子の多数のコピーを  
導入することによっても達成できる。細菌の染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入するた  
めには、多数のコピーが存在する配列を染色体のDNA中の標的として使用して、相同的組  
み換えを実行する。染色体のDNAに多数のコピーを持つ配列は、反復DNAまたは転位因子の  
末端にある逆方向反復を含むが、これらに制限されない。さらに、米国特許番号5,595,88  
9に開示のように、トランスポゾンに遺伝子を組み入れて、それを染色体のDNAへ遺伝子の  
多数のコピーを導入するよう転移させることも可能である。

30

**【 0 1 6 4 】**

遺伝子発現を増強することは、本発明のDNAを強力なプロモーターの制御下におくこと  
によっても達成できる。例えば、 $P_{tac}$  プロモーター、*lac*プロモーター、*trp*プロモーター、*trc*  
プロモーター、ファージの $P_R$ または $P_L$ プロモーターはすべて有効なプロモーター  
であることが知られている。強力なプロモーターは遺伝子コピーの増加と組み合わせて  
使用できる。

**【 0 1 6 5 】**

あるいは、プロモーターの効果は、例えば、プロモーターの下流に位置する遺伝子の転  
写レベルを増加するよう、プロモーターに変異を導入して増強できる。更に、リボソーム  
結合部位(RBS)と開始コドン間のスペーサ中のいくつかのヌクレオチド、特に開始コドン  
のすぐ上流配列の置換がmRNA翻訳能力に深く影響することが知られている。例えば、開始  
コドンに先行する3箇のヌクレオチドの性質によって発現レベルに20倍の範囲があること  
が見出されている(Gold ら, Annu. Rev. Microbiol., 35, 365-403, 1981; Hui ら., EMB  
O J., 3, 623-629, 1984)。以前に、*rhtA23*変異は、ATG開始コドンに対して - 1 の位置でG  
をAに置換することであると報告されている(1997 Annual Meeting of the American Soci  
ety for Biochemistry and Molecular Biologyと共催の第17回 International Congress  
of Biochemistry and Molecular Biology San Francisco, California August 24-29, 19  
97, 抄録番号 457)。

40

**【 0 1 6 6 】**

さらに、細菌の染色体上の遺伝子のプロモーター領域にヌクレオチド置換を導入するこ

50



とも可能であって、これによりプロモーター機能がより強められる。発現制御配列の変更は、例えば、国際公開WO 00/18935 および特開平1-215280号に開示されているように温度敏感なプラスミドを使用して行う遺伝子置換と同様に実行可能である。

【0167】

プラスミドDNAの調製方法は、DNAの消化と連結、形質転換、プライマーとしてオリゴヌクレオチドの選択など、または、当業者に既知の他の方法を含むが、これらに限定されない。これらの方法は、例えばSambrook, J., Fritsch, E..F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Third Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。

【実施例1】

【0168】

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明する。なお本発明は、この実施例により何ら限定されない。

【0169】

[実施例1] L-Ile水酸化酵素を有する株のスクリーニング

<1> 4-ヒドロキシイソロイシン生産株のスクリーニングとプロスの解析

L-イソロイシンを基質に、4-ヒドロキシイソロイシン生成能を有する微生物のスクリーニングを実施した。可溶性澱粉0.4% (w/v)、酵母エキス0.4%、麦芽エキス1%、L-イソロイシン0.2%を水に溶解後、pH7~7.5に調整した培地に土壌菌を植菌した。28℃で2日間、振とう培養した後、遠心上清のアミノ酸分析により、4-ヒドロキシイソロイシンの分析を行った。

【0170】

アミノ酸分析条件

4-ヒドロキシイソロイシンの検出はウォーターズ AccQ・Tag™メソッドを用いた。定法に従って適切な濃度に希釈した反応液5µl中のアミノ酸を誘導体化し、HPLCにて分析することで4-ヒドロキシイソロイシン生成量を測定した。その結果、菌株の一つ(2-e-2株)に4-ヒドロキシイソロイシンと同じリテンションタイムの物質を生成する活性が見出された。16SrDNAの解析から、2-e-2株は*Bacillus thuringiensis*と同定された。そこで、他のバチルス属に関するスクリーニングしたところ、*Bacillus licheniformis* (AKU223株、IAM11054株)、*Bacillus sphaericus* (AKU227株、NBRC3526株)、*Bacillus thuringiensis* (AKU238株、NBRC3958株)にも同様の活性が見出された。

【0171】

生成物の同定

上記スクリーニングで取得されたバチルス属菌株がL-イソロイシンを基質に生成する物質の同定を実施した。まず、生成物の分子量をMSにより分析したところ、145であり、4-ヒドロキシイソロイシンよりも、2小さい値であった。また高分解能質量分析装置(Q-ToFMS)による精密質量測定で組成式を推定したところ、 $C_6H_{11}NO_3$ で4-ヒドロキシイソロイシンよりも水素原子が2少ないことが判明した。以上の結果より、上記バチルス属菌株で生成されている物質は、2-アミノ-3-ケト-4-メチルペンタン酸(AMKP)の可能性が示唆された。バチルス属細菌によるAMKP生産の報告[非特許文献5]に記載の実験方法に従ってAMKPを合成・精製し、また、上記バチルス菌培養培地中より生成物を非特許文献5のAMKP精製法に従って精製し、NMR分析を実施したところ、両者は同じケミカルシフトを示した。

【0172】

以上より、今回見出されたバチルス菌はAMKPを産生している事が明らかとなった。なお、2-e-2株によるAMKP産生量は1~2mM程度である。一方、非特許文献5に記載のバチルス菌のAMKP産生推定量は0.04mMと記載されており、2-e-2株のAMKP高生産活性が確認された。

【0173】

<2> AMKPとHILの分離分析法確立

2-e-2株等のバチルス菌にAMKP生産活性が見出されたため、AMKPと4-ヒドロキシイソロイシンの分離分析法を確立する必要があることが判明した。そこで鋭意検討の結果、ウォーターズ AccQ・Tag™メソッドを改変することでAMKPと4-ヒドロキシイソロイシンの分離分析法を確立した。具体的条件として、カラムをXBridge C18 5mm, 2.1 x 150mm (Waters)に、溶離液BをMeOH、溶離液流速を0.3ml/minに変更した。溶離液の勾配は下表に示す。

【0174】

【表2】

表2 HILとAMKP同時分析法の溶離液条件

Time (min)	Flow (ml/min)	Accq Tag Eluent A	100% MeOH	H <sub>2</sub> O	Curve
		%A	%B	%C	
-	0.3	80	20	0	-
15	0.3	60	40	0	6
15.1	0.3	0	60	40	11
18.0	0.3	80	20	0	11

10

【0175】

上記条件で、培地中AMKPは11.0minあたりに、4-ヒドロキシイソロイシンは11.9minあたりに溶出され、分離可能となった。

【0176】

<3> 培養時の補因子添加によるAMKPの生成量変化

AMKP生成活性の機構として、水酸化による分子状酸素の取り込みの可能性を考えた。そこで2-e-2株培養時に、モノオキシゲナーゼの補因子NAD(P)Hを、あるいはジオキシゲナーゼの補因子Fe<sup>2+</sup>、2-オキソグルタル酸、アスコルビン酸を添加した場合のAMKP生成活性を解析した。

【0177】

先のスクリーニングに用いた培地での培養をコントロールとし、10mM NADP、10mM NADPHを添加した群、Fe<sup>2+</sup>を添加した群、並びに、Fe<sup>2+</sup>、2-オキソグルタル酸及びアスコルビン酸を添加した群でAMKP生産活性を比較した。培養温度は30℃で、培養時間は22時間とした。培養上清のAMKP濃度を測定した。結果を表3に示す。

【0178】

【表3】

表3 2-e-2株培養時のAMKP生成活性に対する補因子添加効果

	AMKP濃度(mM)
コントロール	1.34
NAD(P)H	1.58
Fe <sup>2+</sup>	2.53
Fe <sup>2+</sup> 、2-オキソグルタル酸、アスコルビン酸	3.06

40

【0179】

AMKP生成にはその生成過程にジオキシゲナーゼが関与している可能性が示唆された。

【0180】

<4> 2-e-2株プロスの経時的変化

50

AMKP生産培地（可溶性澱粉 0.4% (w/v)、酵母エキス 0.4%、麦芽エキス 1%、L-イソロイシン 0.2%、グルコース 0.5%、アスコルビン酸 1mM、2-オキソグルタル酸 1mM、CaCl<sub>2</sub> 1mM、MgSO<sub>4</sub> 1mM、pH 7~7.5）を3Lの坂口フラスコに張り込み、2-e-2株を23℃にて振とう培養した。培養開始後、0、6、8、10、12、14、16、18、20時間後に培養液をサンプリングし、培養液の4-ヒドロキシイソロイシンとAMKPを上記<2>記載の方法にて定量した。また濁度(OD<sub>660</sub>)を測定した。

【0181】

図1に4-ヒドロキシイソロイシン(HIL)とAMKPの濃度を、図2に培養液の濁度を示す。4-ヒドロキシイソロイシンとAMKPの総和は対数増殖期に増加し、その後はプラトーに達した。また、プラトーに達した後、4-ヒドロキシイソロイシンは斬減し、AMKPは斬増した。

10

【0182】

上記の各培養時間での培養液200μlから2-e-2株菌体を取得し、生理食塩水で洗浄した後、100μlのジオキシゲナーゼ反応液（10mM Ile、1mM Fe<sup>2+</sup>、10mM 2-オキソグルタル酸、10mM アスコルビン酸、50mM リン酸カリウムバッファー(pH7.0)）に懸濁させ、30℃、1時間振とうさせながら反応し、その上清中の4-ヒドロキシイソロイシンとAMKP生成量を測定した。その結果、図3に示すとおり微量であるが対数増殖期の細胞を用いた場合のみ、4-ヒドロキシイソロイシンとAMKPの生成が確認できた。

【0183】

<5> 2-e-2株細胞破砕液によるHIL生成

20

AMKP生産培地にてOD<sub>660</sub>=3.2まで培養後、集菌洗浄した2-e-2株菌体を乳鉢で破砕した後、懸濁用緩衝液（50mM HEPES pH7.0、10% グリセロール、complete mini (Roche)）で懸濁し、タンパク質濃度が10mg/ml程度の懸濁液（破砕液）、並びに懸濁液の遠心沈殿物を得た。遠心沈殿物は最終的に破砕液と同じ容量の生理食塩水で懸濁した。これらを等量の2×ジオキシゲナーゼ反応液（10mM Ile、2mM Fe<sup>2+</sup>、10mM 2-オキソグルタル酸、10mM アスコルビン酸、100mM HEPES(pH7.0)）と混合し、30℃で1時間反応させた。同様に、破砕液調製に使用した休止菌体を洗浄後、培養ブ罗斯の10倍濃度に生理食塩水で懸濁し、等量の2×ジオキシゲナーゼ反応液と混合し反応させた。各サンプルのAMKPと4-ヒドロキシイソロイシン生成量を図4に示す。

【0184】

破砕液を用いる事でIleを基質にした4-ヒドロキシイソロイシンの生成活性が明確に確認できた。

30

【0185】

<6> 2-e-2株細胞破砕液酵素の補因子の影響

対数増殖期の2-e-2株細胞破砕液を用いて、Ileの水酸化による4-ヒドロキシイソロイシン生成反応時の補因子の影響を検討した。上記<5>記載の方法にて調製した対数増殖期2-e-2株細胞破砕液(lysate)を最終濃度が5mM Ileと5mM 各種補因子を含有した50mM HEPES (pH7)反応液にて反応させ、4-ヒドロキシイソロイシン生成量を測定した。表4に示すとおり、4-ヒドロキシイソロイシン生成にFe<sup>2+</sup>(Fe)と2-オキソグルタル酸(a-KG)が必須であり、更にアスコルビン酸(Asc.)を添加することで4-ヒドロキシイソロイシン生成量は最大となった。よってイソロイシン水酸化による4-ヒドロキシイソロイシン生成にはジオキシゲナーゼが関与している可能性が強く示唆された。

40

【0186】

## 【表4】

表4 2-e-2株破砕液による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性における各種補因子の影響

反応混合物	HIL 生成
lysate (-)	0.00
lysate + Ile	0.00
lysate + Ile + Fe	0.00
lysate + Ile + Asc.	0.00
lysate + Ile + a-KG	0.00
lysate + Ile + Fe + Asc	0.00
lysate + Ile + Fe + a-KG	0.39
lysate + Ile + Asc. + a-KG	0.00
lysate + Ile + Fe + Asc. + a-KG	0.85

10

20

## 【0187】

<7> 2-e-2株破砕液生成物の立体配置

4-ヒドロキシイソロイシンには3カ所の不斉炭素があり、8種類のジアステレオマー、4対のエナンチオマーが存在する。具体的にはエナンチオマーは(2S,3S,4S)と(2R,3R,4R) {以降HIL1とも記載する}、(2S,3S,4R)と(2R,3R,4S) {以降HIL2とも記載する}、(2S,3R,4R)と(2R,3S,4S) {以降HIL3とも記載する}、(2S,3R,4S)と(2R,3S,4R) {以降HIL4とも記載する}の4対であり、Fenugreekなどに存在する天然型HILは(2S,3R,4S)である。本発明において、基質は(2S,3S)イソロイシンを使用しているため、水酸化反応で生成する4-ヒドロキシイソロイシンは(2S,3R,4S)あるいは、(2S,3R,4R)のいずれかとなる。そこで、2-e-2株にて生成する4-ヒドロキシイソロイシンの立体配置を決定することとした。

30

## 【0188】

各種エナンチオマー対として、(2R,3R,4R) : HIL1と(2S,3R,4R) : HIL3をTetrahedron 47 (32), 6469-6482, (1991)に従って、(2R,3R,4S) : HIL2と(2S,3R,4S) : HIL4をEur. J. Org. Chem. 834-839, (2002)に従って取得した。化学合成法にて取得したHIL1~4を、上記<2>の4-ヒドロキシイソロイシン、ANKP同時分析条件で分析したところ、リテンションタイムは表5の通りであった。

## 【0189】

## 【表5】

表5 各4-ヒドロキシイソロイシンのジアステレオマー体のリテンションタイム

	リテンションタイム (min)
HIL1	7.25
HIL2	14.28
HIL3	11.10
HIL4	11.98

10

## 【0190】

上記<6>にて調製した4-ヒドロキシイソロイシン含有サンプルを分析したところ、リテンションタイムは11.99minであり、HIL4のスタンダードの4-ヒドロキシイソロイシンと混合して分析したところ、ピークは完全に一致した。よって、(2S,3S)イソロイシンを基質とした場合、生成する可能性のあるHIL3、HIL4のうち、本酵素により生成する4-ヒドロキシイソロイシンはHIL4となり、天然型4-ヒドロキシイソロイシンであることが示された。

20

## 【0191】

## &lt;8&gt;2-e-2株破碎液酵素の至適pH

上記<5>に記載の方法に従って、 $OD_{660}=7$ の2-e-2株菌体より調製した細胞破碎液を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成活性のpH依存性を評価した。ジオキシゲナーゼ反応液組成は5mM Ile、5mM  $Fe^{2+}$ 、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、100mM GTAであり、反応後に反応液のpHを測定した。反応温度は30とした。生成した4-ヒドロキシイソロイシンは<2>の方法で分析した。最大生成量を示したpHのHIL量を100%とし、それに対する相対活性比率で各pHの反応性を図5に示す。pHがpH5~8において活性が確認できた。

30

## 【0192】

## &lt;9&gt;2-e-2株破碎液酵素の至適温度

上記<5>に記載の方法に従って、 $OD_{660}=7$ の2-e-2株菌体より調製した細胞破碎液を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度依存性を評価した。ジオキシゲナーゼ反応液組成は5mM Ile、5mM  $Fe^{2+}$ 、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、100mM GTA (pH6)で反応温度は15~50とした。生成した4-ヒドロキシイソロイシンは<2>の方法で分析した。最大生成量を示したpHの4-ヒドロキシイソロイシン量を100%とし、それに対する相対活性比率で各温度の反応性を図6に示す。至適温度は45以下であった。

## 【0193】

## &lt;10&gt;2-e-2株破碎液酵素の温度安定性

上記<5>に記載の方法に従って、 $OD_{660}=7$ の2-e-2株菌体より調製した細胞破碎液を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度安定性を評価した。破碎液を0~50で1hrインキュベーションした後、Ile水酸化活性を測定した。基質反応液組成は5mM Ile、5mM  $Fe^{2+}$ 、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、100mM HEPES (pH7)で反応温度は30とした。生成した4-ヒドロキシイソロイシンは実施例2の方法で分析した。最大生成量を示した温度の4-ヒドロキシイソロイシン量を100%とし、それに対する相対活性比率で各温度の温度安定性を図7に示す。50以上で酵素は失活した。

40

## 【0194】

## &lt;11&gt;2-e-2株破碎液酵素の基質反応特性

上記<5>に記載の方法に従って、 $OD_{660}=7$ の2-e-2株菌体より調製した細胞破碎液を用

50

いて、各種アミノ酸に対する反応特性を評価した。破碎液と基質溶液と混合後、30、1時間反応させ、TLCやアミノ酸分析によって新たな物質の生成を評価した。基質反応液組成は5 mM アミノ酸、5 mM Fe<sup>2+</sup>、5 mM 2 - オキソグルタル酸、5 mM アスコルビン酸、100 mM HEPES (pH7)で、アミノ酸としてL-イソロイシンに加えてL-ロイシン、L-バリン、L-グルタミン酸、L-リジンに個別に評価した。生成した4 - ヒドロキシイソロイシンは実施例1の方法で分析した。結果を表6に示す。L-イソロイシン以外のアミノ酸に対しては、新たな物質の生成は確認できなかった。よって、本酵素はイソロイシン特異的なジオキシゲナーゼであると示唆された。

【0195】

【表6】

10

表6 各アミノ酸に対する反応性

	生成物
L-イソロイシン	あり (HIL)
L-ロイシン	なし
L-バリン	なし
L-グルタミン酸	なし
L-リジン	なし

20

【0196】

< 12 > 2-e-2株破碎液酵素の阻害剤の影響

上記< 5 >に記載の方法に従って、OD<sub>660</sub>=7の2-e-2株菌体より調製した細胞破碎液を用いて、4 - ヒドロキシイソロイシン生成活性に対する阻害剤の影響を検討した。上記< 5 >に記載の方法に従って、OD<sub>660</sub>=7の2-e-2株菌体より調製した細胞破碎液を用いた。ジオキシゲナーゼ反応液組成は5 mM Ile、5 mM Fe<sup>2+</sup>、5 mM 2 - オキソグルタル酸、5 mM アスコルビン酸、100 mM HEPES (pH6)で反応温度は30、反応時間は1時間とした。反応時に、10 mMの阻害剤 (EDTA, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) を個別に添加した場合の4 - ヒドロキシイソロイシン生成量を測定した。4 - ヒドロキシイソロイシンは上記< 2 >の方法で分析した。イソロイシン水酸化活性は阻害剤により活性が消失した。

30

【0197】

【実施例2】 L-Ile水酸化酵素の単離と精製

(1) 無細胞抽出液の調製

2-e-2を合計2LのAMKP生産培地にてOD<sub>660</sub>=6.0まで培養後、生理食塩水で菌体を洗浄した。菌体は細胞膜処理液 (10 mg/ml Lysing enzyme (SIGMA), 5 mg/ml Cellulase "ONOZUKA" R-10 (Yakult), Yatalase (Takara Bio), 1 mg/ml Lysozyme (SIGMA) を0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 M KCl (pH5.5) に溶解) に懸濁後、30、1 hr インキュベーションした。インキュベーションした菌体を生理食塩水で洗浄した後、緩衝液A (50 mM HEPES pH7.0, 10% グリセロール, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, complete (Roche)) に懸濁し、氷冷下、超音波破碎機 (Branson) にて菌体を破碎した。この処理液を4、18、500 × g、60分間遠心分離し、上清を取得した。これ以降の単離・精製操作は全て4、あるいは氷冷下にて実施した。

40

【0198】

(2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

前工程で得た上清を0.45 μmのフィルターで濾過した後、予め緩衝液Aで平衡化しておいたDEAE (16 mm × 100 mm : GEヘルスケアバイオサイエンス) に供した。カラムを緩衝液Aで洗浄後、緩衝液B (50 mM HEPES pH7.0, 10% グリセロール, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, complete (Roche)) にて食塩の直線濃度勾配を用いて溶出した

50

。

## 【 0 1 9 9 】

## ( 3 ) 活性画分の検出

各フラクションはIle水酸化活性反応液（最終濃度が100 mM Hepes (pH6.0), 5 mM L-Ile, 5 mM Fe<sup>2+</sup>, 5 mM 2 - オキソグルタル酸, 5 mM アスコルビン酸）を用いて30、30分間反応させた。100にて酵素失活した後、先述のAMKP, HIL分離測定法にて4 - ヒドロキシイソロイシン量を定量した。これ以降の分析の4 - ヒドロキシイソロイシンとは天然型4 - ヒドロキシイソロイシンと同じリテンションタイムを有する異性体のみを示す。なお、1分間当たり1 nmolのHILを生成する酵素活性を1Uとした。

## 【 0 2 0 0 】

## ( 4 ) 陽イオン交換クロマトグラフィー

前工程で得た活性画分をdesalting column (GEヘルスケアバイオサイエンス)にて緩衝液C (50 mM MES pH5.2、10% グリセロール、2 mM DTT, 1 mM EDTA, complete (Roche))に置換した。本置換液を、予め緩衝液Cで平衡化しておいたmonoS (10 mm x 100 mm : GEヘルスケアバイオサイエンス)に供した。カラムを緩衝液Cで洗浄後、緩衝液D (50 mM MES pH5.2、10% グリセロール、2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, complete (Roche))にて食塩の直線濃度勾配を用いて溶出し、各フラクションのIle水酸化活性を測定した。

## 【 0 2 0 1 】

## ( 5 ) 硫酸アンモニウム沈殿

前工程で得た可溶性画分に2 M硫酸アンモニウムを添加溶解した。十分に攪拌した後、遠心分離にて可溶性画分と沈殿画分に分離し、沈殿画分は緩衝液Aにて溶解した。各画分のIle水酸化活性を測定したところ、沈殿画分に活性が検出された。

## 【 0 2 0 2 】

## ( 6 ) サイズ排除クロマトグラフィー

前工程で得た活性画分を、予め緩衝液Aで平衡化しておいたSuperdex 75 (10 mm x 300 mm : GEヘルスケアバイオサイエンス)に供した。緩衝液Aにて溶出し、各画分のIle水酸化活性を測定した。

## 【 0 2 0 3 】

## ( 7 ) 疎水性相互作用クロマトグラフィー

前工程で得た活性画分を緩衝液E (50 mM MES pH6.5、10% グリセロール、2mM DTT, 1mM EDTA, 1 M 硫酸アンモニウム, complete (Roche))に置換した。緩衝液置換サンプルは、予め緩衝液Eで平衡化しておいたResource PHE (1ml : GEヘルスケアバイオサイエンス)に供した。カラムを緩衝液Eで洗浄後、Ile水酸化活性酵素を含む画分を緩衝液F (50 mM MES pH6.5、10% グリセロール、2 mM DTT, 1 mM EDTA, complete (Roche))を用いて硫酸アンモニウムの逆直線濃度勾配を用いて溶出した。

## 【 0 2 0 4 】

L-Ile水酸化酵素の単離、精製の概要を表7にまとめた。

## 【 0 2 0 5 】

10

20

30

## 【表 7】

表 7 単離・精製のまとめ

分画	総タンパク質量 (mg)	比活性 (U/mg)	総活性 (U)	回収率 (%)
無細胞抽出液	678.173	3.8	2593.7	100.0
DEAE	73.324	17.8	1306.5	50.4
monoS	3.639	96.5	351.0	13.5
硫安沈殿	0.578	209.5	121.1	4.7
GPC	0.093	1222.8	113.4	4.4
Resource PHE	0.004	3694.9	13.2	0.5

10

## 【 0 2 0 6 】

[ 実施例 3 ] l-Ile水酸化酵素の性質決定

## &lt; 1 &gt; 電気泳動による分析

実施例 2 で得られた精製標品を、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド電気泳動法 (第一化学薬品製ポリアクリルアミドゲルPAGミニ「第一」15/25 (13well)、及びバイオラッド社製分子量スタンダード Prestained SDS-PAGE standards, Low Range) によって分析した。その結果、本酵素は分子量約 31,000 ± 20,000 のほぼ均一なサブユニットからなることが明らかとなった。

20

## 【 0 2 0 7 】

## &lt; 2 &gt; 補因子の添加効果

精製酵素を用いて、Ileの水酸化による 4 - ヒドロキシイソロイシン生成反応時の補因子の影響を検討した。実施例 2 記載の方法にて調製したL-Ile水酸化酵素を最終濃度が 5 mM L-Ileと 5 mMの各種補因子を含有した100mM HEPES (pH6)反応液にて反応させ、4 - ヒドロキシイソロイシン生成量を測定した。表 8 に示すとおり、4 - ヒドロキシイソロイシン生成にFe<sup>2+</sup>と 2 - オキソグルタル酸が必須であり、更にアスコルビン酸を添加することで 4 - ヒドロキシイソロイシン生成量は最大となった。よってL-イソロイシン水酸化による 4 - ヒドロキシイソロイシン生成にはジオキシゲナーゼが関与している可能性が強く示唆され、破碎液を用いた検討結果と同じであった。

30

## 【 0 2 0 8 】

## 【表 8】

表 8 精製酵素による 4 - ヒドロキシイソロイシン生成活性における各種補因子の影響

抽出液	基質 (L-Ile)	補因子	HIL (mM)
+	-	-	0.00
+	+	-	0.00
+	+	α-KG	0.00
+	+	Ascorbate	0.00
+	+	Fe <sup>2+</sup>	0.00
+	+	α-KG + Ascorbate	0.00
+	+	α-KG + Fe <sup>2+</sup>	0.02
+	+	Ascorbate + Fe <sup>2+</sup>	0.00
+	+	α-KG + Ascorbate + Fe <sup>2+</sup>	0.26

40

50



【0209】

< 3 > 至適pH

実施例2記載の方法に従って調製したL-Ile水酸化酵素を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成活性のpH依存性を評価した。酵素反応液組成は5mM L-Ile、5mM Fe<sup>2+</sup>、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、200mM GTA (pH3~12)とした。反応温度は30とした。最大生成量を示したpHの4-ヒドロキシイソロイシン量を100%とし、それに対する相対活性比率で各pHの反応性を図8に示す。pHがpH4~8において活性が確認でき、pH5~8において高い活性が確認できた。

【0210】

< 4 > 至適温度

実施例2記載の方法に従って調製したL-Ile水酸化酵素を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の至適温度を評価した。酵素反応液組成は5mM Ile、5mM Fe<sup>2+</sup>、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、100mM Hepes (pH6)とした。最大生成量を示した温度の4-ヒドロキシイソロイシン量を100%とし、それに対する相対活性比率で各温度での反応性を図9に示す。0~40の温度帯で高い活性が確認できた。

10

【0211】

< 5 > 温度安定性

実施例2記載の方法に従って調製したL-Ile水酸化酵素を用いて、4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度安定性を評価した。pH7.0の酵素液を0~70で1hrインキュベーションした後、Ile水酸化活性を測定した。酵素反応液組成は5mM Ile、5mM Fe<sup>2+</sup>、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、100mM Hepes (pH6)で反応温度は30とした。最大生成量を示した保存温度の4-ヒドロキシイソロイシン量を100%とし、それに対する相対活性比率で各温度の温度安定性を図10に示す。60以上で酵素は失活した。

20

【0212】

< 6 > 基質反応特性

実施例2記載の方法に従って調製したL-Ile水酸化酵素を用いて、各種アミノ酸に対する反応特性を評価した。酵素液と反応液とを混合後、30、1時間反応させ、HPLC分析によって新たな物質の生成を評価した。酵素反応液組成は5mM アミノ酸、5mM Fe<sup>2+</sup>、5mM 2-オキソグルタル酸、5mM アスコルビン酸、100mM Hepes (pH6)で、アミノ酸としてL-イソロイシンに加えてD-イソロイシン、L-ロイシン、L-バリン、L-グルタミン酸、L-リジン

30

【0213】

【表9】

表9 各アミノ酸に対する反応性

	生成物
L-イソロイシン	あり (HIL)
D-イソロイシン	なし
L-ロイシン	なし
L-バリン	なし
L-グルタミン酸	なし
L-リジン	なし

40

50

## 【 0 2 1 4 】

## &lt; 7 &gt; 阻害剤の影響

実施例 2 記載の方法に従って調製したL-Ile水酸化酵素を用いて、4 - ヒドロキシイソロイシン生成活性に対する阻害剤の影響を検討した。酵素反応液組成は5 mM Ile、5 mM Fe<sup>2+</sup>、5 mM 2 - オキソグルタル酸、5 mM アスコルビン酸、100 mM Hepes (pH6)で反応温度は30℃、反応時間は1時間とした。反応時に、10 mMの阻害剤 (EDTA, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) を個別に添加した場合の4 - ヒドロキシイソロイシン生成量を測定した。阻害剤を添加しない場合の4 - ヒドロキシイソロイシン生成活性を100%とし、その生成量に対する相対活性を表 10 に示した。イソロイシン水酸化活性は阻害剤により活性が消失した。

## 【 0 2 1 5 】

## 【表 10】

10

表 10 阻害剤の影響

阻害剤	相対活性 (%)
なし	100
EDTA	0
Cu <sup>2+</sup>	0
Zn <sup>2+</sup>	0

20

## 【 0 2 1 6 】

## &lt; 8 &gt; N末端アミノ酸配列

実施例 2 記載の方法に従って調製したL-Ile水酸化酵素を実施例 3 の方法に従って電気泳動した後、PVDF膜 (バイオラッド社製 sequi-Blot™ PVDF membrane) に転写し、島津製作所社製プロテインシーケンサーPPSQ-10に供した。上記方法にて取得した酵素のN末端配列として、以下の結果を得た。

30

## 【 0 2 1 7 】

1 LysMetSerGlyPheSerIleGluGluLys 10  
 11 ValHisGluPheGluSerLysGlyPheLeu 20  
 (配列番号 5)

## 【 0 2 1 8 】

[ 実施例 4 ] Bacillus thuringiensis (2-e-2) 株由来IDOの精製

本発明の発明者らにより準備された環境微生物のスクリーニングにより、α - ケトグルタル酸依存 L - イソロイシンジオキシゲナーゼ活性を有する独自の微生物が見出された。これは、Bacillus thuringiensisと同定され、Bacillus thuringiensis 2-e-2 (FERM BP-10688)として保存された。

40

## 【 0 2 1 9 】

## 1 . 1 . 培養条件

下記の培養培地を実験に用いた。

CM1 (トリプトン 10g/l; イーストエキストラクト 10 g/l; NaOHでpH 7.0に調整)

CM6 (トリプトン 10 g/l; イーストエキストラクト 40 g/l; NaOHでpH 7.0に調整)

## 【 0 2 2 0 】

## 1 . 2 . 接種物調製

Bacillus thuringiensis 2-e-2株を、90 mM KPi バッファー (90 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (KOHでpH 7に調製))を加えたCM1培地で一晩30℃において培養した。次いで、グリセロールを培養物に20%まで添加した。得られた細胞懸濁液を1.9 mlバイアルに分け、-使用時まで70℃

50

で保存した。

#### 【 0 2 2 1 】

##### 1 . 3 . 培養条件

Bacillus thuringiensis 2-e-2株の培養を、Marubishi ファーマンターを用いて行った。培養パラメーターは次の通りであった。開始培養容積600ml、攪拌800rev/min、空気1:1、1N NaOH/HClの供給によりpH 7.0に調製。1バイアル(1.9 ml)の凍結懸濁液(上記参照)を、600mlのCM6培地への接種に用いた。2-e-2株を、約7.5時間培養した。次いで、遠心により菌体を採取し、使用時まで-70 で保存した。

#### 【 0 2 2 2 】

##### 1 . 4 . IDO活性測定

Bacillus thuringiensis 2-e-2株の培養物25~100mlから、菌体を遠心分離で採取し、2 mlのバッファー A (50 mM MOPS, 10% グリセロール, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, プロテアーゼインヒビター, pH 7.2) に再懸濁した。菌体をフレンチプレスセルを用いて破碎した(1000 Psiで3回)。反応液(50  $\mu$ l)は、50 mM HEPES pH 7.0; 5 mM Ile; 5 mM アスコルビン酸; 10 mM FeSO<sub>4</sub>; 5mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸及びタンパク質調製物の試料を含むものであった。反応は、34 で40分、振盪しながら保温した。合成された4HILをTLC分析で検出した。薄層シリカゲルプレート(10x15 cm)に、反応液の試料(1~2  $\mu$ l)をスポットし、展開溶媒(2-プロパノール: アセトン: アンモニア: 水 =100:100: 25:16)で展開した。4HILをニンヒドリン試薬で検出した。HPLC分析は実施例 4 に記載されたように行った。

#### 【 0 2 2 3 】

##### 1 . 5 . Bacillus thuringiensis 2-e-2株由来IDOの精製及び同定

全てのクロマトグラフィーの操作は、AKTAbasic100 システム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて行った。精製プロトコルは次の段階を含む。凍結細胞(62g生物体重量)を融解し、150mlのバッファー A [50 mM TRIZMA, 5% グリセロール, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, プロテアーゼインヒビター, HClでpH 7に調整]に再懸濁した。

#### 【 0 2 2 4 】

段階 1 . 菌体をフレンチプレスセル(max P = 1000 Psi)を2回通過させて破碎し、遠心し(14000 g, 4 , 20 min)、細胞片を除いた。得られたタンパク質調製物をバッファー A で平衡化したDEAE樹脂150mlに加えた。最終懸濁液を4 で約10分、ゆっくり振盪しながら保温した。次いで、吸着したタンパク質を有する樹脂をカラム(26X30 cm)に移し、2ステップ溶出を行った。最初に、カラムをバッファー A 中50 mM NaClで洗浄し、次いで、IDO活性をバッファー A 中250 mM NaClで溶出した。

#### 【 0 2 2 5 】

段階 2 . IDO活性を硫酸アンモニウム沈殿(1.9 M)で濃縮し、約3mlのバッファー B [50 mM TRIZMA, 5% グリセロール, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, pH 7]に再懸濁した。

#### 【 0 2 2 6 】

段階 3 . 段階 2 で得られた調製物の1.5mlを、バッファー B で平衡化したSuperdex 200 HR 10/30Aにアプライした。アイソクラティック溶出を、0.5 ml/minの流速で行った。活性画分を集めた。

#### 【 0 2 2 7 】

段階 4 . 段階 3 で得られたタンパク質調製物を、バッファー A で平衡化した1.6mlのSource15Qカラムにアプライした。溶出は、バッファー B 中の0-0.5 M NaClの直線グラディエント(10倍カラム容量)を用いて0.5 ml/minの流速で行った。各1mlの画分を回収し、活性画分を集めた。

#### 【 0 2 2 8 】

結果として、IDOは約120倍(表 1 1 参照)に精製された。最終タンパク質調製物のSDS-PAGEにより、主なバンドは1本のみであることが示された(全タンパク質の約70%、図 1 2 参照)。

#### 【 0 2 2 9 】

【表 1 1】

段階	全タンパク質 (mg)	全活性 (nmoles/min)	比活性 (nmoles/min/mg)	収率 (%)	精製倍
菌体抽出物	3072	19046	6	100	1
DEAE (バッチ)	1500	18750	12.5	98	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	109	12514	115	65	19
Superdex 200 HR	6	1356	226	7	38
Source 15Q	0.03	21	700	0.1	117

## 【 0 2 3 0 】

## 1 . 6 . IDO の 同 定

SDS-PAGEから主なタンパク質を抽出し、重量分析により分析した。ゲルの処理、トリプシン分解、タンパク質抽出及び、飛行時間マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量分析 (MALDI-TOF) は、Govorun, V.M. et al, (The proteome comparative analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Biochemistry (Mosc)*, 68, 1, 42-49 (2003)) のプロトコルに従って行った。タンパク質は、Mascot software (Matrix Science, USA) の Peptide Fingerprint オプションを用いて、光分解ペプチド質量のセットにより同定された。分析されたタンパク質は、MS分析により、*Bacillus thuringiensis* (serovar *israelensis*; ATCC 35646) 株由来の推定RBTH\_06809タンパク質と同定された (図 1 3)。

## 【 0 2 3 1 】

[ 実施例 5 ] *Bacillus thuringiensis* 2-e-2株及び*Bacillus thuringiensis* (serovar *israelensis*, ATCC 35646) 株由来のIDO遺伝子のクローニング

精製した試料をSDS(15-25%)ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。タンパク質のポリビニリデンジフルオリド膜への転写は、室温で1時間1 mA cm<sup>2</sup>で行った。CBBで染色後、IDOバンドを切り出し、プロテインシークエンサーPPSQ-10型 (島津製作所, 日本) による自動Edman分解に付した。精製タンパク質のN-末端の最初の20アミノ酸が決定された。

## 【 0 2 3 2 】

31-kDaポリペプチドのN-末端アミノ酸配列は、KMSGFSIEEKVHEFESKGFL (配列番号5) と決定された。BLAST検索により、このアミノ酸配列は、表1に示した、*Bacillus thuringiensis* (serovar *israelensis*) ATCC 35646由来のRBTH\_06809及び、*Bacillus cereus* ATCC 14579 由来のBC1061の仮想タンパク質と高い相同性を示した。RBTH\_06809のORFの配列分析及び精製タンパク質のN-末端アミノ酸の決定により、古典的SD配列が、ATG開始コドンの8bp上流に位置することから、可能性のある翻訳開始部位は一つのみであることが示された (図 1 4) 。しかし、精製タンパク質のLys(7)がN-末端アミノ酸である。N-末端プロセッシング (N-末端アミノ酸の切断) がIDO活性に必要と推測された。おそらく、この切断は、*Bacillus* sp. ではIDOと同時に発現し、*E. coli* では欠損している特異的プロテアーゼによるものである。従って、*E. coli* で成熟IDOを製造するためには特別な組換えプラスミドが構築された。

## 【 0 2 3 3 】

## 2 . 1 . 細菌

*Bacillus thuringiensis* (serovar *israelensis*, ATCC 35646) 株は、Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) から入手した (accession number B-197)。

## 【 0 2 3 4 】

## 2 . 2 . pMW119-IDO(Lys, 32) プラスミドの構築

pMW119-IDO(Lys, 32)を構築するために、以下の手順を行った。

*Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis, ATCC 35646) 株染色体の0.8 kb DNA断片を、オリゴヌクレオチドSVS 170 (配列番号3)及びSVS 169 (配列番号4)をプライマーとして (詳細は図15参照)、精製染色体DNAをテンプレートとして用いて増幅した。次のPCRプロトコルを用いた。最初のサイクル: 94 30秒、4サイクル: 94 40秒、49 30秒及び72 40秒、35サイクル: 94 30秒、54 30秒及び72 30秒。得られたPCRフラグメントをBamHI及びSacIエンドヌクレアーゼで消化し、次いで、同じ制限酵素で予め処理したpMW119ベクターに連結した。

10

## 【 0 2 3 5 】

## 2 . 3 . pMW119-IDO(Lys, 23) プラスミドの構築

*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株染色体の0.8 kb DNA断片を、オリゴヌクレオチドSVS 170 (配列番号3)及びSVS 169 (配列番号4)をプライマーとして (詳細は図15参照)、精製染色体DNAをテンプレートとして用いて増幅した。次のPCRプロトコルを用いた。最初のサイクル: 94 30秒、4サイクル: 94 40秒、49 30秒及び72 40秒、35サイクル: 94 30秒、54 30秒及び72 30秒。得られたPCRフラグメントをBamHI及びSacIエンドヌクレアーゼで消化し、次いで、同じ制限酵素で予め処理したpMW119ベクターに連結した。

## 【 0 2 3 6 】

*E. coli* TG1株の細胞を、連結混合物で形質転換した。得られるクローンをX-gal/IPTG 寒天-プレート (ブルー/ホワイトテスト)で選択した。次いで、IDO活性を、選択したクローンの粗細胞破碎液で試験した。

20

## 【 0 2 3 7 】

その結果、TG1 [pMW119-(Lys, 32)] 及びTG1 [pMW119-(Lys, 23)]の二つのクローンが選択された。対応するプラスミドを単離し、各プラスミドのクローンされたBamHI-SacI断片の配列決定を行った (図16、図17参照)。

## 【 0 2 3 8 】

決定されたDNA配列の分析により、クローンされた遺伝子と、既知のRBTH\_06809 ORFとの不一致が明らかになった (図18、図19)。さらに、pMW119プラスミド上のIDO(Lys, 23)の調節領域の点変異が決定され (図15C)、リーダーペプチド(1)のTAAストップコドンの消失、及び、ATG開始コドンとオーバーラップする、TGAストップコドンまでの翻訳の延長 (リーダーペプチド(2))が生じていた (図15A、C)。さらなる変異が、"-2"位置に検出され、CがAにより置換されていた (図15C)。

30

## 【 0 2 3 9 】

## 2 . 4 . TG1[pMW119-IDO(Lys, 23)] 及びTG1[pMW119-IDO(Lys, 32)]株の粗菌体破碎液のIDO活性測定

組換え*E. coli*株の粗菌体破碎液のIDO活性を調べるため、以下の手順を行った。5 mlの培養物から菌体を4 で遠心により採取し、0.5mlのバッファーA\*(50 mM TRIZMA, 5%グリセロール, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, HClによりpH 7に調整)に再懸濁し、超音波により4 で破碎した。反応液(50 µl)は、50 mM HEPES pH 7.0; 5 mM Ile; 0.5mM -ケトグルタル酸; 5 mM アスコルビン酸; 5 mM FeSO<sub>4</sub> 及びタンパク質調製物の試料を含むものであった。反応は、34 で1時間、振盪しながら保温した。合成された4HILを、実施例4に記載したようにTLC分析又はHPLC分析で検出した。結果を表12にまとめる。

40

## 【 0 2 4 0 】

【表 1 2】

株	IDO 活性 (nmoles/mg*min)
TG1[pMW119]	ND <sup>a)</sup>
TG1[pMW119-IDO(Lys, 23)]	15
TG1[pMW119-IDO(Lys, 32)]	3

a) ND – 非検出 ( $\leq 0.03$  nmoles/mg\*min)

10

## 【 0 2 4 1 】

[ 実施例 6 ] IDO活性を用いるL-イソロイシンの4HILへの生物変換

E. coli TG1[pMW119-IDO(Lys, 23)] 及び TG1[pMW119-IDO(Lys, 32)]株の菌体を、アンピシリン(100 mg/l)を加えたLB培地で、光学密度 $A_{540}=4 \sim 5$ となるまで(約6時間)培養した。2 mlの培養液から菌体を遠心で採取した後、1 mlの溶液MI50(100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (NaOHでpH 7に調整),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM, アンピシリン 150  $\mu\text{g/ml}$ , Ile 50 mM, 0.5mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸, グリセロール 1 %, イーストエキストラクト 0.005 g/l)に再懸濁した。

20

## 【 0 2 4 2 】

次いで、菌体を約12時間培養した。その後、4HILの濃度をTLC(HPLC)分析で調べた。得られたデータを表 1 3 にまとめる。表 1 3 から明らかのように、TG1[pMW119-IDO(Lys, 23)] は、TG1[pMW119-IDO(Lys, 32)]と比べて、より多くの4HILを蓄積した。

## 【 0 2 4 3 】

【表 1 3】

株	OD540		供給 Ile (mM)	取得 4HIL (mM)	収率 <sup>b)</sup> (%)
	0 h	12h			
TG1[pMW119]	10	20	50	ND <sup>a)</sup>	-
TG1[pMW119-IDO(Lys, 23)]	10	20	50	7	14
TG1[pMW119-IDO(Lys, 32)]	10	20	50	5	10

a) ND – 非検出 ( $\leq 0.02$  mM)  
b) 収率は(取得 4HIL/供給 Ile)\*100 として計算

30

## 【 0 2 4 4 】

[ 実施例 7 ] 蓄積した4-ヒドロキシ-L-イソロイシンのHPLC測定

HPCL分析: スペクトロフォトメーター1100シリーズを備えた高圧クロマトグラフ(Waters, USA)を用いた。選択した検出波長範囲: 励起波長は250 nmで、発光波長範囲は320 ~ 560 nmであった。accq-tag法による分離をカラムNova-Pak<sup>TM</sup> C18 150  $\times$  3.9 mm, 4  $\mu\text{m}$  (Waters, USA)を用いて +400で行った。試料の注入容量は5  $\mu\text{l}$ であった。アミノ酸誘導体の生成及びそれらの分離は、製造者Watersの推奨に従っておこなった(Liu, H. et al, J. Chromatogr. A, 828, 383-395 (1998); Waters accq-tag chemistry package. Instruction manual. Millipore Corporation, pp.1-9 (1993))。6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメートによるアミノ酸誘導体を得るために、キットAccq-Fluor<sup>TM</sup> (Waters, USA)を用いた。accq-tag法による分析は、濃Accq-tag Eluent (Waters,

40

50

USA)を用いて行った。全ての溶液は、Milli-Qを用いて調製し、標準溶液は+4℃で保存した。

【0245】

[実施例8] *Bacillus cereus* ATCC14579、*B. thuringiensis* AKU238及び*B. weihenstephanensis* KBAB4由来ido遺伝子のクローニング

(1) 染色体DNAの調製

*Bacillus cereus* ATCC14579株、*B. thuringiensis* AKU238株及び*B. weihenstephanensis* KBAB4株をそれぞれ5mlのLB培地を用いて28℃で一晩培養した(前培養)。この培養液1.5mlを種菌として、50mlのLB培地を用いて本培養を行った。対数増殖後期まで培養した後、培養液50mlを遠心分離操作(12000×g、4℃、15分間)に供し、集菌した。この菌体を用いて定法に従って染色体DNAを調製した。

10

【0246】

(2) PCRによるido遺伝子の取得

*B. cereus* ATCC14579株について公開されているゲノム配列情報をもとに(GenBank accession No. AE016877)、以下のプライマーを合成した。

CATATGGAGGTTTTTATAATGACGTTTGTT (配列番号10)

CTCGAGTTTTGTCTCCTTATAAGAAAATGT (配列番号11)

【0247】

作製したプライマーを用いて、*B. cereus* ATCC14579株の染色体DNAを鋳型としてPCRによる増幅を行った。PCR反応は、PrimeSTAR(TaKaRa社製)を用いて行い、98℃10秒、52℃15秒及び72℃1分の条件で30サイクル行った。

20

【0248】

PCR産物をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約750bpの断片の増幅が認められた。該DNA断片を回収し、制限酵素NdeI及びXhoIで処理した後に、同じ制限酵素で処理した発現ベクターpET21b(Novagene)にクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、取得したDNA断片の相同性から、ido相同遺伝子が取得されたことが確認された(配列番号12及び13)。塩基配列レベルでの相同性は*B. thuringiensis israelensis* ATCC35646株由来のido遺伝子と比較して98%、*B. thuringiensis* 2-e-2株由来のido遺伝子と比較して98%であった。

30

【0249】

*B. thuringiensis* AKU238株については、*B. thuringiensis* 2-e-2株由来ido遺伝子クローニングに使用したプライマー(配列番号14及び15)を用いて、上記と同様にPCRにてido遺伝子をクローニングした(配列番号16及び17)。塩基配列レベルでの相同性は*B. thuringiensis israelensis* ATCC35646株由来のido遺伝子と比較して98%、*B. thuringiensis* 2-e-2株由来のido遺伝子と比較して98%であった。

CATATGAAAATGAGTGGCTTTAGCATAGAA (配列番号14)

CTCGAGTTTTGTCTCCTTATAAGAAAATGT (配列番号15)

【0250】

*B. weihenstephanensis* KBAB4株については、*B. weihenstephanensis* KBAB4株について公開されているゲノム配列情報(GenBank accession No. NZ\_AAOY01000001)をもとに、以下のプライマーを合成した(配列番号18及び19)。上記と同様にPCRにてido遺伝子をクローニングした(配列番号20及び21)。塩基配列レベルでの相同性は*B. thuringiensis israelensis* ATCC35646株由来のido遺伝子と比較して78%、*B. thuringiensis* 2-e-2株由来のido遺伝子と比較して78%であった。

40

CATATGCTAACACAGTTTCTAATAAGACA (配列番号18)

CTCGAGTTTTGGCTCCTTATAAGAAAACGT (配列番号19)

【0251】

[実施例9] *E. coli*でのido遺伝子の発現とIleからのHIL生産

(1) *E. coli*でのido遺伝子の発現

実施例8で構築した*B. cereus* ATCC14579株、*B. thuringiensis* AKU238株、又は、*B. we*

50

*weihenstephanensis* KBAB4由来ido発現プラスミドを*E. coli* Rosetta2 (DE3)に導入し、形質転換体を50 µg/ml アンピシリンを含むLB培地で一昼夜37 °Cで振盪培養した(前培養)。前培養液を50 mlのLB培地に1%シードし、37 °Cにて本培養を行った。培養開始約2時間後に終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加し、さらに3時間培養を行った。培養終了後、集菌、洗浄を行い、1 mlの20 mM Tris-HCl (pH 7.6)に懸濁し、ソニケーター(INSONATOR 201 M・KUBOTA製)を用いて菌体を破碎した。破碎液を15000 rpmで10分間遠心分離した上清を粗酵素液とした。

【0252】

(2) 粗酵素液を用いたIleからのHIL生産

10

(1)で調製した粗酵素液を用いて、IleからのHILへの変換活性を測定した。反応液組成は以下に示す通りで、28 °Cで振とう(300 rpm)させながら3時間反応後、HPLCにて生成したHILを定量した。定量結果を表14に示す。

【0253】

【表14】

反応液

細胞破碎液(超音波破碎)	500 µl	
2% Ile	100 µl	20
1 M α-KG	5 µl	
1 M Ascorbate	5 µl	
0.1 M FeCl <sub>2</sub>	10 µl	
1 M KPb (pH 6)	100 µl	
計	1 ml	

表14 IleからのHIL生成量

30

	HIL (µM)
<i>B. thuringiensis israelensis</i> ATCC35646	2150
<i>B. thuringiensis</i> 2e2	2321
<i>B. thuringiensis</i> AKU238	2016
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	90
<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	3116
コントロール (pET21b)	11

【0254】

その結果、*B. cereus* ATCC14579、*B. thuringiensis* AKU238又は*B. weihenstephanensis* KBAB4株由来ido発現株を用いた場合も、明らかにHILの生成が認められ、これらの遺伝子がHIL生産に使用できることが確認された。

40

【0255】

配列の説明

- 1: *B. thuringiensis* 2-e-2株由来IDO遺伝子の塩基配列
- 2: *B. thuringiensis* 2-e-2株由来IDOのアミノ酸配列
- 3: プライマー-svs 170; IDO遺伝子増幅用
- 4: プライマー-svs 169; IDO遺伝子増幅用
- 5: *B. thuringiensis* 2-e-2株由来IDOのN-末端配列
- 6: *Bacillus*属におけるIDO保存配列

50



7: *B. thuringiensis* ATCC 35646株由来IDO遺伝子の塩基配列

8: *B. thuringiensis* ATCC 35646株由来IDOのアミノ酸配列

9: *B. thuringiensis* 2-e-2株の16S rDNA塩基配列

10: *B. cereus* ATCC 14579由来IDO遺伝子の増幅用プライマー

11: *B. cereus* ATCC 14579由来IDO遺伝子の増幅用プライマー

12: *B. cereus* ATCC 14579由来IDO遺伝子の塩基配列

13: *B. cereus* ATCC 14579由来IDOのアミノ酸配列

14: *B. thuringiensis* AKU238由来IDO遺伝子の増幅用プライマー

15: *B. thuringiensis* AKU238由来IDO遺伝子の増幅用プライマー

16: *B. thuringiensis* AKU238由来IDO遺伝子の塩基配列

10

17: *B. thuringiensis* AKU238由来IDOのアミノ酸配列

18: *B. weihenstephanensis* KBAB4由来IDO遺伝子の増幅用プライマー

19: IDO gene from *B. weihenstephanensis* KBAB4由来IDO遺伝子の増幅用プライマー

20: *B. weihenstephanensis* KBAB4由来IDO遺伝子の塩基配列

21: *B. weihenstephanensis* KBAB4由来IDOのアミノ酸配列

【産業上の利用可能性】

【0256】

本発明によれば、イソロイシンの直接水酸化反応により4-ヒドロキシイソロイシンを生成する反応を触媒する、微生物由来の酵素により4-ヒドロキシイソロイシンを製造する方法が提供される。本発明は医薬分野、食品分野において極めて有用である。

20

【0257】

本発明のL-イソロイシンジオキシゲナーゼは、L-イソロイシンの水酸化反応を触媒する新規なジオキシゲナーゼであり、好ましくは、インスリン分泌活性を有する医薬組成物の成分として有用な(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシンの合成に使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0258】

【図1】2-e-2株培養時の4-ヒドロキシイソロイシンとAMKP生成量の経時的変化を示す。

【図2】2-e-2株培養時の濁度変化を示す。

【図3】2-e-2株の休止菌体を用いた4-ヒドロキシイソロイシンとAMKPの生成活性を示す。

30

【図4】各種サンプルの4-ヒドロキシイソロイシン生成活性を示す。

【図5】2-e-2株破砕液による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性のpH依存性を示す。

【図6】2-e-2株破砕液による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度依存性を示す。

【図7】2-e-2株破砕液による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度安定性を示す。

【図8】精製酵素による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性のpH依存性を示す。

【図9】精製酵素による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度依存性を示す。

【図10】精製酵素による4-ヒドロキシイソロイシン生成活性の温度安定性を示す。

40

【図11】本発明のIDOを製造する方法のフローチャートを示す。

【図12】*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株由来IDOの精製(写真)を示す。精製段階のタンパク質試料のSDS-PAGEを示す。レーン: 1 - 示した分子量のマーカー; 2 - 粗細胞破砕液; 3 - 硫酸アンモニウム沈殿; 4 - SEC; 5 - AEC。

【図13】*Bacillus thuringiensis* 2-e-2株由来IDOのMS同定を示す。

【図14】*Bacillus thuringiensis* (serovar israelensis, ATCC 35646) RBTH\_06809 ORFの推定翻訳開始部を示す。

【図15】組換えプラスミドpMW119-IDO(Lys, 32/23)の人工発現モジュールを示す。

【図16】pMW119-IDO(Lys, 23)プラスミドの物理的地図、及び、IDO構造遺伝子を保持するクローンされたBamHI-SacI断片の決定された配列を示す。調節領域における自然点突然

50

変異を灰色で示す。

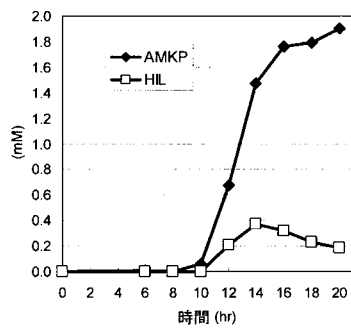
【図17】 pMW119-IDO(Lys, 32) プラスミドの物理的地図、及び、IDO構造遺伝子を保持するクローンされたBamHI-SacI断片の決定された配列を示す。

【図18】 IDO(Lys, 23), IDO(Lys, 32)及びRBTH\_6809 (5'-端短縮)に相当する構造遺伝子のDNAアラインメントを示す。可変部位を灰色で示す。

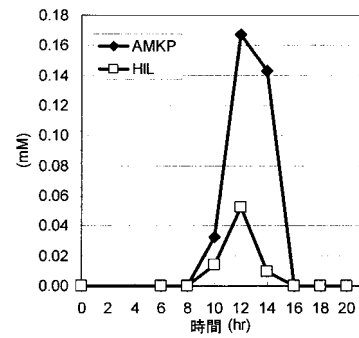
【図19】 IDO(Lys, 23), IDO(Lys, 32)及びRBTH\_06890 ORFのタンパク質アラインメントを示す。可変部位を灰色で示す。

【図20】 *Bacillus thuringiensis*由来IDO、*Bacillus cereus*由来BC1061及び*Bacillus weihenstephanensis*由来保存仮想タンパク質のタンパク質アラインメントを示す。

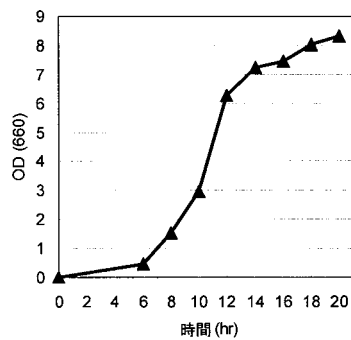
【図1】



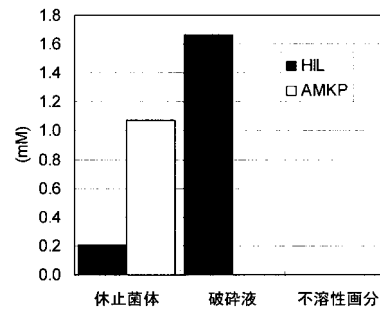
【図3】



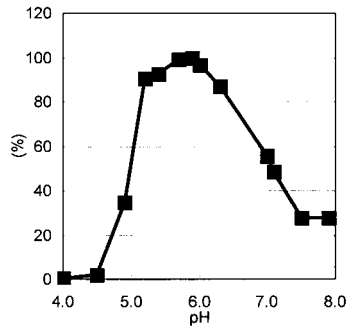
【図2】



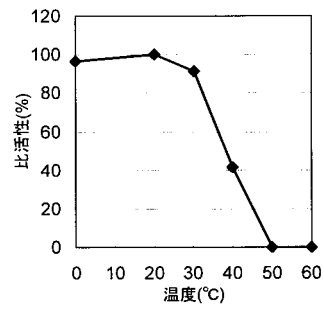
【図4】



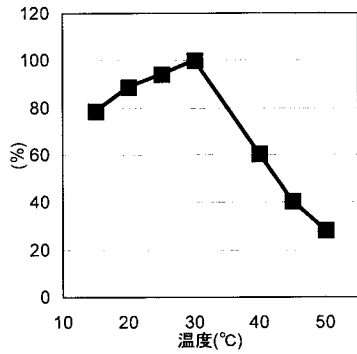
【 図 5 】



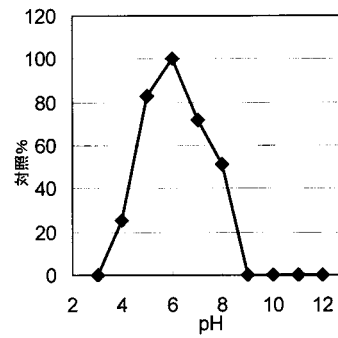
【 図 7 】



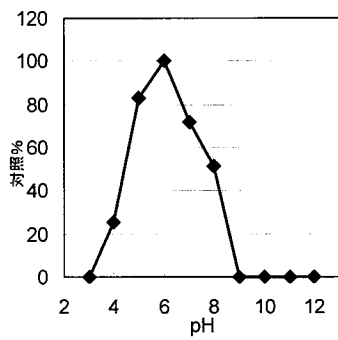
【 図 6 】



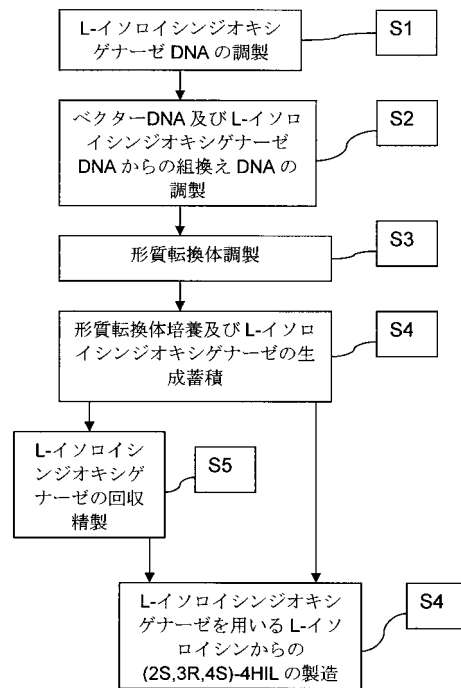
【 図 8 】



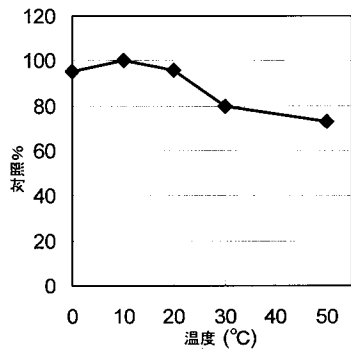
【 図 9 】



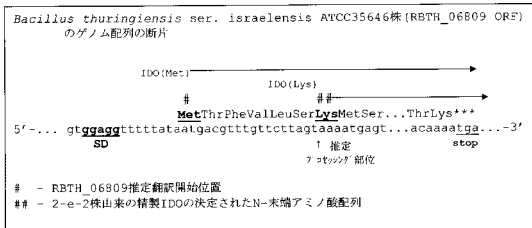
【 図 1 1 】



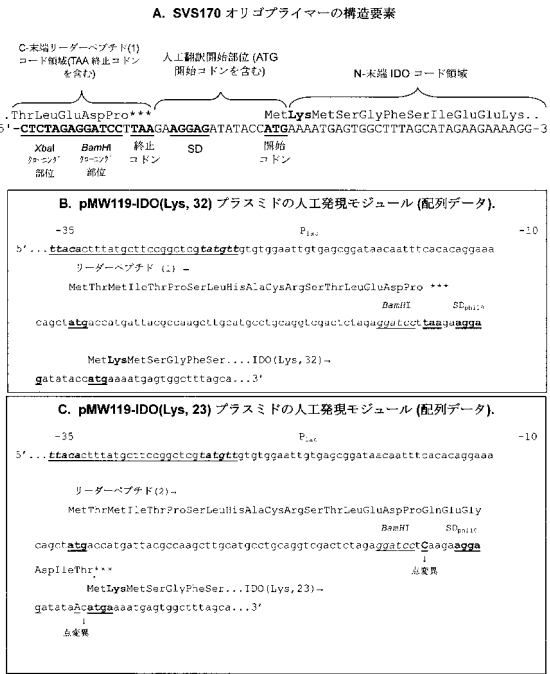
【 図 1 0 】



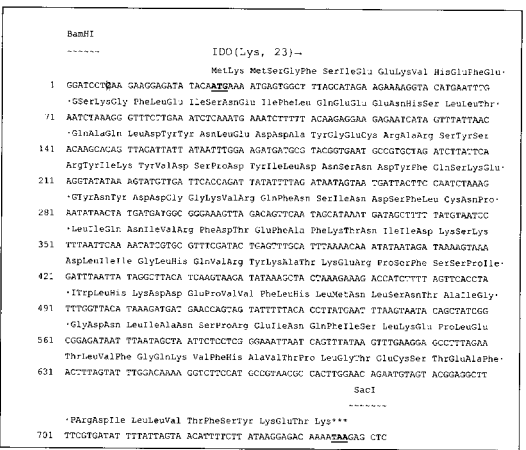
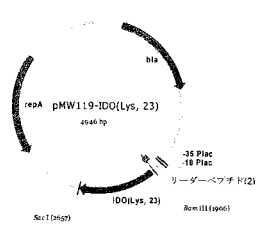
【図14】



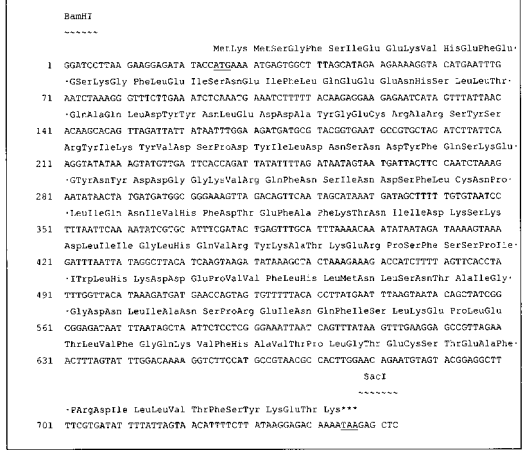
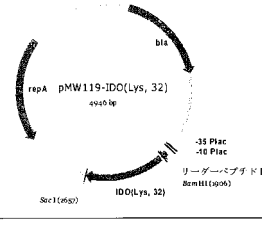
【図15】



【図16】



【図17】



【 18 】

Genomic data for sequence 18, including coordinates (1, 70), sequence identifiers (ID, IDO, IDL), and nucleotide sequences (1: AAAATGAGTGCC...) across various species.

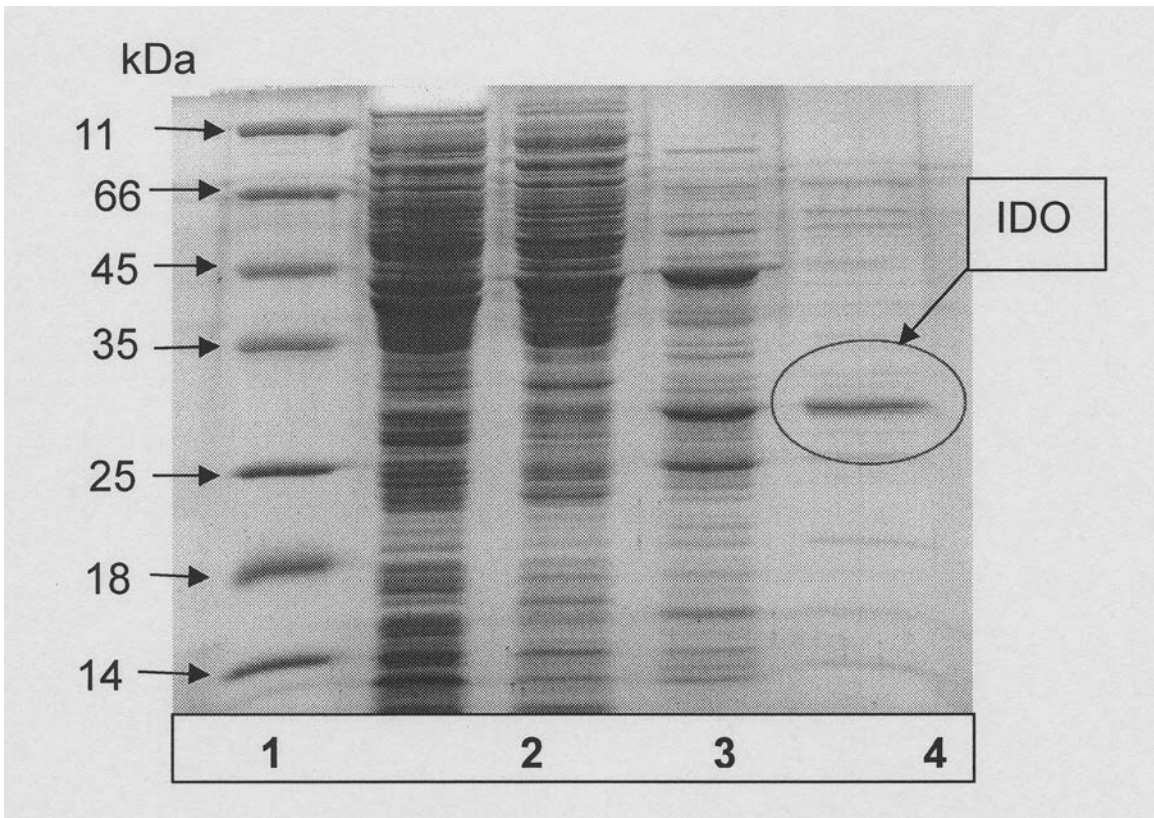
【 20 】

Genomic data for sequence 20, including coordinates (1, 60), sequence identifiers (ID, IDO, IDL), and nucleotide sequences (1: AATTTTGGT...) across various species.

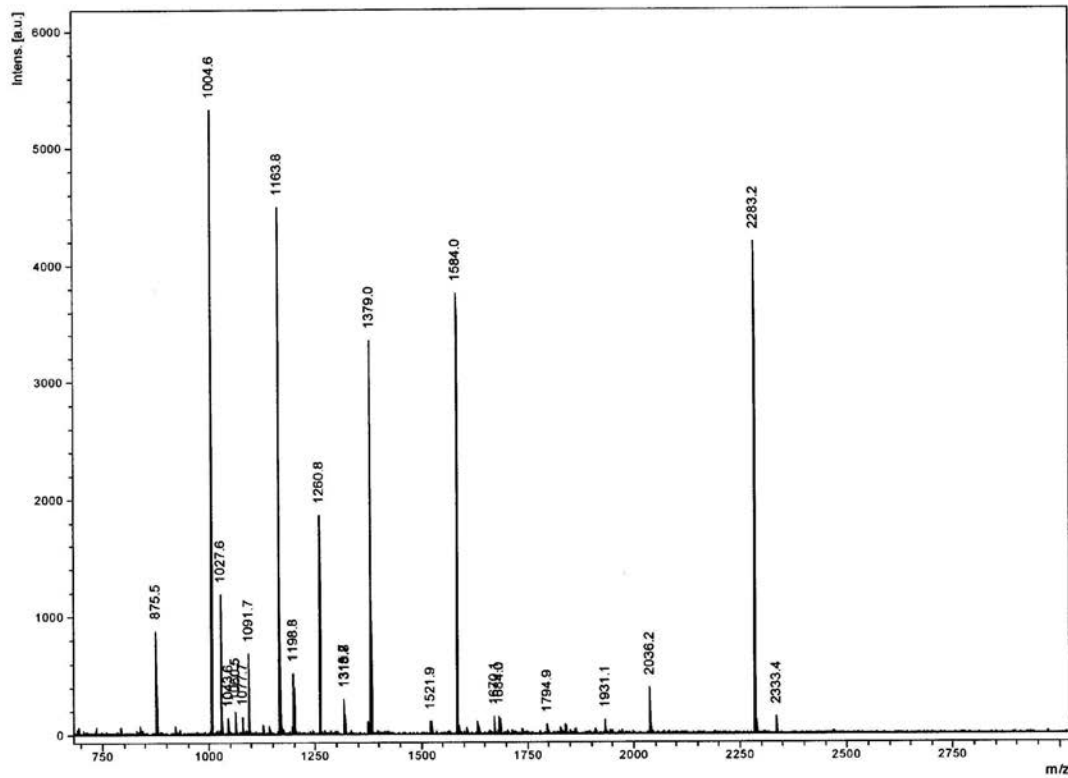
【 19 】

Genomic data for sequence 19, including coordinates (1, 60), sequence identifiers (ID, IDO, IDL), and nucleotide sequences (1: KNSGFSIKKRV...) across various species.

【 12 】



【 13 】



gi|75758796      Mass: 29112      Score: 165      Expect: 5.7e-011      Queries matched: 13  
 Hypothetical protein RBTH\_06809 [Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
875.48	874.47	874.42	0.05	22	-	28	0 K.VHEFESK.G
1004.55	1003.54	1003.47	0.08	127	-	134	0 R.FDTEFAFK.T
1027.57	1026.56	1026.47	0.09	13	-	21	0 K.MSGFSIEEK.V
1043.56	1042.55	1042.46	0.09	13	-	21	0 K.MSGFSIEEK.V + Oxidation (M)
1060.51	1059.51	1059.41	0.09	96	-	104	0 K.EYNYDDGK.V
1091.71	1090.70	1090.60	0.10	200	-	208	0 R.EINQFISLK.E
1163.80	1162.79	1162.68	0.11	143	-	152	0 K.DLIIGLHQVR.Y
1198.78	1197.78	1197.66	0.11	238	-	247	0 R.DILLVTFYSK.E
1260.80	1259.79	1259.68	0.12	209	-	219	0 K.EPLETLVFGQK.V
1583.97	1582.96	1582.83	0.14	158	-	170	0 K.ERPSFSSPIWLHK.D
2036.16	2035.15	2035.14	0.01	135	-	152	1 K.TNIIDTSKDLIIGLHQVR.Y
2283.19	2282.18	2282.00	0.18	77	-	95	0 K.YVDSPTYILDNSNDYFQSK.E
2333.45	2332.44	2332.27	0.17	200	-	219	1 R.EINQFISLKEPLETLVFGQK.V

No match to: 1077.67, 1315.73, 1318.78, 1378.95, 1521.89, 1670.06, 1684.01, 1794.94, 1931.13

【 配列表 】

0005246639000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 R	1/125	(2006.01)	C 1 2 P	13/06	C
C 1 2 R	1/19	(2006.01)	C 1 2 R	1:10	
C 1 2 R	1/06	(2006.01)	C 1 2 P	13/06	C
C 1 2 R	1/15	(2006.01)	C 1 2 R	1:125	
C 1 2 R	1/38	(2006.01)	C 1 2 P	13/06	C
C 1 2 R	1/66	(2006.01)	C 1 2 R	1:19	
			C 1 2 P	13/06	C
			C 1 2 R	1:06	
			C 1 2 P	13/06	C
			C 1 2 R	1:15	
			C 1 2 P	13/06	C
			C 1 2 R	1:38	
			C 1 2 P	13/06	C
			C 1 2 R	1:66	

- (72)発明者 セルゲイ ヴァシリエヴィッチ スミルノフ  
ロシア連邦、117545、モスクワ、1、ドロズニイ プロエズド、1 アジノモト - ジェネティカ リサーチ インスティテュート内
- (72)発明者 ナタリア ニコラエブナ サムソノヴァ  
ロシア連邦、117545、モスクワ、1、ドロズニイ プロエズド、1 アジノモト - ジェネティカ リサーチ インスティテュート内
- (72)発明者 ヴェロニカ アレクサンドロヴナ コトリアロヴァ  
ロシア連邦、117545、モスクワ、1、ドロズニイ プロエズド、1 アジノモト - ジェネティカ リサーチ インスティテュート内
- (72)発明者 ナタリア ユリエヴナ ルシュケヴィッチ  
ロシア連邦、117545、モスクワ、1、ドロズニイ プロエズド、1 アジノモト - ジェネティカ リサーチ インスティテュート内
- (72)発明者 ユーリー イヴァノヴィッチ コズロフ  
ロシア連邦、117545、モスクワ、1、ドロズニイ プロエズド、1 アジノモト - ジェネティカ リサーチ インスティテュート内
- (72)発明者 清水 昌  
京都府京都市左京区北白川追分町 国立大学法人京都大学大学院農学研究科内
- (72)発明者 小川 順  
京都府京都市左京区北白川追分町 国立大学法人京都大学大学院農学研究科内
- (72)発明者 日比 慎  
京都府京都市左京区北白川追分町 国立大学法人京都大学大学院農学研究科内

審査官 白井 美香保

- (56)参考文献 Database GenBank, 2003年 6月 1日, Q81GX0, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/81435614?sat=35&satkey=1565909>  
Database GeneBank, 2005年12月30日, AAP08048, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/29894759?sat=13&satkey=7077551>  
Database GenBank, 2005年 9月14日, EA056802, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EA056802>  
NATURE, 2003年, vol.423, pp.87-91  
Phytochemistry, 1997年, vol.44 no.4, pp.563-566

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

CiNii

WPI