

(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2015-81252

(P2015-81252A)

(43) 公開日 平成27年4月27日(2015.4.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/132 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/132	Z N A 2 B 0 2 2
<b>A 2 3 K 1/16 (2006.01)</b>	A 2 3 K 1/16	3 0 1 D 2 B 1 5 0
<b>A O 1 G 7/00 (2006.01)</b>	A O 1 G 7/00	6 0 4 Z 4 B 0 2 4
<b>A O 1 N 33/04 (2006.01)</b>	A O 1 N 33/04	4 C 0 8 4
<b>A O 1 P 21/00 (2006.01)</b>	A O 1 P 21/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-221483 (P2013-221483)

(22) 出願日 平成25年10月24日 (2013.10.24)

特許法第30条第2項適用申請有り ▲1▼ 発行者名  
 公益社団法人日本生物工学会 刊行物名 第65回日  
 本生物工学会大会講演要旨集 発行年月日 平成25年  
 8月25日 ▲2▼ 集会名 第65回日本生物工学会  
 大会 開催日 平成25年9月18日から平成25年9  
 月20日 (公開日は平成25年9月18日)

(71) 出願人 503092180

学校法人関西学院

兵庫県西宮市上ヶ原一番町1番155号

(74) 代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72) 発明者 藤原 伸介

兵庫県三田市学園二丁目一番地 関西学院  
大学理工学部内

(72) 発明者 秀瀬 涼太

兵庫県三田市学園二丁目一番地 関西学院  
大学理工学部内

Fターム(参考) 2B022 EA01

2B150 AA20 AB02 DA20

4B024 AA07 AA10 BA80 CA04 CA12

DA06 EA04 GA11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動植物用成長促進剤

(57) 【要約】

【課題】直鎖ポリアミンよりも優れた効果を有する動植物用成長促進剤を提供することを課題とする。

【解決手段】分岐鎖ポリアミン又は長鎖ポリアミンを含有する、動植物用成長促進剤。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

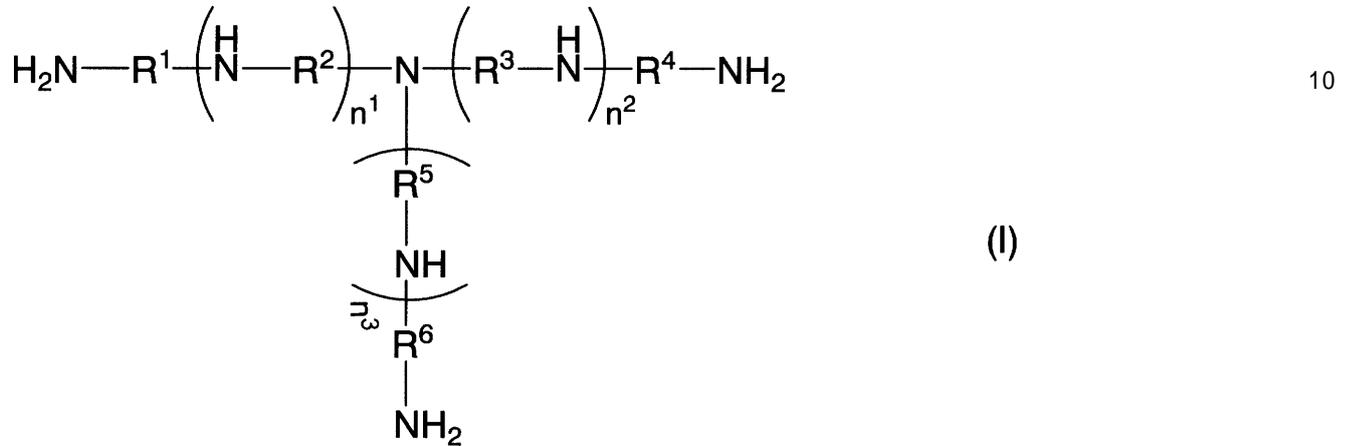
## 【請求項 1】

分岐鎖ポリアミン又は長鎖ポリアミンを含有する、動植物用成長促進剤。

## 【請求項 2】

前記分岐鎖ポリアミンが、下記式 (I) で表わされる 3 級ポリアミン、又は下記式 (II) で表される 4 級ポリアミンである、請求項 1 に記載の動植物用成長促進剤

## 【化 1】

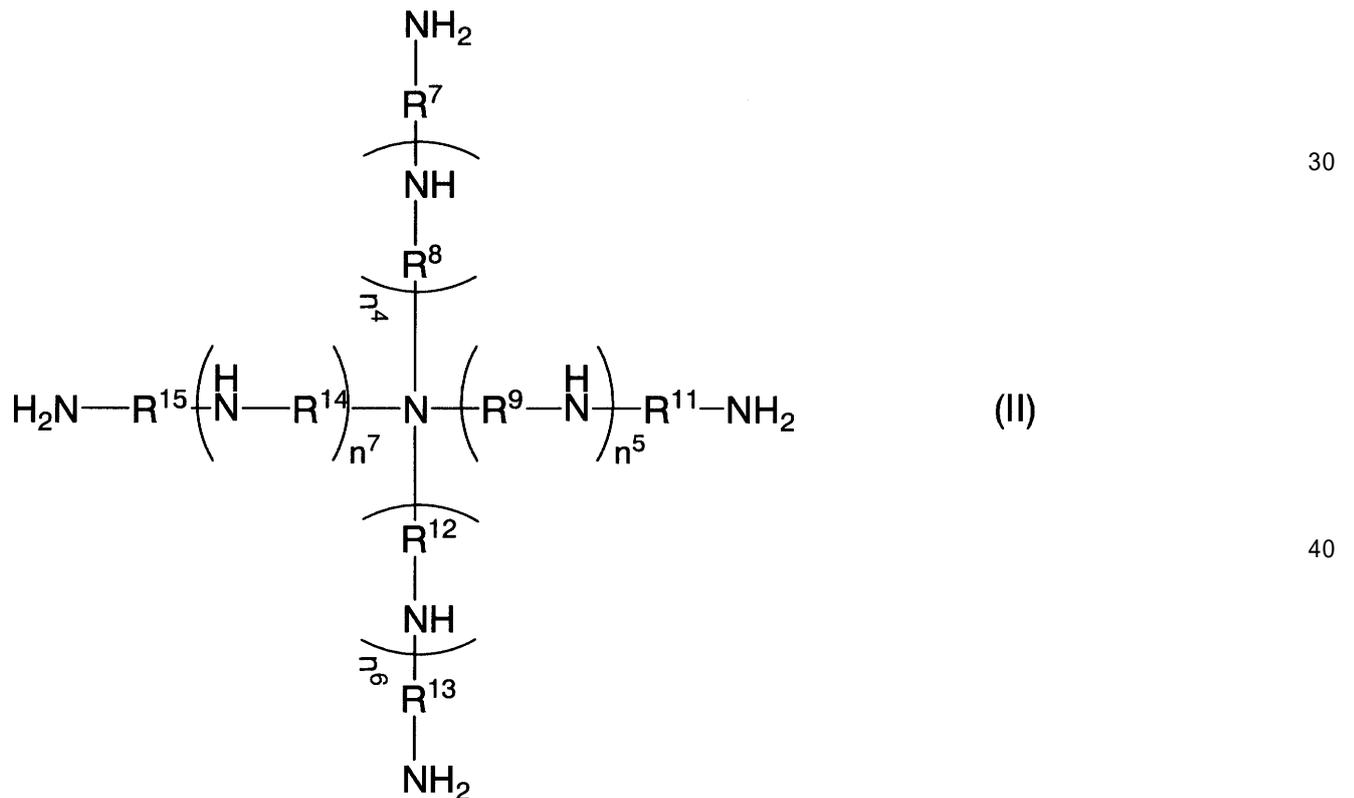


10

20

(式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$  は、同一又は異なって、炭素数 2 ~ 6 の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  及び  $\text{R}^5$  は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^1 \sim n^3$  は、同一又は異なって、0 又は 3 以下の整数である。)

## 【化 2】



30

40

(式中、 $\text{R}^7 \sim \text{R}^{15}$  は、同一又は異なって、炭素数 2 ~ 6 の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ  $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 、 $\text{R}^{12}$  及び  $\text{R}^{14}$  は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^4 \sim n^7$  は、同一又は異なって

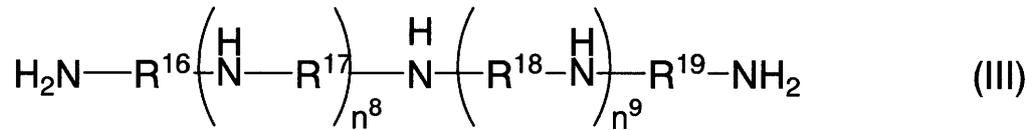
50

、0又は3以下の整数である。 )。

【請求項3】

前記長鎖ポリアミンが、下記式(III)で表わされる長鎖ポリアミンである、請求項1に記載の動植物用成長促進剤

【化3】



(式中、 $\text{R}^{16} \sim \text{R}^{19}$ は、同一又は異なって、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ $\text{R}^{17}$ 及び $\text{R}^{18}$ は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^8$ 及び $n^9$ は、同一又は異なって、3以下の整数である。 )。

【請求項4】

前記分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンが、好熱菌により産生されうるものである、請求項1に記載の動植物用成長促進剤。

【請求項5】

好熱菌又はその細胞抽出物を含有する、動植物用成長促進剤。

【請求項6】

アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素を含有する、動植物用成長促進剤(ただし、前記アルキル基及び前記アルケニル基は、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である)。

【請求項7】

アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素をコードする遺伝子、又は当該遺伝子を含有する発現ベクターを含有する、動植物用成長促進剤(ただし、前記アルキル基及び前記アルケニル基は、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動植物用成長促進剤に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリアミンは、第一級アミノ基(第一級アミンから水素を除去した1価の官能基(-NH-R(Rは脂肪族炭化水素基を表わす)))が3つ以上結合した脂肪族炭化水素の総称である。

【0003】

ポリアミンは様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質である。多くの生物により産生されるポリアミンは、直鎖脂肪族炭化水素(本明細書において、「直鎖ポリアミン」という。)である。

【0004】

直鎖ポリアミンについて、これまでに植物の生長を促進する作用(特許文献1)、動物の寿命を延長させる作用(特許文献2)、RNA安定化作用(特許文献3)等が報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2002-29905号公報

【特許文献2】国際公開第2009/093454号

【特許文献3】特開2006-20575号公報

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明は、直鎖ポリアミンよりも優れた効果を有する動植物用成長促進剤を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者らは、好熱菌が産生する特殊なポリアミンに着目した。すなわち、分岐構造を有するポリアミン（本明細書において、「分岐鎖ポリアミン」という。）及び他の生物が産生するものに比べてより長鎖のポリアミン（本明細書において、「長鎖ポリアミン」という。）に着目した。そして、これらの特殊なポリアミンは直鎖ポリアミンと比べて核酸の安定化能がより高く、さらに、動植物に対する成長促進作用により優れていることを見出した。本発明はかかる知見に基づきさらなる検討を重ねて完成に至ったものであり、以下の実施態様を含む。

項 1 .

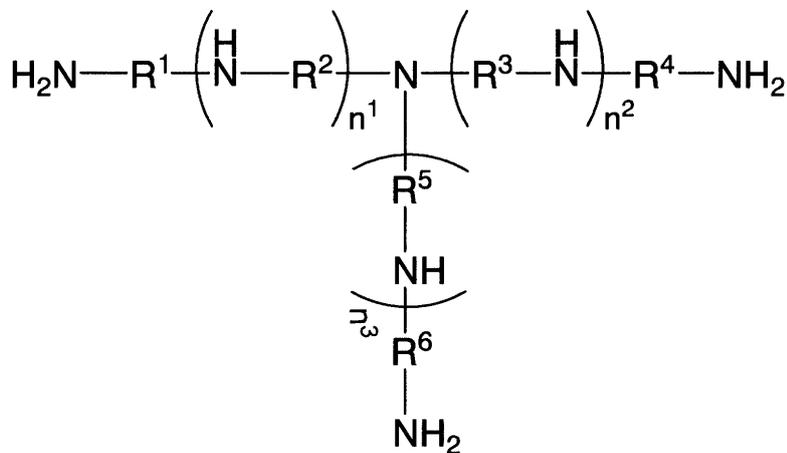
分岐鎖ポリアミン又は長鎖ポリアミンを含有する、動植物用成長促進剤。

項 2 .

前記分岐鎖ポリアミンが、下記式 ( I ) で表わされる 3 級ポリアミン、又は下記式 ( I I ) で表される 4 級ポリアミンである、項 1 に記載の動植物用成長促進剤

## 【0008】

## 【化 1】



## 【0009】

（式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$  は、同一又は異なって、炭素数 2 ~ 6 の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  及び  $\text{R}^5$  は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^1 \sim n^3$  は、同一又は異なって、0 又は 3 以下の整数である。）

## 【0010】

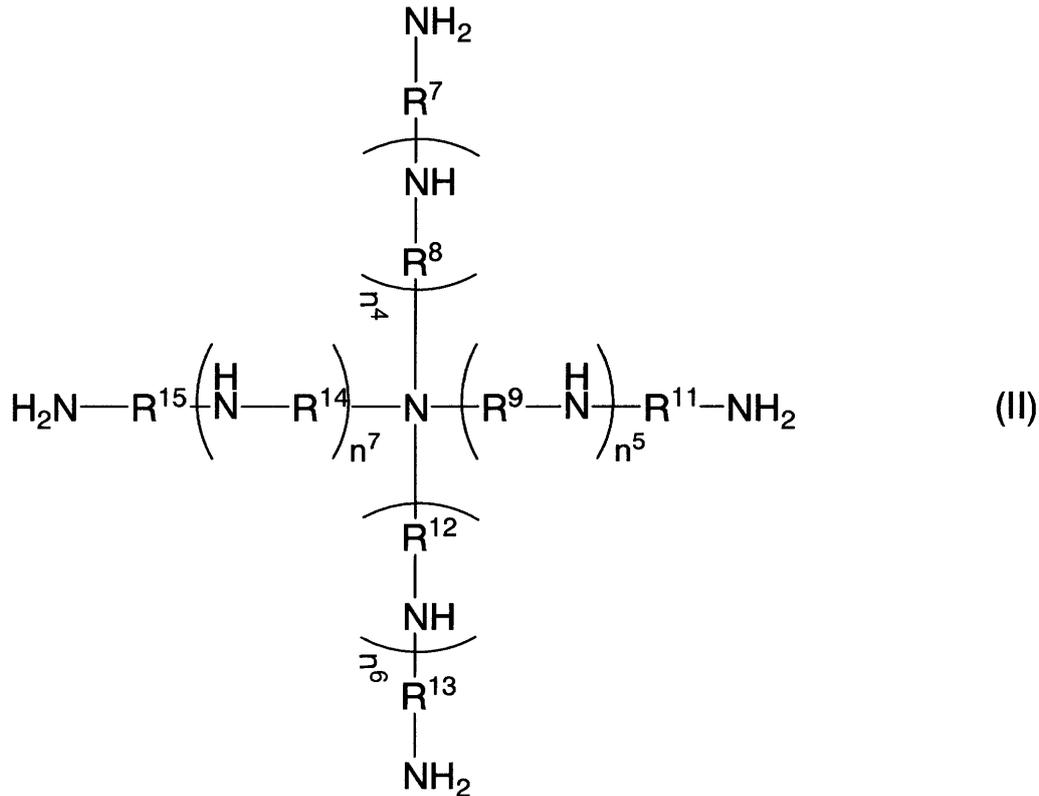
10

20

30

40

【化2】



10

20

【0011】

(式中、 $\text{R}^7 \sim \text{R}^{15}$ は、同一又は異なって、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 、 $\text{R}^{12}$ 及び $\text{R}^{14}$ は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^4 \sim n^7$ は、同一又は異なって、0又は3以下の整数である。)

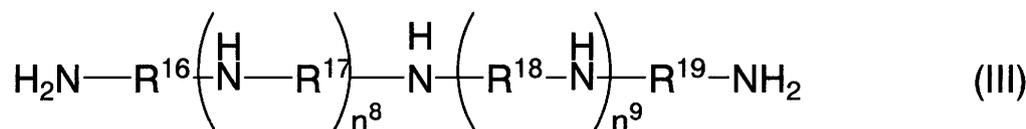
項3.

前記長鎖ポリアミンが、下記式(III)で表わされる長鎖ポリアミンである、請求項1に記載の動植物用成長促進剤

30

【0012】

【化3】



【0013】

(式中、 $\text{R}^{16} \sim \text{R}^{19}$ は、同一又は異なって、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ $\text{R}^{17}$ 及び $\text{R}^{18}$ は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^8$ 及び $n^9$ は、同一又は異なって、3以下の整数である。)

40

項4.

前記分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンが、好熱菌により産生されうるものである、項1に記載の動植物用成長促進剤。

項5.

好熱菌又はその細胞抽出物を含有する、動植物用成長促進剤。

項6.

アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素を含有する、動植物用成長促

50

進剤（ただし、前記アルキル基及び前記アルケニル基は、炭素数 2 ~ 6 の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である）。

項 7 .

アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素をコードする遺伝子、又は当該遺伝子を含む発現ベクター

を含む、動植物用成長促進剤（ただし、前記アルキル基及び前記アルケニル基は、炭素数 2 ~ 6 の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である）。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、動植物に対する成長促進作用により優れている剤を提供することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】TK1691 オルソログの系統樹を示す図面である。

【図 2】TK1691 のオルソログに保存されている S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase 様の領域を示す図面である。

【図 3】*T. kodakarensis* のポリアミン生合成経路を示す図面である。

【図 4】A は、BL21(DE3)codonplus-RIL 株/pET21a のポリアミン分析を、B は、BL21(DE3)codonplus-RIL 株/pET21a-Tk1691 のポリアミン分析を示す（矢印はビスアミノプロピルスペルミジンに由来するピークを表わす）。

20

【図 5】各食餌を与えた線虫における体長の伸長を調べた結果を示すグラフである（Control は、BL21(DE3)codonplus-RIL 株/pET21a で生育した線虫を、TK1691 は、BL21(DE3)codonplus-RIL 株/pET21a-Tk1691 で生育した線虫を表わす）。

【図 6】各食餌を与えた線虫における咽頭の伸長を調べた結果を示すグラフである（Control: BL21(DE3)codonplus-RIL 株/pET21a で生育した線虫, TK1691: BL21(DE3)codonplus-RIL 株/pET21a-Tk1691 で生育した線虫を表わす）。

【図 7】各食餌を与えたカブトムシ幼虫における体長、体重の変化を調べた結果を示すグラフである。

【図 8】各種ポリアミンについて、翻訳の活性化効果を調べたグラフである。

【発明を実施するための形態】

30

【0016】

#### 1. 分岐鎖ポリアミン

本発明において、分岐鎖ポリアミンとは、好熱菌以外の生物が産生する直鎖ポリアミンと異なり、一部に分岐構造を有しているものを意味する。本発明において、分岐鎖ポリアミンは、好熱菌により産生されるものに限定されず、一部に分岐構造を有しているものを全て包含する。

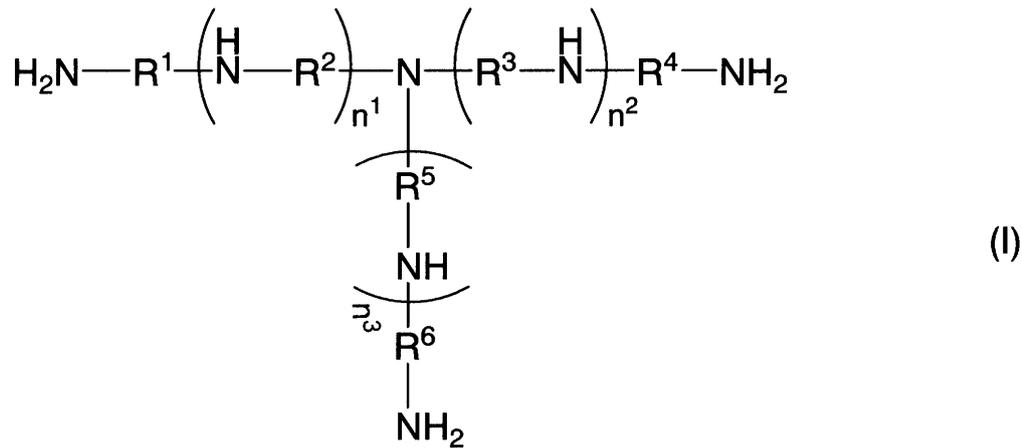
【0017】

特に限定されないが、分岐鎖ポリアミンの代表例として、下記式 (I) で表わされる 3 級ポリアミンが挙げられる。

【0018】

40

【化4】



10

【0019】

(式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$ は、同一又は異なって、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^5$ は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^1 \sim n^3$ は、同一又は異なって、0又は3以下の整数である。)

上記において、好ましくは、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$ は、炭素数3～4の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である。 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$ は、より好ましくは、アルキル基である。

20

【0020】

上記において、 $n^1 \sim n^3$ は、好ましくは、0又は2以下の整数であり、より好ましくは、0又は1であり、さらに好ましくは、0である。

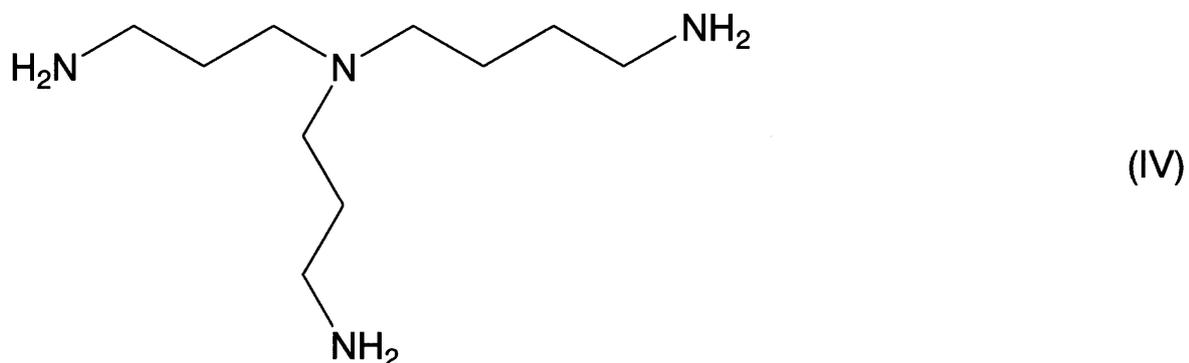
【0021】

特に限定されないが、好熱菌により産生されうる分岐鎖ポリアミンの代表例として、下記式(IV)で表わされる $\text{N}^4$ -アミノプロピルスペルミジン、及び下記式(V)で表わされる $\text{N}^4$ -アミノプロピルスペルミン等が挙げられる。

30

【0022】

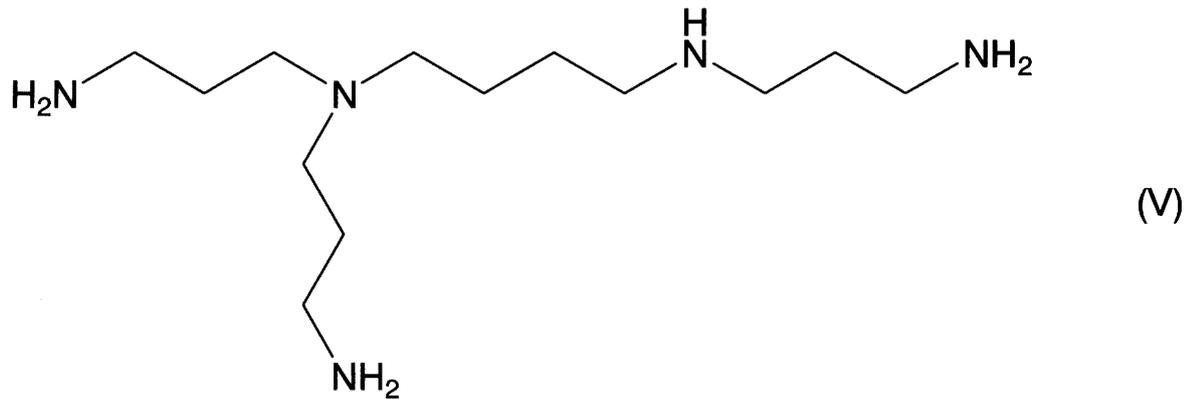
【化5】



40

【0023】

【化6】



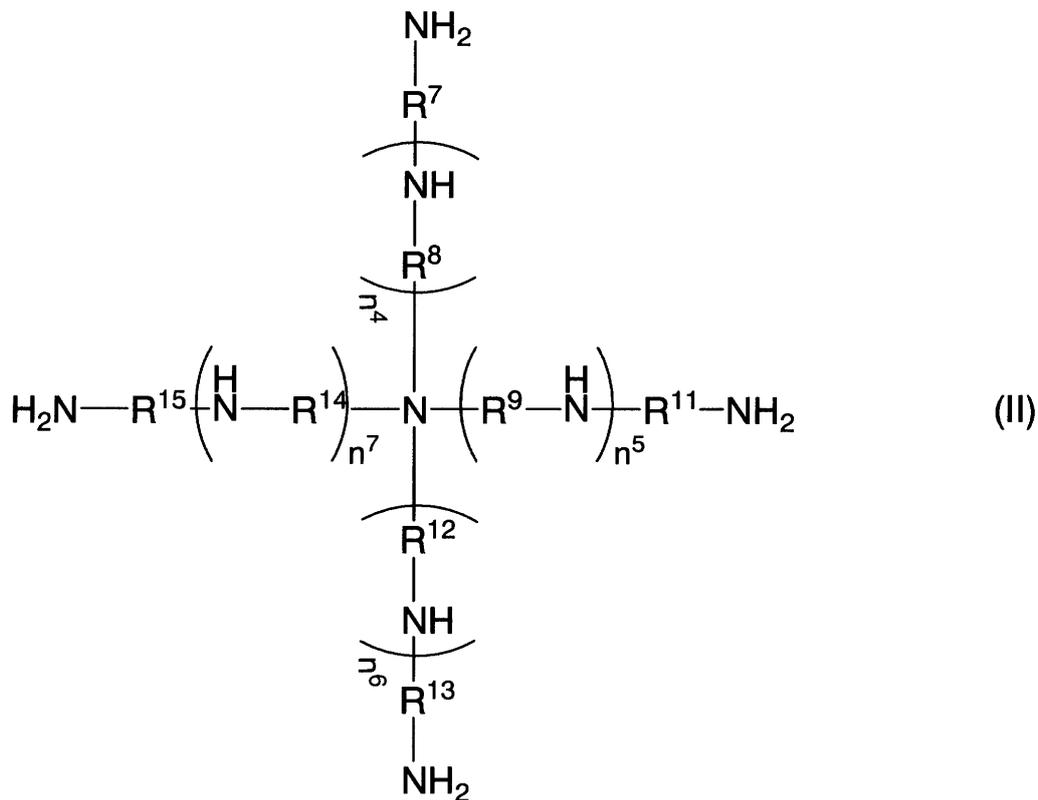
10

【0024】

特に限定されないが、分岐鎖ポリアミンの別の代表例として、下記式 (II) で表わされる4級ポリアミンが挙げられる。

【0025】

【化7】



20

30

【0026】

40

(式中、 $R^7 \sim R^{15}$  は、同一又は異なって、炭素数2～6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつ $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{12}$ 及び $R^{14}$ は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、 $n^4 \sim n^7$ は、同一又は異なって、0又は3以下の整数である。)

【0027】

上記において、好ましくは、 $R^7 \sim R^{15}$ は、炭素数3～4の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である。 $R^7 \sim R^{15}$ は、より好ましくは、アルキル基である。

【0028】

上記において、 $n^4 \sim n^7$ は、好ましくは、0又は2以下の整数であり、より好ましく

50

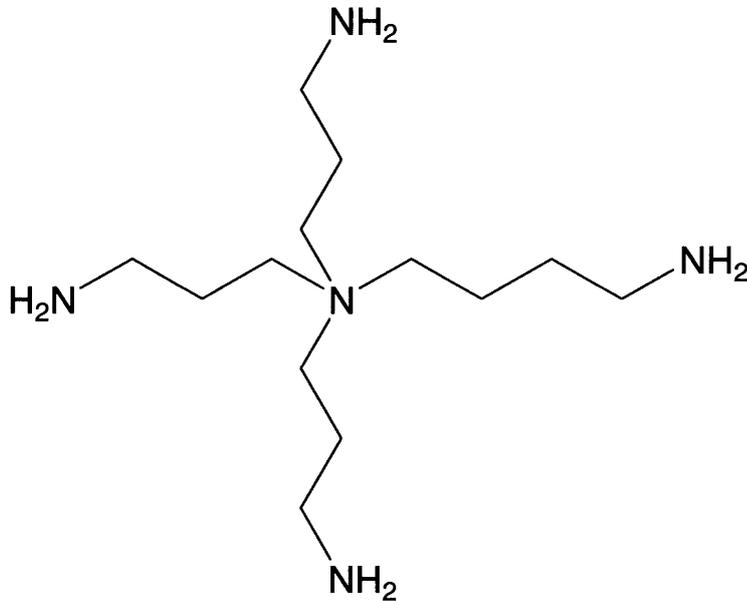
は、0又は1であり、さらに好ましくは、0である。

【0029】

特に限定されないが、好熱菌により産生されうる分岐鎖ポリアミンの代表例として、下記式(VI)で表わされるN<sup>4</sup>-ビス(アミノプロピル)スペルミジン等が挙げられる。

【0030】

【化8】



10

20

【0031】

## 2. 長鎖ポリアミン

本発明において、長鎖ポリアミンとは、好熱菌以外の生物が産生する直鎖ポリアミンと比べてより鎖長の長いものを意味する。本発明において、長鎖ポリアミンは、好熱菌により産生されうるものに限定されない。

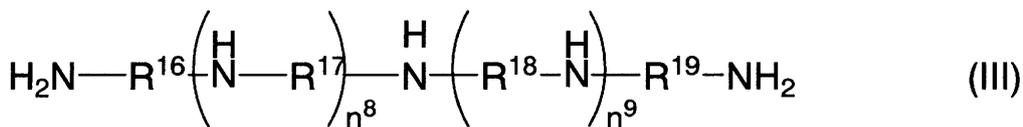
【0032】

特に限定されないが、長鎖ポリアミンの代表例として、下記式(III)で表わされる2級ポリアミンが挙げられる。

30

【0033】

【化9】



【0034】

(式中、R<sup>16</sup>~R<sup>19</sup>は、同一又は異なって、炭素数2~6の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基であり、かつR<sup>17</sup>及びR<sup>18</sup>は、それぞれ、繰り返し単位毎に同一であっても異なってもよく、n<sup>8</sup>及びn<sup>9</sup>は、同一又は異なって、3以下の整数である。)

40

【0035】

上記において、好ましくは、R<sup>16</sup>~R<sup>19</sup>は、炭素数3~4の、置換されていてもよい、アルキル基又はアルケニル基である。R<sup>16</sup>~R<sup>19</sup>は、より好ましくは、アルキル基である。

【0036】

上記において、n<sup>8</sup>及びn<sup>9</sup>は、好ましくは、0又は2以下の整数であり、より好ましくは、0又は1であり、さらに好ましくは、0である。

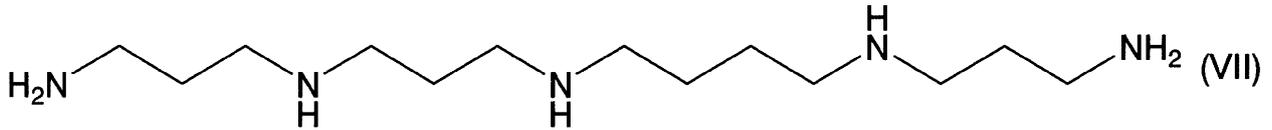
【0037】

50

特に限定されないが、好熱菌により産生されうる長鎖ポリアミンの代表例として、下記式(VII)で表わされるサーモペンタミン(Thermopentamine)、及び下記式(VIII)で表わされるカルドヘキサミン(Cardohexamine)等が挙げられる。

【0038】

【化10】



10

【0039】

【化11】



【0040】

これらの分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンは、第一級アミノ基(第一級アミンから水素を除去した1価の官能基(-NHR(Rは脂肪族炭化水素基を表わす)))の部分で比較的柔軟に折れ曲ることができる。これらの分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンは、第一級アミノ基の部分で折れ曲がった状態で、tRNAのloop構造の内部に入り込んで、tRNAを安定化することができると考えられる。この理論に束縛されないが、分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンとしては、tRNAのloop構造の大きさを考慮すると、第一級アミノ基で挟まれた脂肪族炭化水素基部分の鎖長が、炭素数3~4であればtRNA安定化能の点では好ましい。

20

【0041】

また、理論に束縛されないが、tRNA安定化能の点では、分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンは、アミノ基の数が多いほど塩基度がより高くなるので、より好ましい。

【0042】

分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンは、tRNA安定化能を通じて翻訳の高効率化を促し、ひいては成長促進能を発揮すると考えられる。

30

【0043】

## 2. 好熱菌

本発明において、分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンは、好熱菌により産生されうるものであってもよい。

【0044】

本発明において、好熱菌とは、至適生育温度が45以上、あるいは生育限界温度が55以上の微生物のことを意味する。

【0045】

好熱菌は、分岐鎖ポリアミン及び長鎖ポリアミンを産生するものであればよく、特に限定されない。好熱菌は、古細菌、真正細菌及び真核生物のいずれに属するものであってもよい。

40

【0046】

好熱菌は、特に限定されないが、好ましくは至適生育温度が80を超える超好熱菌である。

【0047】

超好熱菌としては、特に限定されないが、例えば、Thermococcus属、Pyrococcus属、Methanocaldococcus属、Archaeoglobus属、Methanococcus属、Thermotoga属、Aquifex属

50

及び *Thermoanaerobacter* 等に属するものが挙げられる。 *Thermococcus* 属に属するものとしては、特に限定されないが、 *Thermococcus kodakarensis*、 *Thermococcus profundus* 及び *Thermococcus litralis* 等が挙げられる。

【0048】

本発明では、超好熱菌ではない好熱菌も使用することができ、そのような好熱菌としては、特に限定されないが、例えば、 *Geobacillus* 属、 *Methanotorris* 属、 *Rhodothermus* 属、 *Thermus* 属、 *Ferroglobus* 属、 *Desulfurobacterium* 属、 *Thermovirga* 属、 *Caldicellulosiruptor* 属、 *Bacillus* 属、 *Rhodopseudomonas* 属及び *Clostridium* 属等に属するものが挙げられる。 *Thermus* 属に属するものとしては、特に限定されないが、例えば、 *Thermus thermophilus* 及び *Thermus aquaticus* 等が挙げられる。

10

【0049】

本発明の動植物用成長促進剤は、分岐鎖ポリアミン又は長鎖ポリアミンを産生する好熱菌又はその細胞抽出物を含有するものであってもよい。

【0050】

細胞抽出物としては、分岐鎖ポリアミン又は長鎖ポリアミンが含まれていればよく、特に限定されないが、超音波や界面活性剤で破碎する方法等によって抽出されたものを用いることができる。

20

【0051】

### 3. アミノアルキル基転移酵素・アミノアルケニル基転移酵素

分岐鎖ポリアミンを産生しない動植物であっても、それが元来有しているポリアミン生合成系に対して、外部からアミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素を導入することによって、分岐鎖ポリアミンを合成させることができる。したがって、本発明の動植物用成長促進剤は、アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素を有効成分として含有するものであってもよい。

【0052】

アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素の例として、例えば、スペルミジンに対してアミノプロピル基を付加する反応を触媒する *Thermococcus kodakarensis* 由来の TK1691 等を挙げることができる。TK1691 のオルソログは、好熱菌に幅広く見出される(図1)。さらに、TK1691 のオルソログには、*S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase* 様の領域が幅広く保存されている(図2)。

30

【0053】

TK1691 のアミノ酸配列を配列番号1に示す。また、それをコードする塩基配列を配列番号2に示す。

【0054】

本発明では、配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアミノプロピル基転移活性を有するタンパク質を使用することもできる。左記において、欠失、置換若しくは付加は、好ましくは、上述の *S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase* 様の領域とは異なる領域においてなされたものである。

40

【0055】

TK1691 を含む、*T. kodakarensis* のポリアミン生合成経路を図3に示す。

【0056】

本発明の動植物用成長促進剤は、アミノアルキル基転移酵素又はアミノアルケニル基転移酵素をコードする遺伝子、又は当該遺伝子を含有する発現ベクターを有効成分として含有するものであってもよい。

50

## 【0057】

発現ベクターとしては、特に限定されないが、適用対象に応じて適切なプロモーターの制御下に当該遺伝子を有するものを使用できる。

## 【0058】

長鎖ポリアミンを産生しない動植物であっても、それが元来有しているポリアミン生合成系に対して、外部から長鎖ポリアミン合成酵素を導入することによって、長鎖ポリアミンを合成させることができる。したがって、本発明の動植物用成長促進剤は、長鎖ポリアミン合成酵素を有効成分として含有するものであってもよい。

## 【0059】

## 4. 動植物用成長促進剤

本発明において、動植物には、動物及び植物が幅広く含まれる。なお、動物には、昆虫が含まれる。

## 【0060】

特に限定されないが、動物の具体例としては、いわゆる家畜動物全般、具体的には、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ラバ、ラクダ、ラマ、アジアゾウ、アルパカ、トナカイ（カリブー）、コブウシ、スイギュウ、ヤク、モルモット、ウサギ（ラビット）、ミンク、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、バリケン、ウズラ、ダチョウ、ドバト、キジ及びウミウ等；並びに魚類等が挙げられる。

## 【0061】

また、動物の別の具体例としては、いわゆる飼育昆虫全般、具体的には、ミツバチ、カイコ、カブトムシ及びクワガタムシ等；並びにイナゴその他の食用昆虫等が挙げられる。

## 【0062】

特に限定されないが、植物の具体例としては、キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ、サツマイモ、ジャガイモ、ダイコン、ニンジン、リンゴ、ナシ、ブドウ、モモ、イチゴ、ミカン、ヒノキ、スギ、マツ、バラ、サクラ、ウメ、イネ、ムギ、シイタケ及びエリンギ等が挙げられる。

## 【0063】

本発明の動植物用成長促進剤における上記した有効成分の含有割合は適宜設定できる。特に限定されないが、例えば、0.05～2重量%含有するものであってもよい。

## 【0064】

本発明の動植物用成長促進剤の剤形としては、特に限定されないが、液剤、噴霧剤、固形剤及び粉末剤等が挙げられる。上記した有効成分が必要な期間、持続的に放出されるような剤型としてもよい。

## 【0065】

本発明の動植物用成長促進剤は、必要に応じて、上記した有効成分に加えて、別の有効成分、あるいは他の添加剤（安定剤、賦形剤等）をさらに含んでもよい。

## 【実施例】

## 【0066】

以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

## 【0067】

## 1. 実施例：分岐鎖ポリアミンが線虫の体長に与える効果

## 1.1 遺伝子操作

一般的な遺伝子操作は、既報(Green and Sambrook)に準拠した。DNA断片のクローニングには大腸菌DH5<sup>+</sup>株を用い、50 μg ml<sup>-1</sup> アンピシリンを添加したLB培地で培養することで形質転換体を選抜した。プラスミドDNAの抽出には、Plasmid mini Kit (キアゲン社)を用いた。以下に記す遺伝子破壊ベクター構築の際に用いたプライマーは、*Thermococcus kodakarensis* KOD1株(Morikawa M., et al, Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60:4559-4566)のゲノムデータ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=69014>)を基に設計した。DNAポリメラーゼは、KOD plus (東洋紡)を用いた。制限酵素お

10

20

30

40

50

よびその他核酸修飾酵素は、タカラバイオ社およびニッポンジーン社より購入した。DNAシーケンシングは、BigDye Terminator Cycle Sequencing kit, ver. 3.1および3130ジェネティックアナライザー(共にアプライド・バイオシステムズ社)を用いた。

【0068】

#### 1.2 Tk1691遺伝子発現ベクターの構築

T. kodakarensis KOD1株(野生株)のゲノムDNAを抽出した後、これを鋳型として、Tk1691の遺伝子領域を、それぞれTk1691-Fw (5' - AAAAAAACATATGATGAGGGAGATAAATTGAGAG -3 (配列番号3) ' ; 下線, NdeI 認識サイト)-Tk1691-Rv(5' - AGAATTCTCAGGTAGTCGAGCTCTCTCT -3' (配列番号4) ; 下線, EcoRI 認識サイト)のプライマーペアを用いてPCR増幅した。得られたDNA断片を制限酵素で消化し、pET21a (ノバジェン社)の該当位置にクローニングしたものをTk1691発現ベクター(pET21a-Tk1691)とした。

10

【0069】

#### 1.3 Tk1691を発現する大腸菌のポリアミン分析

pET21a-Tk1691を大腸菌BL21(DE3)codonplus-RIL株(アジレントテクノロジー社)にTSS法(Chung C.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86:2172-2175)にて導入した。pET21a-Tk1691を有する大腸菌BL21(DE3)codonplus株(以下、BL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a-Tk1691)をLB液体培地で37 °C、12時間培養した後、50 µg ml<sup>-1</sup>のアンピシリンと1 mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含む5 mlのM9培地に接種し、37 °Cで12時間培養した。培養液から菌体を6000 rpm、10分間の遠心分離により回収し、トリクロロ酢酸沈殿により粗ポリアミン画分を得た。高速液体クロマトグラフィー(CCPM, 東ソー社)により菌体内に存在する分岐鎖ポリアミン(ビスアミノプロピルスペルミジン, [3(3)4]の生成量を解析した。カラムは、CK-10S (6.0 mm × 50 mm) (GLサイエンス社)を用いた。100 mM クエン酸カリウム, 2.0 M 塩化カリウム, 650 mM 2-プロパノール, 2.4 mM ポリエチレンラウリルエーテル, 0.195 N HClの組成の展開溶媒で流速1.0 mL min<sup>-1</sup>でポリアミンを分画した。分画液を流速0.5 mL min<sup>-1</sup>の400 mM ホウ酸、400 mM 塩化ナトリウム、4.9 mM ポリエチレンラウリルエーテル, 7.5 mM O-フタルアルデヒド, 171 mM エタノール, 28 mM 2-メルカプトエタノールの組成の反応溶媒と反応させ、蛍光検出器(GL-7453A, GLサイエンス社)で励起波長 325 nm, 蛍光波長 450 nmで誘導体化したポリアミンを検出した。分岐鎖ポリアミンを産出しない株としてpET21aで形質転換した大腸菌BL21(DE3)codonplus-RIL株(以下、BL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a)を同様の方法で培養し、同様の方法で粗ポリアミンの抽出を行い、抽出液のビスアミノプロピルスペルミジンの解析を行った。

20

30

【0070】

#### 1.4 Tk1691を発現する大腸菌を食餌とする線虫の体長と咽喉の測定

大腸菌BL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a及びBL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a-Tk1691を50 µg ml<sup>-1</sup>のアンピシリンを含む5 mlのLB液体培地に37 °Cで12時間前培養した。50 µg ml<sup>-1</sup>のアンピシリンと1 mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含む200 mlのM9培地に接種し、37 °Cで12時間培養した。培養液を6000 rpm、10分間の遠心分離により集菌後、0.8% (wt/v) NaCl水で2回洗浄した。次に、100 µlの0.8% (wt/v) NaCl水に大腸菌を懸濁し、M9固形培地に菌液100 µlを添加し、42 °Cで12時間培養した。菌液を塗布したM9固形培地に卵を持つ成虫を5匹ずつ載せ20 °Cで3日間飼育した。13匹の成虫(young adult)をM9液体培地で溶解した2% Sodium Azide(シグマ社)により筋肉を弛緩させ、顕微鏡倍率10×10で写真撮影し、体長と咽喉の長さを測定した。体長の測定にはImageJ(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いた。独立した体長測定実験を三回行った。また、独立した咽喉長測定実験を二回行った。

40

【0071】

#### 1.5. 結果

M9液体培地で生育したBL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21aのポリアミン分析でスペルミジンは生成していた一方で、ビスアミノプロピルスペルミジンは生成しなかった。他方、M9液体培地で生育したBL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a-Tk1691におけるポリアミン分析

50

では、ビスアミノプロピルスペルミジンは生成した(図4)。M9寒天培地でBL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a またはBL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a-Tk1691を食餌とした線虫の体長と咽喉の長さを測定したところ、BL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a-Tk1691を食餌とした線虫で有意に体長が伸長することが判った(図5)。しかしながら、咽喉の長さは、BL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21a-Tk1691とBL21(DE3)codonplus-RIL株/pET21aを食餌にした線虫で変化がなかった(図6)。これは、咽喉以外の組織の伸長がビスアミノプロピルスペルミジンにより促されたことを示している。

#### 【0072】

### 2. 実施例：超好熱菌*T. kodakarensis*の抽出物がカブトムシの幼虫の成長に与える影響

#### 2. 1. *T. kodakarensis*無細胞抽出液の調製とカブトムシ幼虫への投与

*T. kodakarensis* KOD1株(Morikawa M., et al, Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60:4559-4566)はビスアミノプロピルスペルミジンを生成する。*T. kodakarensis* KOD1株を1.5 LのASW-YT-Pyruvate培地[1.25倍希釈した人工海水(0.8 × ASW)(Robb and Place 1995), 5 g l<sup>-1</sup>酵母エキス(ナカライテスク社), 5 g l<sup>-1</sup>ポリペプトン(ナカライテスク社), 5 g l<sup>-1</sup>ピルビン酸]で60℃で48時間培養した。ビスアミノプロピルスペルミジンを生成しない*Bacillus subtilis* 168trpC株をLB培地で37℃、12時間培養した。それぞれの培養液を6000 rpm, 10分間の遠心分離により集菌後、*T. kodakarensis* KOD1株は0.8 × ASWで、*Bacillus subtilis* 168trpC株を0.8% (wt/v) NaCl水で2回、懸濁、6000 rpm, 10分間の遠心を繰り返すことで洗浄した。湿重量0.6 gのそれぞれの菌体を200 mlの超純水に懸濁し、超音波破砕機(Sonifier 25, ブランソン社)で十分に菌体を破砕した。200 mlの超純水または各菌体破砕液を200 gの乾燥おが屑と混合した。体長、体重がほぼ同等の24匹の1齢幼虫のカブトムシを8匹に分け、それを一群として、それぞれの菌体破砕液を混合したおが屑に一群の幼虫を投入した。室温で一ヶ月静置した後、幼虫の体重を測定した。

#### 【0073】

#### 2. 2. 結果

60℃で生育させた*T. kodakarensis* KOD1株の抽出液を含むおが屑で生育したカブトムシ幼虫は、*Bacillus subtilis* 168trpC株もしくは超純水を含むおが屑で生育したカブトムシ幼虫よりも、体長、体重が著しく増加することが判った(図7)。

### 3. 実施例：分岐鎖ポリアミンが与える超好熱菌*T. kodakarensis*の無細胞翻訳系活性化効果

#### 3. 1. 超好熱菌*T. kodakarensis*のS30画分の調製

キチナーゼ活性を欠損した*T. kodakarensis* KC1株(Endoh et al., J. Biotechnol., 2006, 126:186-195)を6 LのASW-YT-Pyruvate培地[1.25倍希釈した人工海水(0.8 × ASW)(Robb and Place 1995), 5 g l<sup>-1</sup>酵母エキス(ナカライテスク社), 5 g l<sup>-1</sup>ポリペプトン(ナカライテスク社), 5 g l<sup>-1</sup>ピルビン酸]で60℃で48時間培養した。培養液を遠心分離により集菌後、0.8 × ASWで2回、懸濁、遠心を繰り返すことで洗浄した。菌体をS30 protease inhibitorバッファー(10 mM トリス-酢酸 pH7.4, 1 mM ジチオスレイトール, 1.4 mM 酢酸マグネシウム, 6.0 mM 酢酸カリウム, protease inhibitor (Roch社) 1錠/10 ml)で懸濁した。この細胞懸濁液をホモジナイザー(EmulsiFlex C-5, AVESTIN社)を用いて、7,500 psi、1分間破砕した。得られた細胞破砕液を30,000 × g, 4℃, 30分間遠心した。上清を再度30,000 × g, 4℃, 30分間遠心した。上清を回収し、サイズ排除限界が6-8 kDaの透析膜(に入れて、上清の100倍量のS30 バッファー(10 mM トリス-酢酸 pH7.4, 1 mM ジチオスレイトール, 1.4 mM 酢酸マグネシウム, 6.0 mM 酢酸カリウム)で45分間透析を行った。透析操作をさらに2回繰り返し行い、上清液をS30 バッファーで100万倍希釈した。その後、4,000 × g, 4℃, 10分間遠心し、S30画分を得た。

#### 【0074】

#### 3. 2. 超好熱菌*T. kodakarensis*由来*chiA* 4 mRNAの調製

*T. kodakarensis*由来キチナーゼをコードする*chiA* 4遺伝子の領域をもつプラスミドpT

10

20

30

40

50

RC1 (Endoh et al., J. Biotechnol., 2006, 126:186-195) を用い、T7 RiboMax (登録商標) Express RNA system (プロメガ社) でキチナーゼをコードする mRNA を調製した。

【0075】

### 3.3 超好熱菌 *T. kodakarensis* の S30 画分を用いた無細胞翻訳系とキチナーゼの活性測定

無細胞翻訳反応は、11 mM 酢酸マグネシウム、2 mM ジチオスレイトール、80 mM 酢酸アンモニウム、275 mM 酢酸カリウム、1.5 mM グアノシン三リン酸、1.5 mM シチジン三リン酸、1.5 mM ウリジン三リン酸、10 mM ホスホエノールピルビン酸、45 mM ビシン (pH 8.5)、3 mM アデノシン三リン酸、2 mM L-グリシン、2 mM L-システイン、2 mM L-グルタミン酸、2 mM L-アルギニン、2 mM L-プロリン、2 mM L-アスパラギン、2 mM L-ヒスチジン、2 mM L-イソロイシン、2 mM L-ロイシン、2 mM L-リジン、2 mM L-スレオニン、2 mM L-チロシン、2 mM L-アラニン、2 mM L-メチオニン、2 mM L-フェニルアラニン、2 mM L-セリン、2 mM L-トリプトファン、2 mM L-アスパラギン酸、2 mM L-グルタミン、2 mM L-バリン、4% (v/v) RNAsecure (登録商標) (ライフテクノロジー社)、2% (v/v) ポリエチレングリコール、0.3 mg/ml ChiA mRNA、6.5 mg/ml S30 画分、0.2 mM 各ポリアミンの組成で全量 30  $\mu$ l で行った。ポリアミン非添加を無細胞翻訳反応の対照実験とした。無細胞翻訳反応に添加したポリアミンはそれぞれ、1,3-プロパンジアミン [3]、1,4-ブタンジアミン [4]、 $N^1$ -(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミン [34]、 $N^1,N^1$ -ビス(2-アミノエチル)エタン-1,2-ジアミン [2(2)2]、 $N^1,N^1$ -ビス(2-アミノプロピル)プロパン-1,2-ジアミン [3(3)3]、 $N,N^1$ -ビス(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミン [343]、 $N^1$ -(3-アミノプロピル)- $N^3$ -(3-(3-アミノプロピルアミノ)プロピル)プロパン-1,3-ジアミン [3333]、 $N^1$ -(3-(3-アミノプロピルアミノ)プロピル)ブタン-1,4-ジアミン [334]、1,3-ビス[3-(3-アミノプロピルアミノ)プロピルアミノ]プロパン [33333]、 $N^1,N^1$ -ビス(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミン [3(3)4]、 $N^1$ -(3-アミノプロピル)- $N^1$ -(3-(3-アミノプロピルアミノ)プロピル)ブタン-1,4-ジアミン [3(4)33]、 $N^1$ -(3-アミノプロピル)- $N^4$ -(3-(3-アミノプロピルアミノ)プロピル)ブタン-1,4-ジアミン [3343]、 $N^1,N^1,N^4$ -トリス(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミン [3(3)43]、 $N^1$ -(3-(3-(3-アミノプロピルアミノ)プロピルアミノ)プロピル)ブタン-1,4-ジアミン [3334]、4-アミノ-N,N,N-トリス(3-アミノプロピル)ブタン-1-アミニウム [ビスアミノプロピルスぺルミジン] [3(3)(3)4]、4-アミノ-N-(4-アミノブチル)-N,N-ビス(3-アミノプロピル)ブタン-1-アミニウム [3(3)(4)4] を使用した (鍵括弧内の数字はアミノ基を介した炭素鎖の数を表す、また鍵括弧内の丸括弧内の数字は、アミノ基を介して分岐した炭素鎖の数を表す)。これら組成の無細胞翻訳反応液を 80 で 1 時間反応させ、4 に冷却して反応停止させた。無細胞翻訳反応終了後の 3  $\mu$ l の無細胞翻訳反応液に 33 mM 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N'-diacetyl chitobioside (シグマ社) となるよう加えて、90 , 30分、キチナーゼ反応させた。50 mM Glycine (pH 11.0) となるようキチナーゼ反応液に添加し、キチナーゼ反応を停止させた。その後、4 , 13,200rpm、5分間遠心し、上清 200  $\mu$ l を 96穴蛍光プレート (パーキエルマー社) に分注した。蛍光プレートリーダー (ARVOMx/Light, 1420 Multilabel / Luminescence Counter, パーキンエルマー ジャパン社) にて励起波長 365 nm、検出波長 455 nm で、キチナーゼ反応で生じた化合物の蛍光を測定した。

【0076】

### 3.4. 結果

80 での無細胞翻訳反応において、ポリアミンを添加していない系に比べて、3(3)3や343以上の価数を有するポリアミンは翻訳の活性化効果を有することが判った。一方で、スペルミジンやプトレスシンは翻訳を阻害した。また、分岐したアミノプロピル基の数が増加するのに伴って、翻訳の活性化効果がみられた (図 8 ; without polyamine の翻訳活性を 1 とした)。

【配列表フリーテキスト】

【0077】

配列番号 3 Tk1691-Fw primer

10

20

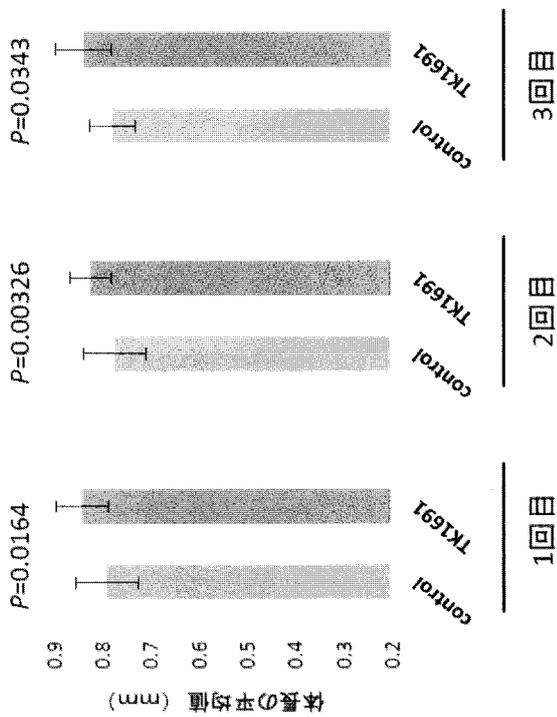
30

40

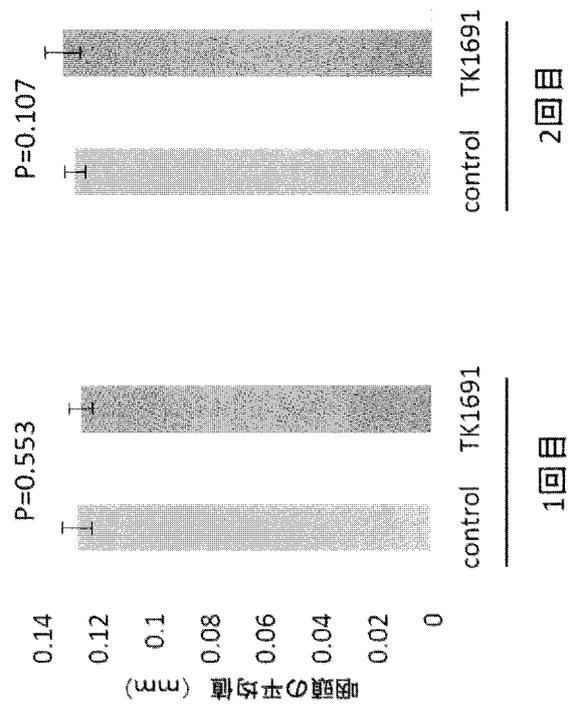
50

配列番号 4 Tk1691-Rv primer

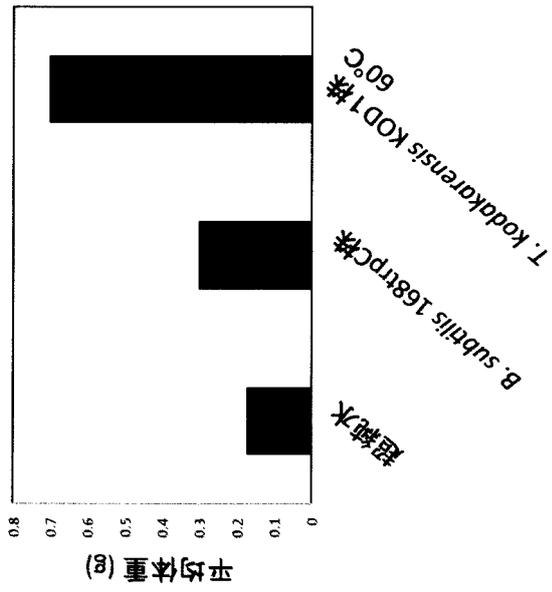
【 図 5 】



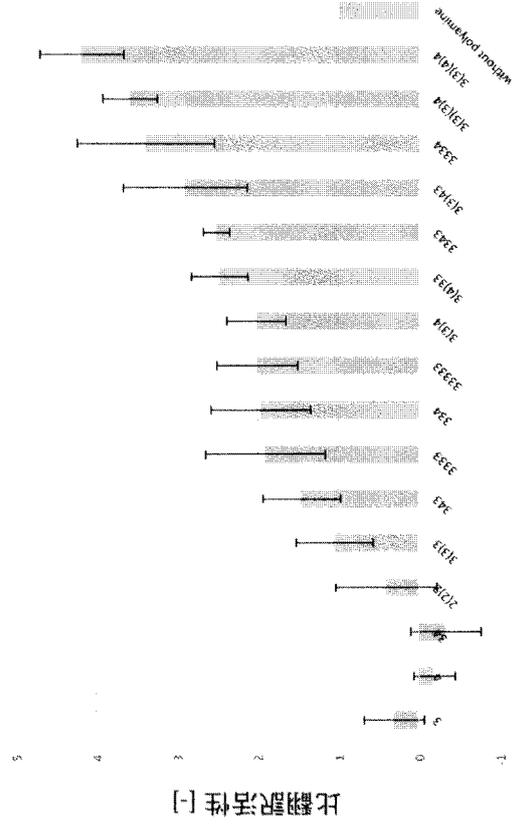
【 図 6 】



【 図 7 】

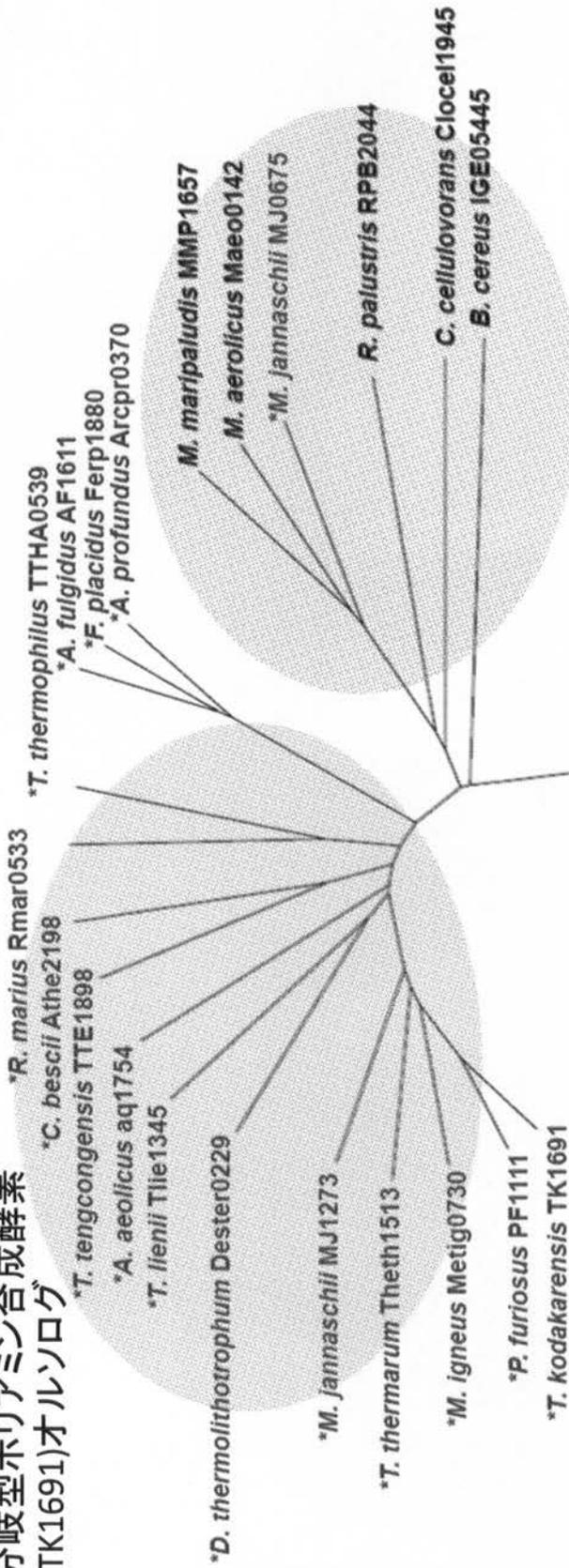


【 図 8 】

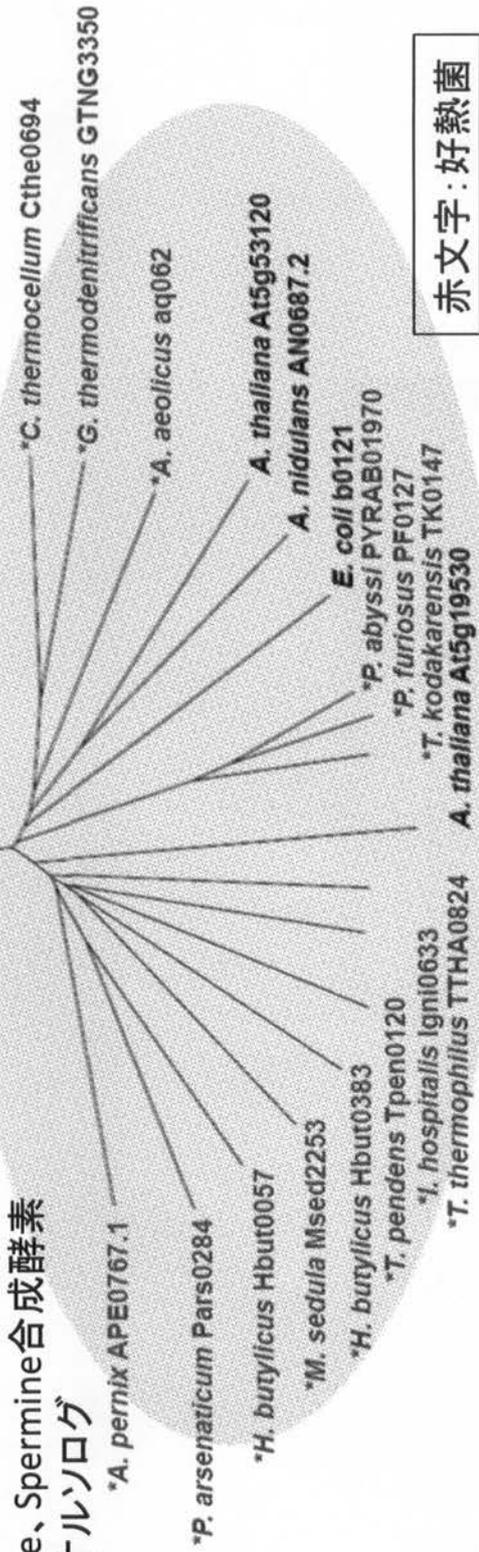


【 図 1 】

分岐型ポリアミン合成酵素  
(TK1691)オルソログ



Spermidine、Spermine合成酵素  
(TK0147)オルソログ



赤文字：好熱菌

```

Query 1 MREIIEERVKKTIPVYERTIENYLSAIOASGDVWRIVDLSEEPFLPVVAVVTALYELGY 60
      M+EI+ERVK KT IPVYER++ENVLSA+ AS D+WRIVDLSEEPFLPVVA++ +L ELGY
Sbjct 1 MKEIVERVKTKKIPVYERSVENVLSAVLASDDIWRIVDLSEEPFLPVVAILESLNELGY 60

Query 61 VAFENNQVILTRKKGELVEKYGIGPRADYTCSHCQGRTEIDAFSELLEQFKEITRDRPE 120
      V FE+ V LT KG+ELV +YGIG R D+TC HCQG+TV++ AF++LLEQF+EI +DRPE
Sbjct 61 VTFEDG-VKLTEKGEELVAEYIGIRYDFTCPHCQCKTVDLQAFADLLEQFREIVKDRPE 119

Query 121 PAHQFDQAYVTPETTVARVALMHSRGDLENKEVHVLGDDDLTSAIMLSGLPKRIAVLDI 180
      P H+FDQAYVTPETTVARV LMH+RGDLENK++HVLGDDDLTSAIMLSGLPKRIAVLDI
Sbjct 120 FLHFDQAYVTPETTVARVILMHTRGDLENKDIHVLGDDDLTSAIMLSGLPKRIAVLDI 179

Query 161 DERLTKFIEKAADEIGYENIEIFTFDLRKPLPDYALHKFDTFITDPPETVEAIRAFVGRG 240
      DERLTKFIEKAA+EI GYE+IEIFTFDLRKPLPDYALHKFDTFITDPPET+EAIRAFVGRG
Sbjct 180 DERLTKFIEKAAANEIGYEDIEIFTFDLRKPLPDYALHKFDTFITDPPETLEAIRAFVGRG 239

Query 241 IATLKGPGCAGYFGITRRESSLDKWRREIQRVLLNEFGVVIITDIIRNFNEYVNWGYVEETR 300
      IATLKG P CAGYFGITRRESSLDKWRREIQ++LLNEF VVITDIIRNFNEYVNWGY EETR
Sbjct 240 IATLKGPRCAGYFGITRRESSLDKWRREIQKLLNEFNVVITDIIRNFNEYVNWGYAEETR 299

Query 301 AWRLLPIKVKPSYVWYKSYMFRICQTLGSKGFEDEITVQELYDDEESSTT 351
      AW+L+PIK P YNWYKSYMFRI+TLEGS+G+EDEI +++Y+DEESSTT
Sbjct 300 AWKLLPIKLLPEYNWYKSYMFRIETLEGSRGYEDEIP-EEDIYNDEESSTT 349

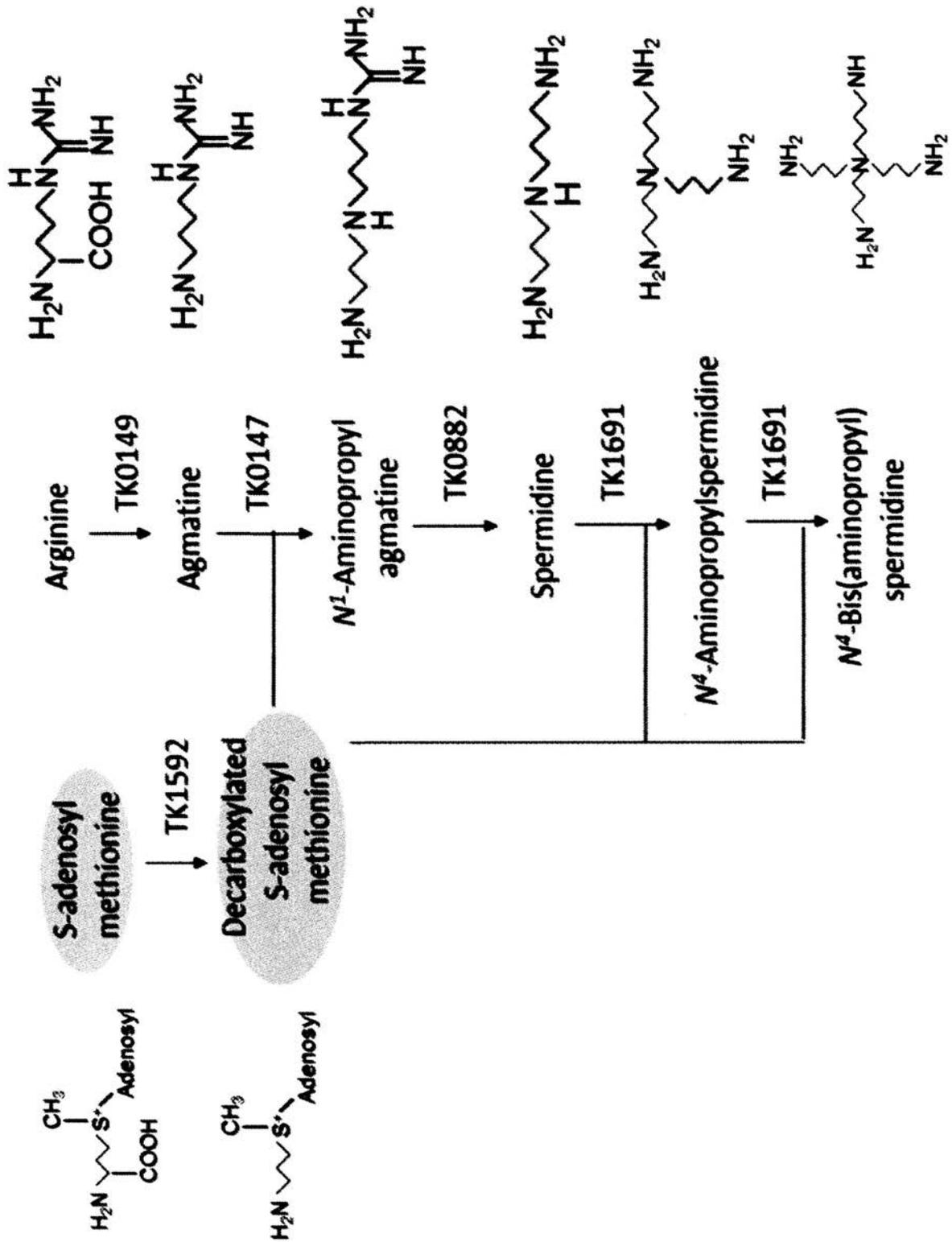
```



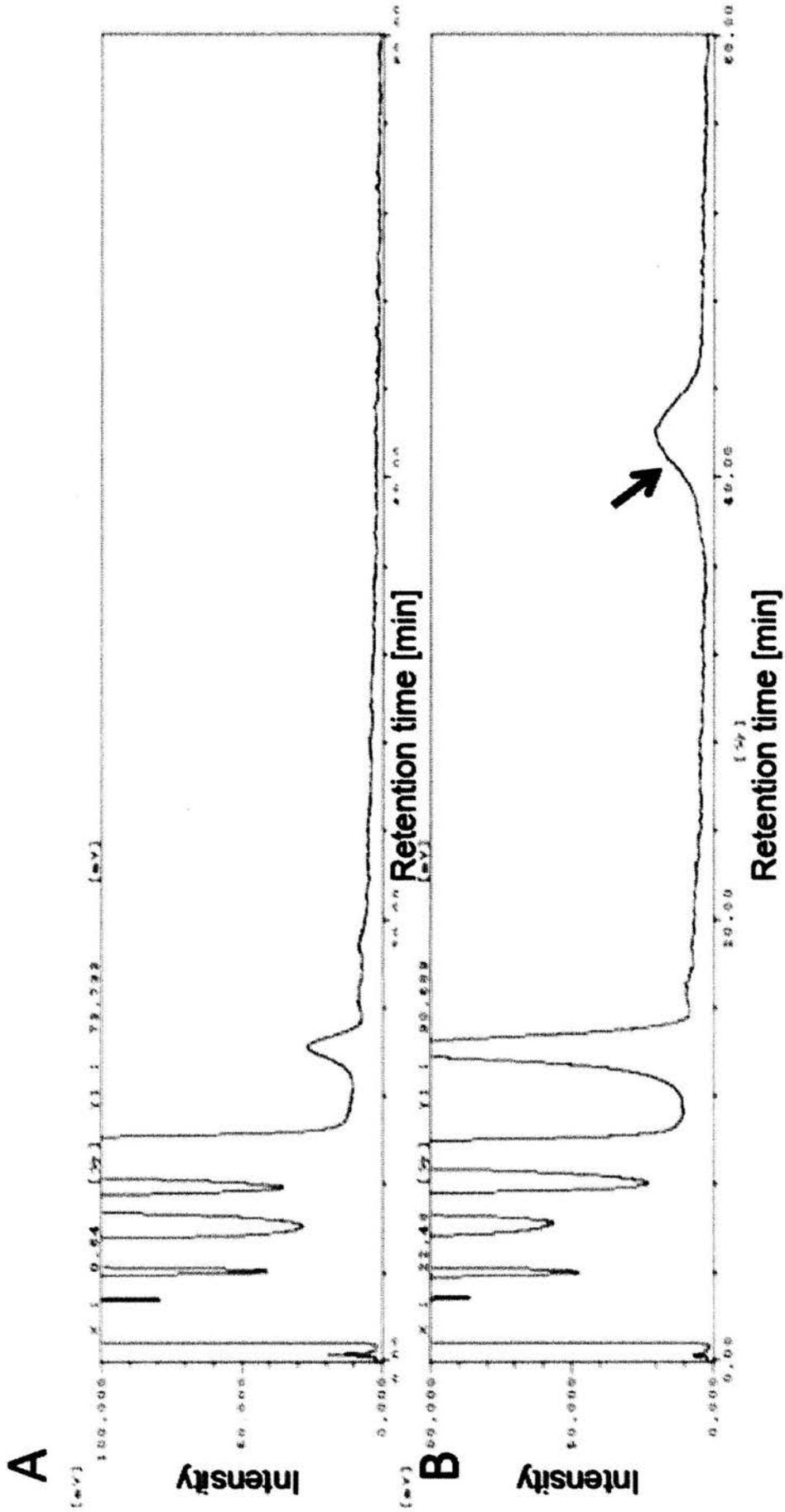
TK1691の予測構造

上:TK1691アミノ酸配列(*Thermococcus kodakarensis*)  
 下:PF1111アミノ酸配列(*Pyrococcus furiosus*)

【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2015081252000001.app

---

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 3/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/02	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 K 38/45 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/52	4 H 0 1 1
<b>A 6 1 K 35/74 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/74	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 2 3 K 1/16	3 0 4 B
	C 1 2 N 15/00	A

Fターム(参考) 4C084 AA02 DC25 NA14 ZC01  
 4C087 AA02 BB63 BC30 NA14 ZC01  
 4C206 AA01 FA02 MA01 MA04 NA14 ZC21 ZC61  
 4H011 AB03 BB04 DA13