

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3777422号  
(P3777422)

(45) 発行日 平成18年5月24日(2006.5.24)

(24) 登録日 平成18年3月10日(2006.3.10)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 1 2 N 9/06	B

請求項の数 8 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2002-256264 (P2002-256264)	(73) 特許権者 504155293 国立大学法人島根大学 島根県松江市西川津町1060
(22) 出願日 平成14年9月2日(2002.9.2)	(74) 代理人 100116861 弁理士 田邊 義博
(65) 公開番号 特開2004-89097 (P2004-89097A)	(72) 発明者 澤 嘉弘 島根県松江市下東川津町266-13
(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)	(72) 発明者 柴田 均 島根県松江市古志原6丁目22-54
審査請求日 平成15年12月18日(2003.12.18)	(72) 発明者 石川 孝博 島根県松江市西川津町694-1 合同宿舎西川津住宅4-2 04号
特許法第30条第1項適用 日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会講演要旨集(平成14年3月5日) 社団法人日本農芸化学会発行第136ページに発表	最終頁に続く
特許法第30条第1項適用 平成14年3月26日東北学院大学教養学部泉キャンパスにおいて開催された日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会(講演番号3-4Cp01)で発表	

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(A)又は(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型yweBに比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項2】

下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型yweBに比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項3】

下記(C)又は(D)に示すタンパク質。

(C) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、先頭から27番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からな

り、かつ、野生型 y w e B に比して 7 以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 4】

下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 27 番目のアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型 y w e B に比して 7 以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 5】

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質。

(E) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目と 27 番目の 2 つのアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型 y w e B に比して 7 以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 6】

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、先頭から 144 番目と 27 番目の 2 つのアミノ酸以外の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型 y w e B に比して 7 以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

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

【請求項 8】

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

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

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

【0002】

【従来の技術】

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

【0003】

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

【0004】

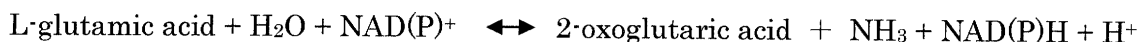
【式 1】

10

20

30

40



・・・(式1)

なお、式1では、NAD(P)を、NAD(ニコチンアミド - アデニンジヌクレオチド)とNADP(ニコチンアミド - アデニンジヌクレオチドリン酸)をまとめた表現として示している。これは、GluDHの補酵素要求性の違いによるものである。すなわち、GluDHは3種類の型があり、第一に、NADを特異的に要求する酵素で動物組織、植物、細菌に分布するもの(NAD-GluDH: EC1.4.1.2)、第二に、NADPを特異的に要求する酵素で酵母、細菌に存在するもの(NADP-GluDH: EC1.4.1.4)、第三に、NAD,NADPのどちらも補酵素とすることができる酵素で動物の肝、腎などのミトコンドリアに局在するもの(NAD(P)-GluDH: EC1.4.1.3)が知られている。

10

【0005】

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

【0006】

同様に、グルタミン酸を含んだ反応系を触媒するGluDHとして、特開平6-38744「新規な耐熱性グルタミン酸脱水素酵素及びその製造方法」に開示されるものが知られていた。この公報では、*Bacillus acidocaldarius* GluDHが開示され、こちらも極めて高い耐熱性を備えることが報告されている。

20

【0007】

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

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

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

30

【0009】

しかしながら、特開平6-32741号公報に開示される*Thermococcus litoralis*は、生育温度が88と極めて高温で、しかも嫌気環境を必要とするため、培養に特殊な装置が必要となり、大量に調製するのは困難であるという問題点があった。さらに、*Thermococcus litoralis* GluDHは、NADP型であるという問題点もある。

【0010】

一方、特開平6-38744号公報に開示される*Bacillus acidocaldarius* GluDHはNAD型であるものの、*Bacillus acidocaldarius*の最適培養温度が55であり、必ずしも簡便には培養できないという問題点があった。しかも、*Bacillus acidocaldarius* GluDHは、常温下での培養環境や試験環境で活性が低いという問題点があった。

40

【0011】

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

【0012】

【課題を解決するための手段】

50

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意検討を行った結果、定方向進化(directed evolution)に基づく戦略を用い、*Bacillus subtilis* (バチルス ズブチルス：枯草菌)由来のグルタミン酸脱水素酵素 (GluDH) *yweB*の一部のアミノ酸残基を変異させることにより本発明を完成するに至った。なお、*yweB*は*rocG*または*ipa-75D*とも表現されるが、本願においては*yweB*と表記することとする。

【0013】

すなわち本発明は以下のとおりである。

1. :

下記(A)又は(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型*yweB*に比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から144番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号3の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基の位置が144番目からシフトしたとしてもこのアルギニン残基は残存させておくことを意味する。

10

【0014】

2. :

下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型*yweB*に比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から144番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号3の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基の位置が144番目からシフトしたとしてもこのアルギニン残基は残存させておくことを意味する。

20

30

【0015】

3. :

下記(C)又は(D)に示すタンパク質。

(C) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、先頭から27番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型*yweB*に比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から27番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号4の先頭から数えて27番目に位置するフェニルアラニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このフェニルアラニン残基の位置が27番目からシフトしたとしてもこのフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

40

【0016】

4. :

下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、先頭から27番目のアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型*yweB*に比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から27番目以外のアミノ酸を置換等するとは、配

50

列番号4の先頭から数えて27番目に位置するフェニルアラニンを据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このフェニルアラニン残基の位置が27番目からシフトしたとしてもこのフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

【0017】

5.:

下記(E)又は(F)に示すタンパク質。

(E)配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F)配列番号5に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目と27番目の2つのアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型yweBに比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から144番目と27番目の2つのアミノ酸以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号5の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンと27番目に位置するフェニルアラニンを共に据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基とフェニルアラニン残基の位置がそれぞれ個別にシフトしたとしてもこのアルギニン残基とフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

10

【0018】

6.:

下記(E)又は(F)に示すタンパク質をコードするDNA。

(E)配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F)配列番号5に記載のアミノ酸配列において、先頭から144番目と27番目の2つのアミノ酸以外の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、野生型yweBに比して7以上の耐熱性を備えたグルタミン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。ここで、先頭から144番目と27番目の2つのアミノ酸以外のアミノ酸を置換等するとは、配列番号5の先頭から数えて144番目に位置するアルギニンと27番目に位置するフェニルアラニンを共に据え置き、他のアミノ酸配列を置換等することを意味する。したがって、例えば欠失、付加により、このアルギニン残基とフェニルアラニン残基の位置がそれぞれ個別にシフトしたとしてもこのアルギニン残基とフェニルアラニン残基は残存させておくことを意味する。

20

30

【0019】

7.:

上記2.4.または6.に記載のDNAによりコードされるタンパク質が発現可能な形態で導入された微生物。

【0020】

8.:

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

【0026】

なお、本発明では、耐熱性を有するとは、変異させる前、則ち野生型(WT)の*Bacillus subtilis*由来GluDH(yweB)に比して失活温度 $T_m$ が上昇していることをいう。また、以降では*Bacillus subtilis*由来GluDH(yweB)を単にyweBとのみ表記する場合がある。

40

【0027】

【発明の実施の形態】

【0028】

以下、本発明の実施の形態を説明するが、本発明は記載した形態のみに限定されるものではなく、本明細書の記載および当分野で公知の技術に基づいて当業者が容易に修飾および改変し得る技術については本発明の範囲内に含まれるものである。なお、本明細書において、定方向進化とは、変異導入、選択、選択した変異体の増幅と、その変異体への更

50

なる変異導入を繰り返し行うことにより、目的とする機能を向上させる手法をいう。

【0029】

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

10

【0030】

〔*Bacillus subtilis*由来GluDH遺伝子のクローニング：染色体DNAの調製〕

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

【0031】

〔*Bacillus subtilis*由来GluDH遺伝子のクローニング：PCRによるGluDH遺伝子の増幅〕

次に、目的遺伝子(yweB, ypcA)の塩基配列情報(EMBL Z99123, EMBL L47648)に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いてyweBおよびypcAを含むDNA断片の増幅を行った。yweBとypcAは共に、*Bacillus subtilis*由来のGluDHである。

20

【0032】

センスプライマーは図1に示す要領でデザインした。センスプライマー(配列番号6、7参照)の5'末端にはBamHIサイトを、アンチセンスプライマー(配列番号8、9参照)にはPst Iサイトをつけてデザインした。

【0033】

図2に、実験に用いたPCR反応液の成分構成を示す。また、図3に、PCRサーマルサイクラー条件を示す。なお、実験では、Takara DNA Thermal CyclerのPCR装置を用いた。

【0034】

〔*Bacillus subtilis*由来GluDH遺伝子のクローニング：形質転換大腸菌の作製〕以上の手段ないし工程により、CTAB法によるゲノムDNAの調製を行い、PCRにより増幅させたyweB、ypcAを得た。得られたPCR増幅産物(yweB, ypcA共に約1.4kb)をアガロースゲル電気泳動で分離した後、そのバンドを切り出し、GENE CLEAN II(フナコシ社製)により精製した。これらのDNA断片は、それぞれpUC18ベクター(タカラ酒造社製)のBamHIおよびPst Iサイトにライゲーションし組み換えDNAを得た。得られた組み換えDNAを大腸菌(*E. coli*) MV 1184コンピテントセル(日本ジーン社製)に導入し形質転換した。形質転換株はLBプレート(アンピシリン、X-Gal、IPTG含有)上でホワイトコロニーを形成することで選択した。この形質転換株からアルカリ-SDS法によりプラスミドDNAを調製し、一部をBamHIとPst Iで制限酵素処理し、電気泳動によりインサートDNAを確認した。これらの形質転換体の保持していたプラスミドを、yweB形質転換体についてはpYWE、ypcAについてはpYPCと命名した。yweB形質転換株については、SDS-PAGEでタンパク発現が確認でき、GluDH活性も確認された。ypcA形質転換株についてはSDS-PAGEでの発現確認はできたが、GluDH活性は全く検出されなかった。

30

40

【0035】

〔GluDHの活性測定〕

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

50

rotein) と表した。

【 0 0 3 6 】

活性の評価式を式 2 に示す。

【 式 2 】

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

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

【 0 0 3 7 】

〔 Bacillus subtilis 由来 GluDH ( yweB ) の精製 〕

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

【 0 0 3 8 】

〔 Bacillus subtilis 由来 GluDH ( yweB ) の性質 〕

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

【 0 0 3 9 】

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

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

【 0 0 4 0 】

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

【 0 0 4 1 】

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

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

【 0 0 4 2 】

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

## 【 0 0 4 3 】

〔Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の性質：最適pH の測定〕  
 本酵素の最適pH を、アミノ化、脱アミノ反応のそれぞれで活性測定を行うことにより決定した。Buffer は、pH 6.3~7.6 でKP Buffer、pH 7.0~8.8 でTris-HCl Buffer、pH 8.8~9.6 でCarbonate Buffer を使用した。図 1 0 に示したように、yweBの最適pH はアミノ化反応ではpH 7.3 付近、脱アミノ反応ではpH 7.7 付近であった。

## 【 0 0 4 4 】

〔Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の性質：反応速度論的解析〕  
 本酵素について、Kinetic Parameter の解析を行った。具体的には、kcatと Kmを求めた。また、kcat 値は、酵素の代謝回転数 (turn number)または触媒定数と呼ばれ、酵素の活性部位が単位時間 (通常 1 秒) ごとに触媒する反応回数 (回転数) を表す。 10

## 【 0 0 4 5 】

kcatと比活性と酵素の分子量の関係は式 3 で与えられる。

## 【 式 3 】

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

なお、kcat / Km 値は見かけの二次反応速度定数であり、遊離の酸素と基質との間の反応性を示すため、酸素の触媒効率を表す指標となる。 20

## 【 0 0 4 6 】

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

## 【 0 0 4 7 】

〔Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の性質：基質特異性〕 30  
 本酵素の基質特異性は、様々な補酵素、アミノ酸、ケト酸を指定濃度になるように加えて行った。反応はそれぞれのアミノ化、脱アミノ反応で行った。図 1 2 に示したように、本酵素はNADH およびNAD<sup>+</sup>を補酵素とし、2-オキソグルタル酸とL-グルタミン酸に対して高い特異性を示すことが確認された。

## 【 0 0 4 8 】

〔Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の性質：耐熱性の検討〕  
 酵素を各温度で20 分間熱処理した後、アミノ化反応における残存活性を熱未処理の活性を100 としたときの相対活性として示した。また各酵素を様々な温度で20 minの熱処理後、50 %の残存活性を示す温度を失活温度Tm 値 (Melting Temperature) として求めた。また、NADH を0.4 mM 加えて同様の処理を行い各酵素の残存活性を求めた。タンパク質濃度による保護効果の耐熱性への影響に考慮し、タンパク質濃度をほぼ等しくして実験を行った。図 1 3 に示したように、30 付近より失活が認められた。50%の失活温度 (Tm) は41 40  
 であった。NADH 添加においても大幅な増強は見られなかった。

## 【 0 0 4 9 】

さらに、本酵素を様々な温度でインキュベート後の残存活性を検討した。図 1 4 に示したように、野生型のyweBは非常に不安定であり、37 30 min で、20%程度にまで残存活性が低下することが確認された。また45 以上では、最初の10 min で急激な失活が起こり、その後時間と共に緩やかに低下してゆくという、二相性も観察された。なお、図では、各温度の0 min での活性を100 としたときの相対活性を対数で表示している。

## 【 0 0 5 0 】



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

#### 【0051】

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

次に、yweBを定方向進化に基づく戦略を用い耐熱化を図った。定方向進化法としてError-prone PCR によるランダム変異導入法を用いた。ランダム変異導入はLeng らの方法に基づき、低濃度dATP でのError prone PCR 法で行った。まず、各0.25 mM dGTP、dCTP、dTTP と4  $\mu$  の低濃度dATP の状態で10 cyclesのミスセンスエラー誘発PCR を行った。引き続き、0.25 mM dATP の添加により25 cyclesの増幅PCR を行った。Primer はpUC18 に対するSequencing Primers M13-RV(タカラ酒造社製)、M13-M4(タカラ酒造社製)を用いた。

#### 【0052】

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

#### 【0053】

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

#### 【0054】

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

#### 【0055】

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

#### 【0056】

〔*Bacillus subtilis* 由来GluDH (yweB) の耐熱化と解析：変異酵素の作成〕

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

#### 【0057】

変異導入するにあたり、プラスミドpYWEを制限酵素BamHIとPstIで切断し、アガロース

10

20

30

40

50

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

10

#### 【0058】

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

#### 【0059】

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

20

#### 【0060】

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

30

#### 【0061】

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

#### 【0062】

図に示したように、Q144R変異体について顕著な耐熱性の上昇が確認された。統合計算化学システムMOE (Chemical Computing Group Inc.) のホモロジーモデリング機能で、Thermococcus litoralis GluDHの三次元座標をテンプレートとしてyweBおよびこれらの変異酵素の三次元構造モデル並びに四次構造モデルを作製した。図21は、作製したyweB四次構造モデルの概観図である。なお、図は、二量体を示しており、上下のサブユニットが上下対称となっていることがわかる。また、図の中央にQ (グルタミン) を明示したように、本酵素は144番目のアミノ酸残基がきわめて近接した場所に位置している。六量体はこの上下の対が三組束になった構造をとる。

40

#### 【0063】

解析の結果、Q144は構造上でサブユニット間のインターフェース部分(上下のサブユニット対の境界面部分)に位置しており、この部位が塩基性残基のArgに置換されることで、相手方のサブユニットの主鎖とArgのグアニジノ基との間で水素結合が形成され、サブユニットインターフェースが安定化したと思料される。また、E27Vについても僅かなが

50

ら耐熱性の増加が見られた。E27 は構造上で二つのドメイン間のヒンジ領域に位置している。この部位が疎水性アミノ酸に置換され、疎水性コアパッキングが増すことで安定化に影響を与えたと思料される。

【 0 0 6 4 】

〔Bacillus subtilis 由来GluDH (yweB) の耐熱化と解析：変異酵素の作製〕

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

10

【 0 0 6 5 】

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

【 0 0 6 6 】

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

20

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

【 0 0 6 7 】

図 2 2 および図 2 3 に結果を示す。図に示したように、Q144 に関しては、元々の変異体であるQ144R が最も高い熱安定性を示した。E27 に関しては、E27F が50  $^{\circ}$ C での残存活性が約66%と最も高い値を示した。

【 0 0 6 8 】

よって、Q144 については、50  $^{\circ}$ C での残存活性が30%以上を示したQ144R、C、D、および正電荷を与えるものとしてK を選び、E27 については、50  $^{\circ}$ C での残存活性が30%以上を示したE27F、K および元々の変異体であるV を選び更なる検討を行った。検討に際しては、変異酵素Q144R、C、D、K、E27F、K、V そして変異体獲得における最終産物5-12 の培養を行い、硫酸沈殿、DEAE カラムまでの部分精製 (純度60%以上) を行い、耐熱性の検討、および反応速度論的解析を行った。Q144RおよびE27Fについては、上記精製工程の後にButylカラム工程を加え純度95%以上にまで精製したものをを用いた。耐熱性の検討については、様々な温度で20 min インキュベート後の残存活性を検討し、それぞれの50 %の残存活性を示す温度をT<sub>m</sub> 値 (MeltingTemperature) として求めた。熱未処理のものの活性を100 としたときの相対活性で示した。反応速度論的解析については、アミノ化反応における各基質のK<sub>m</sub> 値の測定を行った。また、変異酵素Q144R、E27F について、酵素を様々な濃度の下で4  $^{\circ}$ C 30 min 放置した前後の残存活性を検討した。

30

40

【 0 0 6 9 】

図 2 4 ~ 図 2 7 に結果を示す。図示したように、Q144 については、Q144R がT<sub>m</sub>値約62  $^{\circ}$ C と野生型と比べて約20  $^{\circ}$ C の上昇が見られた。他の変異酵素についても、多少の上昇が見られた。前述のように、Q144 は構造上でサブユニット間のインターフェース部分に位置しており、この部位が塩基性残基のArg に置換されることで、対を形成する相手方のサブユニットの主鎖とArg のグアニジノ基との間で水素結合が形成され、イオン対ネットワーク (ion-pair net-work) 効果によりサブユニットインターフェースが安定化したと思料される。

【 0 0 7 0 】

50

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

#### 【0071】

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

10

#### 【0072】

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

20

#### 【0073】

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

#### 【0074】

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

30

#### 【0075】

##### 【発明の効果】

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

40

#### 【0076】

また、全塩基配列決定し変異確認を行ったところ、Q144およびE27の変異が耐熱性に貢献していたので、この部位のアミノ酸残基を種々置換して検討を行った結果、Q144R 変異体の  $T_m$  値が野生型と比べて20 上昇し、E27F 変異体の  $T_m$  値は野生型と比べて約7 上昇することが確認できた。

#### 【0077】

Q144R、E27F 変異体について、タンパク濃度の影響を検討してみたところ、野生型と比して明らかに低タンパク濃度下で安定性の増強が見られた。

#### 【0078】

また、耐熱性を備えNAD型のGluDHである *Bacillus acidocaldarius* GluDHと比較しても、3

50

7 における脱アミノの比活性が1.4倍高く、高い活性を示すことが確認できた。

【0079】

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

【0080】

【配列表】

<110> Shimane University

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

<130> P1SWA02022

10

<140>

<141>

<160> 30

<210> 1

20

<211> 1272

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1272)

30

<400> 1

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

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

1

5

10

15

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

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

40

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





ctc tac aac cca gac ggc ctt gat atc cct tat ttg ctc gat aaa cgg 816  
 Leu Tyr Asn Pro Asp Gly Leu Asp Ile Pro Tyr Leu Leu Asp Lys Arg  
                   260                                  265                                  270

gac agc ttt ggt atg gtc acc aat tta ttt act gac gtc atc aca aat 864  
 Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn  
                   275                                  280                                  285

10

gag gag ctg ctt gaa aag gat tgc gat att tta gtg cct gcc gcg atc 912  
 Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile  
                   290                                  295                                  300

tcc aat caa atc aca gcc aaa aac gca cat aac att cag gcg tca atc 960  
 Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile  
 305                                  310                                  315                                  320

20

gtc gtt gaa cgg gcg aac ggc ccg aca acc att gat gcc act aag atc 1008  
 Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile  
                                   325                                  330                                  335

ctg aat gaa aga ggc gtg ctg ctt gtg ccg gat atc cta gcg agt gcc 1056  
 Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala  
                   340                                  345                                  350

30

ggc ggc gtc acg gtt tct tat ttt gaa tgg gtg caa aac aac caa gga 1104  
 Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly  
                   355                                  360                                  365

40

tat tat tgg tcg gaa gaa gag gtt gca gaa aaa ctg aga agc gtc atg 1152

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

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

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

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

10

20

<210> 2

<211> 424

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 2

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

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

Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met 20  
 35 40 45

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

Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys  
 65 70 75 80 30

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

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

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe 40  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Phe Gly Met Val Thr Asn Leu Phe Thr Asp Val Ile Thr Asn

10

20

30

40

275	280	285	
Glu Glu Leu Leu Glu Lys Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala Ala Ile			
290	295	300	
Ser Asn Gln Ile Thr Ala Lys Asn Ala His Asn Ile Gln Ala Ser Ile			
305	310	315	10
Val Val Glu Arg Ala Asn Gly Pro Thr Thr Ile Asp Ala Thr Lys Ile			
	325	330	335
Leu Asn Glu Arg Gly Val Leu Leu Val Pro Asp Ile Leu Ala Ser Ala			
	340	345	350
			20
Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Asn Gln Gly			
355	360	365	
Tyr Tyr Trp Ser Glu Glu Glu Val Ala Glu Lys Leu Arg Ser Val Met			
370	375	380	
Val Ser Ser Phe Glu Thr Ile Tyr Gln Thr Ala Ala Thr His Lys Val			
385	390	395	30
Asp Met Arg Leu Ala Ala Tyr Met Thr Gly Ile Arg Lys Ser Ala Glu			
	405	410	415
Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val			
420			40

<210> 3

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

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

1

5

10

15

20

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

20

25

30

Gly Tyr Pro Gly Asp Met Tyr Glu Leu Met Lys Glu Pro Gln Arg Met

35

40

45

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

50

55

60

30

Phe Thr Gly Tyr Arg Ser Gln His Asn Asp Ala Val Gly Pro Thr Lys

65

70

75

80

Gly Gly Val Arg Phe His Pro Glu Val Asn Glu Glu Glu Val Lys Ala

85

90

95

40

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

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

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

10

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

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

20

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

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

30

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

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

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

40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

10

20

30

40



<210> 4

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant enzyme obtained by introduction of point mutation into  
wild type GluDH gene (yweB) and its expression 10

<400> 2

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

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

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

Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val 30  
50 55 60

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

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

Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr 40

100	105	110	
Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe			
115	120	125	
Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Gln			
130	135	140	10
Ile Val Gly Pro Thr Lys Asp Ile Pro Ala Pro Asp Val Tyr Thr Asn			
145	150	155	160
Ser Gln Ile Met Ala Trp Met Met Asp Glu Tyr Ser Arg Leu Arg Glu			
	165	170	175
			20
Phe Asp Ser Pro Gly Phe Ile Thr Gly Lys Pro Leu Val Leu Gly Gly			
180	185	190	
Ser Gln Gly Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gln Gly Val Thr Ile Cys Ile			
195	200	205	
Glu Glu Ala Val Lys Lys Lys Gly Ile Lys Leu Gln Asn Ala Arg Ile			
210	215	220	30
Ile Ile Gln Gly Phe Gly Asn Ala Gly Ser Phe Leu Ala Lys Phe Met			
225	230	235	240
His Asp Ala Gly Ala Lys Val Ile Gly Ile Ser Asp Ala Asn Gly Gly			
	245	250	255
			40

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

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

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

10

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

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

20

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

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

30

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

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

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

40

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

<210> 5

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant enzyme obtained by introduction of point mutation into  
wild type GluDH gene (yweB) and its expression 10

<400>

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

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

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

Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Lys Met Asp Asn Gly Ser Val Lys Val 30  
50 55 60

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

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

Leu Ser Ile Trp Met Thr Leu Lys Cys Gly Ile Ala Asn Leu Pro Tyr 40

	100		105		110	
Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ile Ile Cys Asp Pro Arg Thr Met Ser Phe						
	115		120		125	
Gly Glu Leu Glu Arg Leu Ser Arg Gly Tyr Val Arg Ala Ile Ser Arg						10
	130		135		140	
Ile Val Gly Pro Thr Lys Asp Ile Pro Ala Pro Asp Val Tyr Thr Asn						
	145		150		155	160
Ser Gln Ile Met Ala Trp Met Met Asp Glu Tyr Ser Arg Leu Arg Glu						
		165		170		175
						20
Phe Asp Ser Pro Gly Phe Ile Thr Gly Lys Pro Leu Val Leu Gly Gly						
	180		185		190	
Ser Gln Gly Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gln Gly Val Thr Ile Cys Ile						
	195		200		205	
Glu Glu Ala Val Lys Lys Lys Gly Ile Lys Leu Gln Asn Ala Arg Ile						30
	210		215		220	
Ile Ile Gln Gly Phe Gly Asn Ala Gly Ser Phe Leu Ala Lys Phe Met						
	225		230		235	240
His Asp Ala Gly Ala Lys Val Ile Gly Ile Ser Asp Ala Asn Gly Gly						
		245		250		255
						40

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

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

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

10

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

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

20

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

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

30

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

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

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

40

Ala Ser Arg Phe Arg Gly Trp Val  
 420

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

cgggatccgt agaggagaaa aagatgtcag ca

32

20

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

cgggatccgt agaggaaact caaatggcag cc

32

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

cagctgcagg gtgatcacct ttctct

26

20

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

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

<400>

cagctgcagc tgtcaactcc tgcgat

26



<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

atcattaagg tagcccttcg g

21

<210> 11

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

ttatccattc ggatgacgct c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

gtcgttgaag cggcgaacgg c

21

<210> 13

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

gccatcagcc ggatcgtcgg t

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

gatgccaatg ccgggctcta c

21

<210> 15

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

gtatgaactc atgaaagagc c

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

gcttctcagt tttctgcaa c

21

<210> 17

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

cattatccat ttggatgacg c

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

ctgtgatttg attggagatc g

21

<210> 19

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

gccatcagcg acatcgtcgg t

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

gccatcagcg agatcgtcgg t

21

<210> 21

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

gccatcagca agatcgtcgg t

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

10

<400>

gccatcagcc acatcgtcgg t

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

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

30

<400>

gccatcagca acatcgtcgg t

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

gccatcagcg cgatcgtcgg t

21

<210> 25

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

gccatcagcc tgatcgtcgg t

21



<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

gccatcagct gcatcgtcgg t

21

<210> 27

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

atcattaaga aagcccttcg g

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

atcattaaga gagcccttcg g

21

<210> 29

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

30

<400>

atcattaagg cagcccttcg g

21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

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

<400>

atcattaagt ttgcccttcg g

21

【図面の簡単な説明】

20

【図 1】プライマーのデザインを示した図である。

【図 2】実験に用いたPCR反応液の成分構成を示した図である。

【図 3】PCRサーマルサイクラー条件を示した図である。

【図 4】アミノ化反応の概要を示した図である。

【図 5】脱アミノ反応の概要を示した図である。

【図 6】精製法の手順を示した図である。

【図 7】SDS-PAGEにより精製の確認を示した図である。

【図 8】精製表を示した図である。

【図 9】分子量の検討結果を示した図である。

【図 10】最適 pH の検討結果を示した図である。

30

【図 11】GluDHのカイネティックパラメーターを示した図である。

【図 12】基質特異性の検討結果を示した図である。

【図 13】耐熱性の検討結果を示した図である。

【図 14】GluDH安定性における熱と時間効果の検討結果を示した図である。

【図 15】耐熱化クローンを得るための実験概要を示した図である。

【図 16】活性染色法によるスクリーニング系を示した図である。

【図 17】野生型 (WT) および変異体 GluDH の耐熱性検討結果を示した図である。

【図 18】変異酵素の変異部位を示した図である。

【図 19】変異導入 PCR のプロトコルを示した図である。

【図 20】変異酵素の残存活性について示した図である。

40

【図 21】yweB 四次構造モデルの概観図である。

【図 22】Q144 の変異酵素の耐熱性を示した図である。

【図 23】E27 の変異酵素の耐熱性を示した図である。

【図 24】野生型および変異酵素のカイネティックパラメーターと TM 値を示した図である。

【図 25】野生型および変異酵素のカイネティックパラメーターを示した図である。

【図 26】野生型および各変異酵素の耐熱性を示した図である。

【図 27】

野生型および変異酵素のタンパク濃度の関係を示した図である。

【図 28】四次構造 (二量体) の変異部位を拡大した図である。

50

【図29】六量体構造の概念図を示した図である。

【図1】

※ センスプライマーのデザイン

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

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

【図2】

(PCR Reaction Mixture)

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

【図3】

(PCR サーマルサイクラー条件)

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

(PCR 装置 : TaKaRa DNA Thermal Cycler)

【図4】

アミノ化反応 (Aminating)

500 mM Tris-HCl pH 7.3	200 μl	[ 100 mM 100 mM 0.1 mM ]
400 mM NH <sub>4</sub> Cl	250 μl	
4 mM NADH	25 μl	
GluDH	X μl	
蒸留水	425-X μl	
		100 mM 2-oxoglutaric acid 100 μl (10 mM) pH 7.3
		340 nm の吸光度測定 測定温度 37°C

【図5】

脱アミノ反応 (Deaminating)

500 mM Tris-HCl pH 7.7	200 μl	[ 100 mM 0.5 mM ]
50 mM NAD <sup>+</sup>	10 μl	
GluDH	X μl	
蒸留水	790-X μl	
		100 mM L-glutamic acid 100 μl (10 mM) pH 7.7
		340 nm の吸光度測定 測定温度 37°C

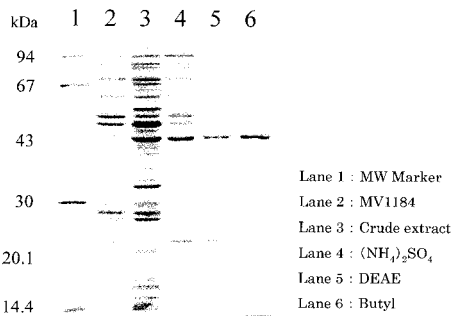
【 図 6 】

yweB の精製手順

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

【 図 7 】

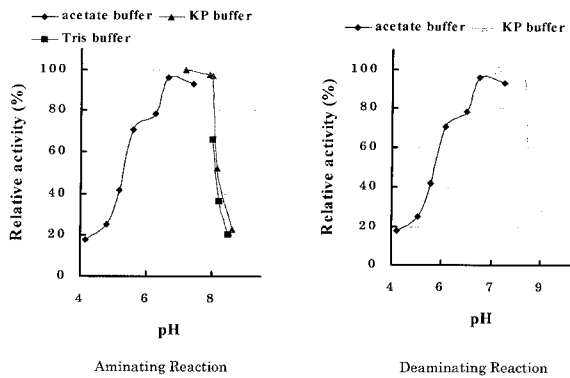
SDS-PAGE による精製確認結果



Lane 1 : MW Marker  
Lane 2 : MV1184  
Lane 3 : Crude extract  
Lane 4 : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Lane 5 : DEAE  
Lane 6 : Butyl

【 図 10 】

yweB の反応指標 pH



【 図 8 】

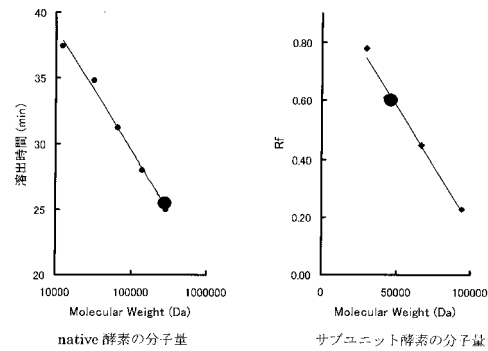
精製表

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

\*凍結菌体 26.3 g 使用

【 図 9 】

yweB 分子量の決定



native 酵素の分子量

サブユニット酵素の分子量

【 図 11 】

yweB のカインディクスパラメータ

<i>k<sub>cat</sub></i> (s <sup>-1</sup> )		<i>K<sub>m</sub></i> (mM)				
Aminating	Deaminating	NADH	2-oxoglutaric acid	NH <sub>4</sub> Cl	NAD <sup>+</sup>	L-Glutamic Acid
256.41	13.44	0.07	0.64	55.56	0.08	0.34

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

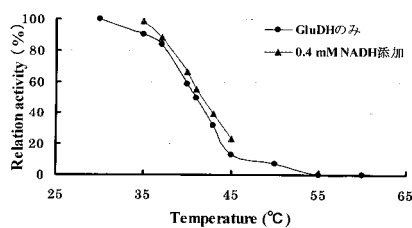
【 図 12 】

基質特異性

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

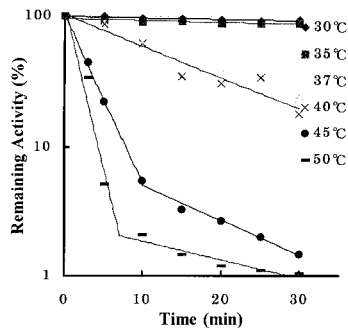
【 図 13 】

耐熱性の検討結果



【 図 1 4 】

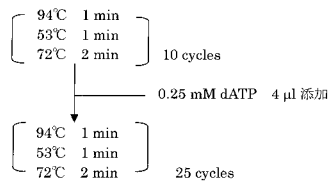
GluDH 安定性における熱・時間効果の検討結果



【 図 1 5 】

Error-prone PCR の反応手順

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



【 図 1 9 】

「変異導入 PCR Mutan Super Express Km」

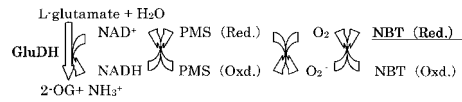
Template	2 $\mu$ l (10 ng)
primer soln.	4 $\mu$ l
10×Ex Taq buffer	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP mix	8 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq	0.5 $\mu$ l
滅菌蒸留水	30.5 $\mu$ l
total	50 $\mu$ l
ミネラルオイル適量	
94°C 1 min	25 cycles
55°C 1 min	
72°C 3 min	

【 図 2 0 】

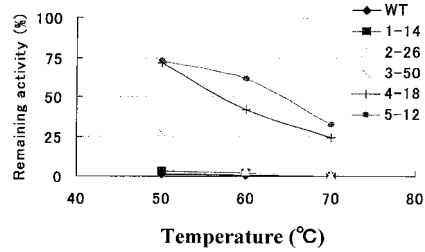
	残存活性 (%)	
	50°C	60°C
WT	1.41	0.68
E27V	4.61	2.19
W100R	2.71	0.85
R324A	1.84	0.33
Q144R	76.71	52.73
G255A	12.67	1.77

【 図 1 6 】

活性染色法によるスクリーニング



【 図 1 7 】

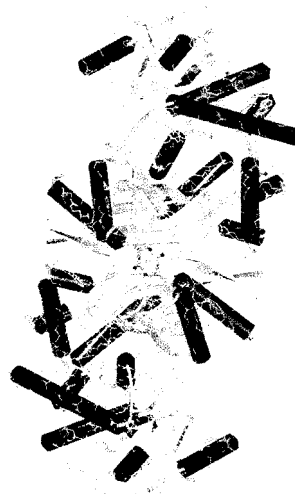


野生型及び変異体GluDHの耐熱性

【 図 1 8 】

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

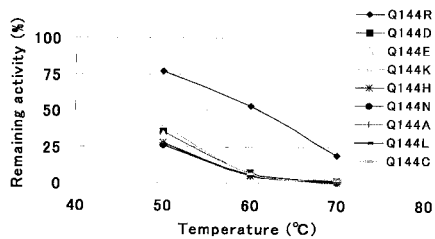
【 図 2 1 】



yweBのダイマーモデル

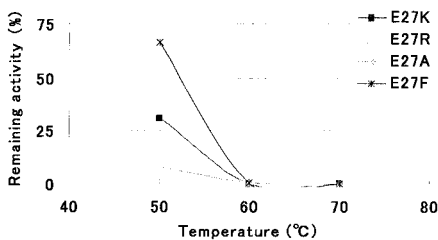
【 図 2 2 】

Q144 シリーズ変異酵素の耐熱性試験結果



【 図 2 3 】

E27 シリーズ変異酵素の耐熱性試験結果



【 図 2 4 】

野生型及び変異酵素のカイネティックパラメーターと Tm 値

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

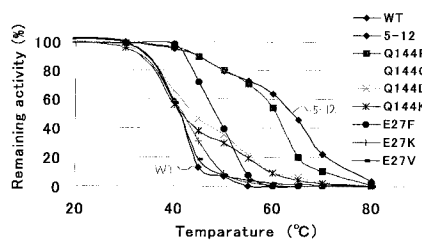
【 図 2 5 】

野生型及び変異酵素のカイネティックパラメーター

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

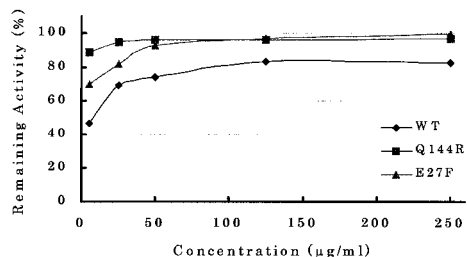
【 図 2 6 】

野生型及び各変異酵素の耐熱性

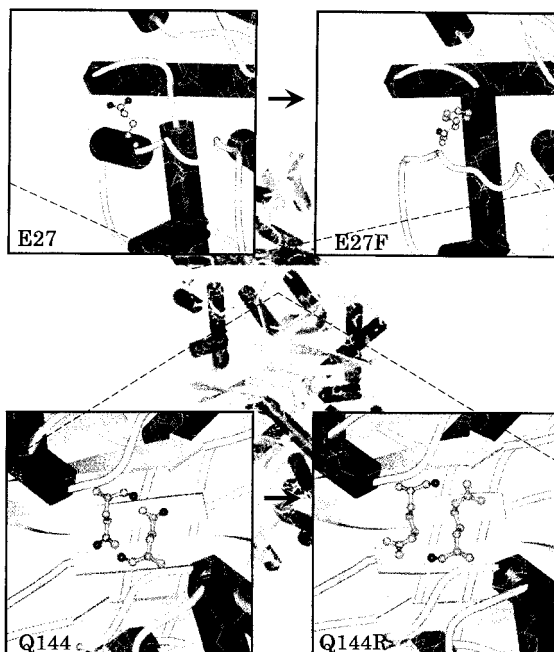


【 図 2 7 】

野生型及び変異酵素のタンパク濃度の関係



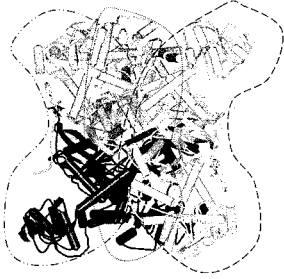
【 図 2 8 】



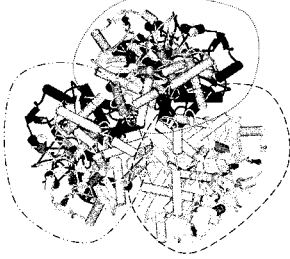
変異部位拡大図

【 図 2 9 】

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



六量体の上下対の3組を上から見た図





---

フロントページの続き

(72)発明者 芦田 裕之

島根県松江市西川津町4287

シャルマンらくざんI - 102

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 Structure, 1995年, 3/11, 1147-1158

Mol. Microbiol., 1993年, 10/2, 371-384

J. Bacteriol., 1998年, 180/23, 6298-6305

J. Mol. Biol., 1999年, 293/5, 1121-1132

J. Biol. Chem., 2002年 6月, 277/23, 20678-20685

Vaccine, 2000年, 18, 1886-1892

FEBS Letters, 2001年, 506, 191-195

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/00-1/38

C12N 9/00-/9/99

JICSTファイル(JOIS)

MEDLINE(STN)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed