

(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2010-183860

(P2010-183860A)

(43) 公開日 平成22年8月26日(2010.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 1 2 N 9/06 Z N A B	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 P 13/20 (2006.01)	C 1 2 P 13/20	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2009-29181 (P2009-29181)
 (22) 出願日 平成21年2月11日 (2009.2.11)

(71) 出願人 504155293
 国立大学法人島根大学
 島根県松江市西川津町1060
 (74) 代理人 100116861
 弁理士 田邊 義博
 (72) 発明者 澤 嘉弘
 島根県松江市西川津町1060 国立大学
 法人島根大学 生物資源科学部内
 (72) 発明者 川上 矩加
 島根県松江市西川津町872-16-20
 2
 (72) 発明者 石川 孝博
 島根県松江市西川津町1060 国立大学
 法人島根大学 生物資源科学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 常温型アスパラギン酸脱水素酵素およびL-アスパラギン酸製造方法

(57) 【要約】

【課題】 常温で酵素活性が高く安定なアスパラギン酸脱水素酵素を提供すること。

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

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 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、アスパラギ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 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 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、アスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

10

【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、アスパラギ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、アスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

20

【請求項 5】

請求項 2 又は請求項 4 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細菌。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の細菌を培地で培養し、アスパラギン酸脱水素酵素を発現させ、該培養物よりアスパラギン酸脱水素酵素を採取することを特徴とするアスパラギン酸脱水素酵素の製造方法。

30

【請求項 7】

原料として、フマル酸およびアンモニウム塩、または、フマル酸アンモニウム、を供給し、

触媒として、フマラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、並びに、

請求項 1 若しくは請求項 3 に記載のアスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質、請求項 5 に記載の細菌、又は、請求項 6 に記載の製造方法により製造されたアスパラギン酸脱水素酵素を加え、

L - アスパラギン酸を得ることを特徴とする L - アスパラギン酸製造方法。

40

【請求項 8】

原料として、コハク酸、クエン酸、および/または、グルコース、並びに、尿素その他の窒素源を供給し、

請求項 2 又は請求項 4 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細菌を用いた発酵法により L - アスパラギン酸を得ることを特徴とする L - アスパラギン酸製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、常温で高い触媒活性を有するアスパラギン酸脱水素酵素およびこれを用いたL-アスパラギン酸製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

L-アスパラギン酸はタンパク質を構成するアミノ酸のうちの一つであり、生体内できわめて有用なアミノ酸である。実際に、アスパラギン酸を含めて、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。また、アスパラギン酸に関しては、人工甘味料アスパルテムの原料素材としても広く活用されている。

【0003】

アスパラギン酸をはじめ各種のアミノ酸は、ケト酸とアンモニアを触媒にアミノ酸脱水素酵素を用いた還元的アミノ化反応により得ることができる。アスパラギン酸の場合は、オキサロ酢酸が原料となる。

【0004】

自然界に知られるアミノ酸脱水素酵素は、わずかに、アラニン脱水素酵素(AlaDH)、グルタミン酸脱水素酵素(GluDH)、ロイシン脱水素酵素(LeuDH)、バリン脱水素酵素(ValDH)、フェニルアラニン脱水素酵素(PheDH)であり、アスパラギン酸脱水素酵素(AspDH)も、近年ようやく発見されたものである。

【0005】

一つは、古細菌アーキオグロブス・フルジダス由来のAspDH(特許文献1)であり、もう一つは本発明者らによるバシラス・ズブチリス由来であって変異させて活性を高めたAspDH(特許文献2)である。これらのAspDHを用いれば、L-アスパラギン酸を得ることが可能となる。なお、以降において前者を適宜AfAspDHと表記し、後者を適宜BsAspDHと表記する。

【0006】

また、L-アスパラギン酸を工業的に得る方法としてアスパルターゼを用いた酵素法も知られている(特許文献3~特許文献6)。

【0007】

しかしながら、従来技術では以下の問題点があった。

AfAspDHは、安定性はきわめて高いが、酵素活性は高くなく、特に常温における還元活性が低いという問題点があった。ここで、オキサロ酢酸は高温で不安定であるため、反応系の温度を高めるには限界があるという原理的な問題点があった。また、BsAspDHについては、常温で比較的高い活性を示すが、安定性が低く、また、オキサロ酢酸以外にピルビン酸にも反応性を示すという問題点があった。

【0008】

また、アスパルターゼを用いる特許文献3~特許文献6に開示される技術では大腸菌等を用いるため、菌中のフマラーゼによりL-リンゴ酸も生成されてしまう。このため、加熱によるフマラーゼ活性の除去操作を必要とするが、加熱処理によりアスパルターゼも一部失活や安定性の低下を招来してしまうという問題点があった。

【0009】

また、本発明者らによる方法(特許文献2)では、上述のような加熱処理は不要であり、また、オキサロ酢酸より安価なDL-リンゴ酸を原料に用いるが、DL-リンゴ酸も比較的高価な原料であるという問題点があった。また、この方法でL-アスパラギン酸を得ることもできるが、同時にD-リンゴ酸も生成されるため、これを分離する後工程が必要となるという問題点があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2006-254730号公報

【特許文献2】特開2006-254795号公報

10

20

30

40

50

【特許文献3】特開昭60-133883号公報

【特許文献4】特開昭59-113887号公報

【特許文献5】特開昭56-26196号公報

【特許文献6】特開平10-313888号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

すなわち、解決しようとする問題点は、常温で酵素活性が高く安定なアスパラギン酸脱水素酵素を提供する点である。

【0012】

また、常温で酵素活性が高く安定なアスパラギン酸脱水素酵素を用いてL-アスパラギン酸を提供する点である。

【0013】

また、補酵素としてNAD⁺の添加を必要とせず安価にL-アスパラギン酸を得る方法を提供する点である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、上記問題点を解決すべくAfAspDHのアミノ酸配列の相同性検索をおこな
い、単なる機械検索結果の中から鋭意検討の結果、シュードモナス・エルギノーザ PA
01 (*Pseudomonas aeruginosa* PA01) およびラルストローニア・ユートロファ JMP1
34 (*Ralstonia eutropha*
JMP134) に実際にAspDHが存在することを見だし本発明を完成するに至った

【0015】

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2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列の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、アスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【0016】

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2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列の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、アスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【0017】

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、アスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【0018】

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、アスパラギン酸脱水素酵素活性を

10

20

30

40

50

有するタンパク質。

【0019】

5 . :

上記2 . 又は上記4 . 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細菌。

なお、細菌の例として、大腸菌、枯草菌、放線菌などを挙げることができる。

【0020】

6 . :

上記5 . に記載の細菌を培地で培養し、アスパラギン酸脱水素酵素を発現させ、該培養物よりアスパラギン酸脱水素酵素を採取することを特徴とするアスパラギン酸脱水素酵素の製造方法。

なお、採取の際には、例えば、トルエンで膜透過処理を施しても良い。

【0021】

7 . :

原料として、フマル酸およびアンモニウム塩、または、フマル酸アンモニウム、を供給し、触媒として、フマラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、並びに、上記1 . 若しくは上記3 . に記載のアスパラギン酸脱水素酵素活性を有するタンパク質、上記5 . に記載の細菌、又は、上記6 . に記載の製造方法により製造されたアスパラギン酸脱水素酵素を加え、L - アスパラギン酸を得ることを特徴とするL - アスパラギン酸製造方法。

なお、大腸菌由来のリンゴ酸脱水素酵素はL - アスパラギン酸を分解する性質があるため、L - アスパラギン酸を分解する性質のない枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来のリンゴ酸脱水素酵素を添加しても良い。

【0022】

8 . :

原料として、コハク酸、クエン酸、および/または、グルコース、並びに、尿素その他の窒素源を供給し、上記2 . 又は上記4 . 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細菌を用いた発酵法によりL - アスパラギン酸を得ることを特徴とするL - アスパラギン酸製造方法。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、常温で酵素活性が高く安定なアスパラギン酸脱水素酵素を提供することができる。また、常温で酵素活性が高く安定なアスパラギン酸脱水素酵素を用いてL - アスパラギン酸を提供することができる。また、補酵素としてNAD⁺の添加を必要とせず安価にL - アスパラギン酸を得ることができる。

【0024】

特に、本発明（請求項7）に係る発明によれば、高価な補酵素NAD⁺を必要とせず、また、安価な原料であるフマル酸を用いて、L - アスパラギン酸の工業的生産が常温で可能となる。また、D - リンゴ酸も生成されないため、その後の分離処理も必要としない。

【0025】

また、本発明（請求項8）に係る発明によれば、別途の酵素添加を必要とせず細菌を生かしながら（培養しながら）L - アスパラギン酸を生産可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】 AfAspDHとのアミノ酸配列の相同性検索の結果である。

【図2】 酵素精製の手順を示した図である。

【図3】 SDS-PAGEの結果を示した図である。

【図4】 AspDH酵素の反応至適温度の評価結果を示した図である。

【図5】 アミノ化反応の概要を示した図である。

【図6】 脱アミノ反応の概要を示した図である。

【図7】 酵素触媒パラメータを示した図である。

10

20

30

40

50

【図 8】CD 熱変成曲線を表した図である。

【図 9】フマル酸を原料とした L - アスパラギン酸の反応図である。

【図 10】トルエン処理の手順を示した図である。

【図 11】反応組成を示した図である。

【図 12】各種酵素と各種基質との組合せによる L - アスパラギン酸の濃度を示した表である。

【図 13】3 酵素を用いた場合の最適条件を示した図である。

【図 14】転換効率を測定した表である。

【図 15】フィードパッチ法の組成を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

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。

【0028】

ここでは、< 1 > 形質転換大腸菌の作成、< 2 > PaeAspDHおよびReuAspDHの性質ないし評価、< 3 > L - アスパラギン酸の生産、の順に説明する。

【0029】

なお、遺伝子の単離およびこの遺伝子を含む組み換えベクターの作成、組み換えベクターによる形質転換体の作成、並びに形質転換体の培養等に関しては公知の方法、例えばモレキュラー・クローニング（コールドスプリングハーバー出版社、1989年）、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー（ウィリー・インターサイエンス出版社、1989年）等に挙げられている方法を組み合わせることができるので、その詳細な記載を省略する。

【0030】

< 1 > 形質転換大腸菌の作成

図 1 は、AfAspDHとのアミノ酸配列の相同性検索の結果である。ここでは、相同性検索の結果に基づき、シュードモナス・エルギノーザ PA01（*Pseudomonas aeruginosa* PA01：配列番号 1）、ラルストニア・ユートロファ JMP134（*Ralstonia eutropha* JMP134：配列番号 3）および、ブラジリゾビウム・ジャポニカム USDA 110（*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110：配列番号 5）を用いて、クローニングをおこない、単離した後、大腸菌内での発現を試みた。

【0031】

< 1 - 1 : PaeAspDH >

〔PaeAspDHのクローニング：染色体DNAの調製〕

Pseudomonas aeruginosa PA01由来想定上AspDH遺伝子（以降においてpaasdと適宜表記するものとする）をクローニングするため、*Pseudomonas aeruginosa* PA01を1/10 LB培地3 ml で30、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。

【0032】

〔PaeAspDHのクローニング：PCRによるAspDH遺伝子の増幅〕

次に、目的遺伝子 (paasd) の塩基配列情報に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いてpaasd DNA断片の増幅を行った。なお、配列番号7にセンスプライマーを、配列番号8にアンチセンスプライマーの遺伝子配列を示す。

【0033】

〔PaeAspDHのクローニング：形質転換大腸菌の作製〕

得られたPCR増幅産物（約804 bp）をアガロースゲル電気泳動で確認した後、エタノー

10

20

30

40

50

ル沈殿法により精製した。これらのDNA断片を、それぞれpET11-aベクター(Novagen社製)のNdeIおよびBamHI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*) BL-21コンピテントセル(STRATAGENE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NdeIおよびBamHI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。

【0034】

< 1 - 2 : *ReuAspDH* >

[*ReuAspDH*のクローニング：染色体DNAの調製]

Ralstonia eutropha JMP134由来想定上*AspDH*遺伝子(以降において*reasd*と適宜表記するものとする)をクローニングするため、*Ralstonia eutropha* JMP134を1/10 LB培地3 ml で30、18~20 hr振とう培養を行い、遠心(15000rpm, 5分)にて集菌後、CTAB法を用いて染色体DNAの調製を行った。

【0035】

[*ReuAspDH*のクローニング：PCRによる*AspDH*遺伝子の増幅]

次に、目的遺伝子(*reasd*)の塩基配列情報に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いて*reasd* DNA断片の増幅を行った。なお、配列番号9にセンスプライマーを、配列番号10にアンチセンスプライマーの遺伝子配列を示す。

【0036】

[*ReuAspDH*のクローニング：形質転換大腸菌の作製]

得られたPCR増幅産物(約807 bp)をアガロースゲル電気泳動で確認した後、エタノール沈殿法により精製した。これらのDNA断片を、それぞれpColdIVベクター(タカラバイオ社製)のNdeIおよびHindIII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*) BL-21コンピテントセル(STRATAGENE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NdeIとHindIII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。

【0037】

[*BjaAspDH*のクローニング：染色体DNAの調製]

Bradyrhizobium japonicum USDA 110由来想定上*AspDH*遺伝子(以降において*bjasd*と適宜表記するものとする)をクローニングするため、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110を1/10 LB培地3 ml で30、18~20 hr振とう培養を行い、遠心(15000rpm, 5分)にて集菌後、CTAB法を用いて染色体DNAの調製を行った。

【0038】

[*BjaAspDH*のクローニング：PCRによる*AspDH*遺伝子の増幅]

次に、目的遺伝子(*bjasd*)の塩基配列情報に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いて*bjasd* DNA断片の増幅を行った。なお、配列番号11にセンスプライマーを、配列番号12にアンチセンスプライマーの遺伝子配列を示す。

【0039】

[*BjaAspDH*のクローニング：形質転換大腸菌の作製]

得られたPCR増幅産物(約843 bp)をアガロースゲル電気泳動で確認した後、エタノール沈殿法により精製した。これらのDNA断片を、それぞれpET11-aベクター(Novagen社製)のNdeIおよびBamHI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*) BL-21コンピテントセル(STRATAGENE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NdeIとBamHI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。

【0040】

10

20

30

40

50

< 1 - 4 - 1 : EcFumarase >

〔EcFumaraseのクローニング：染色体DNAの調製〕

後述するように、フマラーゼ (Fumarase) やリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) も導入した形質転換大腸菌を用いて、酵素法によるL-アスパラギン酸の製造を説明するので、ここで、そのクローニングについて言及しておく。

まず、Escherichia coli由来Fumarase遺伝子(以降においてfumCと適宜表記するものとする)をクローニングするため、Escherichia coli MV1184をLB培地3 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法を用いて染色体DNAの調製を行った。

【0041】

〔EcFumaraseのクローニング：PCRによるfumC遺伝子の増幅〕

次に、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)登録番号JW1603に記載の目的遺伝子(fumC)の塩基配列情報に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いてfumC DNA断片の増幅を行った。

【0042】

〔EcFumaraseのクローニング：形質転換大腸菌の作製〕

得られたPCR増幅産物(約1.4kb)をアガロースゲル電気泳動で確認した後、エタノール沈殿法により精製した。これらのDNA断片を、それぞれpKF18ベクター(タカラバイオ社製)のSacIおよびKpnIサイトにライゲーションし、組み換えDNAを得た。得られた組み換えDNAを大腸菌(E. coli) MV1184コンピテントセル(日本ジーン社製)に導入し形質転換した。形質転換株はLBプレート(カナマイシン、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SacIとKpnI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。大腸菌に導入したこのベクターをpKF18/fumCと適宜表記する。

【0043】

< 1 - 4 - 2 : BsMDH >

〔BsMDHのクローニング：染色体DNAの調製〕

まず、Bacillus subtilis由来MDH遺伝子(以降においてmdhと適宜表記するものとする)をクローニングするため、Bacillus

subtilis ATCC 23857をLB培地3 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法を用いて染色体DNAの調製を行った。

【0044】

〔BsMDHのクローニング：PCRによるmdh遺伝子の増幅〕

次に、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)登録番号BSU29120に記載の目的遺伝子(mdh)の塩基配列情報に基づきプライマーをデザインし、PCRを用いてmdh DNA断片の増幅を行った。

【0045】

〔BsMDHのクローニング：形質転換大腸菌の作製〕

得られたPCR増幅産物(約939 bp)をアガロースゲル電気泳動で確認した後、エタノール沈殿法により精製した。これらのDNA断片を、それぞれpUC18ベクター(タカラバイオ社製)のBamHIおよびPstIサイトにライゲーションし、組み換えDNAを得た。得られた組み換えDNAを大腸菌(E. coli) MV1184コンピテントセル(日本ジーン社製)に導入し形質転換した。形質転換株はLBプレート(アンピシリン、X-Gal、IPTG含有)上でホワイトコロニーを形成することで選択した。この形質転換株からアルカリ-SDS法によりプラスミドDNAを調製し、一部をSacIとKpnI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。大腸菌に導入したこのベクターをpUC18/mdhと適宜表記する。

【0046】

< 1 - 4 - 3 : fumC-mdhリコンビナント大腸菌の作成 >

クローニングより得られたpKF18/fumCとpUC18/mdhに対し、それぞれSacI・KpnIとBamHI・PstIで制限酵素処理し、得られたDNA断片を、それぞれpSTV28ベクター(タカラバイオ社

10

20

30

40

50

製)のSacIおよびPstIサイトにライゲーションし、組み換えDNAを得た。得られた組み換えDNAを大腸菌(*E. coli*) MV1184コンピテントセル(日本ジーン社製)に導入し形質転換した。形質転換株はLBプレート(クロラムフェニコール、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SacI・KpnIとBamHI・PstIの各制限酵素で制限酵素処理し、電気泳動によりインサートDNAを確認した。大腸菌に導入したこのベクターをpSTV28/fumC-mdhと適宜表記する。

【0047】

< 1 - 4 - 4 : asd-fumC-mdhリコンビナント大腸菌の作成 >

作製したpSTV28/fumC-mdh/MV1184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、塩化カルシウム法により調製した大腸菌pET11-a/asd/BL-21コンピテントセルへ導入し、形質転換した。形質転換株はLBプレート(クロラムフェニコール、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、電気泳動により各プラスミドの導入を確認した。

【0048】

< 2 > PaeAspDHおよびAfAspDHの性質ないし評価

次に、得られた想定上PaeAspDH、想定上ReuAspDH、想定上BjaAspDHの酵素活性等を調べることにした。以降では、これらをまとめて、単に想定上AspDHと必要に応じて表記するものとする。

【0049】

〔想定上AspDH酵素の精製〕

精製にあたっては、*E. coli* BL-21 / 想定上AspDH酵素クローンを、50 mg/ml Amp 3 μ lを含むLB培地3 ml で37、18~20 hr振とう培養を行い、次いで50 mg/ml Amp 750 μ l、1 M IPTG 150 μ lを含むLB培地750 ml にスケールアップし、18~20 hr、37 で振とう培養し、遠心7,000 rpm 15 min で集菌した。最終的には、図2に示した方法(イオン交換(DEAE)カラム工程、色素(Blue)カラム工程、ゲルろ過(Superdex)カラム工程)で精製した。図3に示すSDS-PAGEの結果からほぼ均一に精製されていることが確認された。

なお、この時点で酵素活性を測定したところ、想定上PaeAspDHおよび想定上ReuAspDHにはアスパラギン酸脱水素酵素活性が確認され、想定上BjaAspDHには酵素活性は見られなかった。よって、以降ではPaeAspDHおよびReuAspDHと表記し、まとめて表記する場合は、適宜AspDH酵素と表記するものとする。

【0050】

〔AspDH酵素の性質〕

次に、精製された変異酵素であるRaeAspDHおよびPaeAspDHの酵素化学的性質を調べた。

【0051】

〔AspDH酵素の性質：反応至適温度および熱安定性〕

まず、AspDH酵素の反応至適温度の評価を行った。図4(a)のグラフは、各温度下で活性測定を行った際、最大活性を1とした場合の相対活性を示した図である。また、図4(b)のグラフは、各温度で20分間インキュベートした後の残存AspDH活性を、最大残存活性を1とした場合の相対活性を示した図である。

【0052】

図示したようにPaeAspDH、ReuAspDHは、いずれも、35~40に高いアスパラギン酸脱水素酵素(AspDH)活性を示し、常温付近が反応至適温度であることが認められる。また、熱安定性については、45で残存活性が半減するようすが示され、これらの結果から常温型の酵素であることが確認できる。

【0053】

〔AspDH活性測定〕

なお、活性測定ないし評価は以下に従った。

10

20

30

40

50

還元型補酵素NADHは340nm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 mmol⁻¹・cm⁻¹) の吸収の増減を追跡することにより活性評価を行った。活性 (Activity) の表示は、1 分間に1 μmol の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 protein) と表した。

【0054】

活性の評価式を式1に示す。

【数1】

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

10

【0055】

この活性を調べるためのアミノ化反応の概要を図5に、脱アミノ反応の概要を図6に示す。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。

【0056】

〔酵素の性質：反応速度論的解析〕

20

次に、変異酵素について、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) 又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。

【0057】

Kcatと比活性と酵素の分子量の関係は式2で与えられる。

$$\text{Kcat} = \text{比活性} \times (1 / 60) \times \text{酵素の分子量} \times (1 / 1000) \dots \text{(式2)}$$

【0058】

30

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さまざまな濃度で測定し、Lineweaver-Burk の逆数プロットから求めた。結果を図7に示す。Kcat値を見れば分かるように、PaeAspDH、ReuAspDHともに、AfAspDHに比べ活性が大きく増加している。

【0059】

ここで、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。図7に示したように、PaeAspDHおよびReuAspDHは、37 で、AfAspDHより、それぞれ約25倍、約60倍高い還元的アミノ化活性を示している。また、NH₃のKm値も減少していることから、PaeAspDH、ReuAspDHともに常温にて工業的な利用が可能であることが確認できる。なお、想定上BjaAspDHは、PaeAspDHおよびReuAspDHと同程度の良好な発現が見られたが、アスパラギン酸脱水素酵素活性がないことも再度確認した。図1に示した検索結果では、想定上BjaAspDHはAfAspDHとアミノ酸配列の相同性はかなり高いが、この事実は、単に相同性が高いだけでは、酵素活性は予見できないことを意味している。

40

【0060】

〔酵素の性質：CDスペクトルによる耐熱性の検討〕

次に、各酵素を温度コントロールシステムJASCO PTC 343 (日本分光社製) とJASCO J-720円二色性分散計 (日本分光社製) を用いて222 nmにおける吸光度をモニタリングし、タンパク質の熱変性を測定した。図8に示したように、PaeAspDHとReuAspDHの50%変性温度は、同程度である。また、塩またはグリセロール存在下で50%変性温度がそれぞれ10以上上昇することから、条件によっては熱安定性をさらに高めることが可能となる。な

50

お、図7には、これらの結果も反映させている。

【0061】

以上をまとめると、PaeAspDHおよびReuAspDHは、良好なアスパラギン酸脱水素酵素活性を有しており、かつ、それらは、常温でも活性が高く、熱安定性も良好であることが分かった。反対に、想定上BjaAspDHはアミノ酸配列の相同性は高いもののアスパラギン酸脱水素酵素活性は見られなかった。

【0062】

<3> L - アスパラギン酸の生産方法

次に、PaeAspDHおよびReuAspDHを用いたL - アスパラギン酸の生産方法について説明する。ここでは、酵素法と発酵法によるL - アスパラギン酸の生産について説明する。図9は、フマル酸を原料としたL - アスパラギン酸の反応図である。図示したように、原料として、フマル酸およびアンモニウム塩（例えば塩化アンモニウムあるいはフマル酸アンモニウム）を供給し、触媒として、上記説明したEcFum、BsMDH、および、PaeAspDH（またはReuAspDH）を加えることで、L - アスパラギン酸を生産可能となる。

10

【0063】

<3-1：酵素法>

以降では、PaeAspDHを用いた場合の工業的生産方法について述べるが、ReuAspDHを用いた場合も同様に工業生産可能である。

まず、単独でそれぞれEcFum、BsMDH、PaeAspDHを発現するリコンビナント大腸菌に図10で示すトルエン処理を行い、さまざまな組合せで混合した。これらに対し、フマル酸、L - リンゴ酸、または、DL - リンゴ酸を基質として加えて反応させ、生成したL - アスパラギン酸濃度を測定した。反応組成は図11に示したとおりである。結果を図12に示す。3酵素を混合し、基質をフマル酸とした場合に最も生成量が多くなることが確認できた。また、PaeAspDHを含む系で特に多量のL - アスパラギン酸生成が確認できることから、このL - アスパラギン酸生成はPaeAspDHによるものであるということが確認できた。

20

【0064】

図12に示した結果に基づいて、EcFum、BsMDH、PaeAspDHの3酵素を用い、かつフマル酸を基質とした場合の最適条件を検討したところ図13に示す条件が得られた。この条件で、EcFum、BsMDH、PaeAspDHを総て導入したリコンビナント大腸菌を用いてL - アスパラギン酸を生成させた。結果を図14に示す。なお、ここでは、比較のためAfAspDHを用いた場合の比較例も示している。

30

【0065】

図示したように、本発明者らにより得られたPaeAspDHを用いた場合、その転換効率は93.1%に達し、これは、従来のAfAspDHを用いた場合の4倍以上の高い値である。また、補酵素NAD⁺を加えた場合と比較しても大きな差はなく（むしろ添加しない方が良い結果となっている）、大腸菌体中に存在するNADを利用していると考えられる。すなわち、この結果は、常温で反応が進行し、高価な補酵素NAD⁺の添加を必要とせず、特筆すべき結果といえる。特に、アスパルターゼを用いた工業的生産の転換効率が約90%といわれているので、本発明は同等以上の作用効果を発揮しているといえる。

【0066】

さらに、多くのアミノ酸発酵で行われているフィードバッチ法を図15に示すような組成ないし手順で行った。機器の制約から6時間までの測定結果ではあるが、反応開始から6時間のところまでで反応速度は2.08 M/hr/g wetであり、転換効率は89.0%という値が得られた。これにより、高効率の連続生産も可能であることが分かった。

40

【0067】

<3-2：発酵法>

次に発酵法の検討をおこなった。

リコンビナント大腸菌（pET11a/paasd,pSTV28/fumC-mdh）をグルコースM9培地で24~26時間培養後（37℃）、50 mMコハク酸および界面活性剤トリトンX-100を10

50

mg/mlの濃度で加えさらに6時間培養したところ、反応速度は51.2

mM/hr/g wetであり転換効率は61.6%という値が得られた。この結果から、本反応法はアスパラギン酸発酵生産に応用できる可能性が十分あるといえる。なお、原料として、コハク酸に代え、クエン酸やグルコースを用いても、L-アスパラギン酸の生成が認められた。特筆すべきは、原料(炭素源)がフマル酸でなく、コハク酸やクエン酸やグルコースであっても、L-アスパラギン酸の生成が認められる点であって、作成したりコンビナント大腸菌は、原料選択の自由度を高め発酵法による多様な工業的生産に適しているといえる。

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明のAspDHを用いることにより、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST、GOT)の活性を測定することが可能となる。

10

【図1】

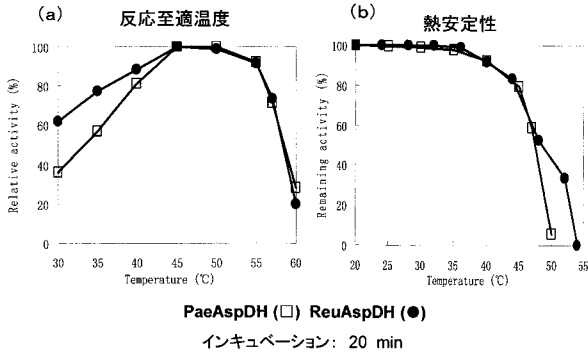
AfAspDHとの同源性検索

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	452	e-126
Methanobrevibacter smithii ATCC 35061	181	2e-44
Methanospirillum hungatei JF-1	173	7e-42
Methanococcus labreanus Z	168	2e-40
Methanococcus marisnigri JR1	165	2e-39
Halstonia eutropha JMP134	124	3e-27
Thermosiphon melanesiensis B1429	122	1e-26
Ochrobactrum anthropi ATCC 49188	121	2e-26
Bordetella parapertussis strain 12822	120	5e-26
Pseudomonas aeruginosa PA01	119	1e-25
Bordetella pertussis strain Tohana I	118	2e-25
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH ...	117	4e-25
Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA	115	2e-24
Silicibacter sp. TM1040	113	8e-24
Jannaschia sp. CBS1	110	4e-23
Bordetella pertussis strain Tohana I	105	2e-21
Bordetella parapertussis strain 12822	102	1e-20
Rhodococcus sp. YK2 genes for hypothetical p...	101	2e-20
Bordetella avium 197M	100	5e-20
Pyrobaculum aerophilum strain IM2 section 16...	97	5e-19
Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA	93	1e-17

【図2】

クローン化菌体(大量培養後)
 | 1 mM EDTA を含む 10 mM KP buffer pH 6.5 2 vol
 French Press
 |
 超遠心 37,000 rpm 4°C 1hr
 sup (Crude Extract)
 |
 DEAE-Toyopearl 650S (HPLC)
 | 0~0.5 M NaCl を含む 10 mM KP buffer pH 6.5 で溶出
 活性画分
 Amicon Ultra で濃縮
 |
 Blue-Toyopearl HC-650M (HPLC)
 | 0.2~2 M NaCl を含む 10 mM KP buffer pH 6.5 で溶出
 活性画分
 Amicon Ultra で濃縮
 |
 Superdex TM 200 10/300 GL (HPLC)
 |
 0.2M NaCl を含む 10 mM KP buffer pH 6.5 で溶出
 Amicon Ultra で濃縮
 |
 Purified AspDH

【 図 4 】



【 図 5 】

< オキサロ酢酸還元アミノ化反応 >

Tris-HCl pH 7.2 50 mM
 NH₄Cl 50 mM
 NADH 0.2 mM
 OAA 4 mM
 蒸留水

37°C 1~2 min

AspDH 10 μl

A₃₄₀ の吸光変化を測定 (Total 1000 μl)

【 図 6 】

< L-アスパラギン酸酸化脱アミノ化反応 >

Glycine-NaOH pH 9.6 50 mM
 NAD⁺ 0.3 mM
 L-Aspartate 80 mM
 蒸留水

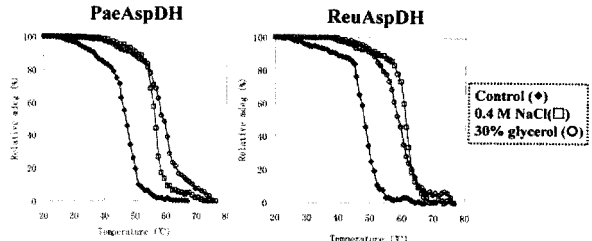
37°C 1~2 min

AspDH 10 μl

A₃₄₀ の吸光変化を測定 (Total 1000 μl)

【 図 8 】

CD熱変成曲線



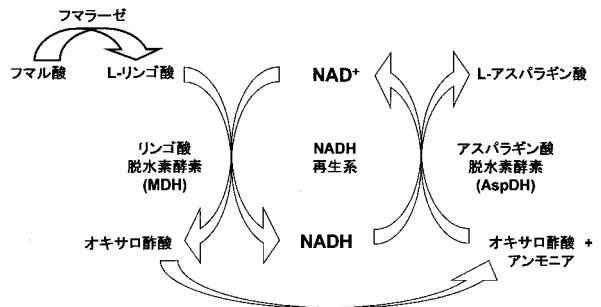
酵素	50%失活温度(°C)	T _m 値(°C)		
		10 mM KP	10 mM KP + 0.4 M NaCl	10 mM KP + 30% glycerol
PaeAspDH	48	47	56.5	59
ReuAspDH	49	48	61.5	59

【 図 7 】

	K _m (mM)			k _{cat} (s ⁻¹)			k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)		
	PaeAspDH	ReuAspDH	AfAspDH	PaeAspDH	ReuAspDH	AfAspDH	PaeAspDH	ReuAspDH	AfAspDH
L-Asp(NAD)	4.87	4.97	0.19	60	119	1.0	12.32	23.94	5.26
NAD	0.47	0.93	0.11	-	-	-	-	-	-
OAA(NADH)	2.12	3.39	1.2	68	166	2.7	32.08	48.97	2.25
NH ₂ (NADH)	10.11	10.72	167	-	-	-	-	-	-
NADH	0.045	0.065	0.014	-	-	-	-	-	-

【 図 9 】

AspDH-MDH共役系とフマラーゼを用いるL-ASP製造法



【 図 1 0 】

組換え大腸菌体

— KP Buffer (pH 7.2) 2 vol に懸濁
0.5 % Toluene

20°C 1 hr 振盪

5,000 rpm 15 min 遠心

ppt.

KP Buffer (pH 7.2) 2 vol に懸濁

} 洗浄
5 times

5,000 rpm 15 min 遠心

ppt.(膜透過性付与大腸菌体)

【 図 1 1 】

KP buffer pH 8.2	50 mM
Fumarate, L-Malate, DL-Malate	50 mM
NH ₄ Cl	150 mM
NAD ⁺	1 mM
E.coli cells	0.6 g
Total 1 ml	

37°C, 1 hr, incubation

【 図 1 5 】

KP Buffer (pH8.2)	50 mM
Fumarate	200 mM
NH ₄ Cl	200 mM
蒸留水	
菌体	0.05 g
Total 10 ml	

↓

37°Cで振盪

1 hr 毎に Fumarate・NH₄Cl 各 100 mM を添加

【 図 1 2 】

各種組合せによる生成L-Asp濃度(mM)

	Fumarate	L-Malate	DL-Malate
EcFumarase (Fu)	3.05	2.41	1.21
BsMDH (Ma)	3.53	3.13	2.84
PaeAspDH (As)	21.11	18.12	10.35

Fu/Ma	4.02	3.21	3.01
Fu/As	21.40	10.27	8.71
Ma/As	23.30	19.76	14.26
Fu/Ma/As	28.06	20.01	15.31

【 図 1 3 】

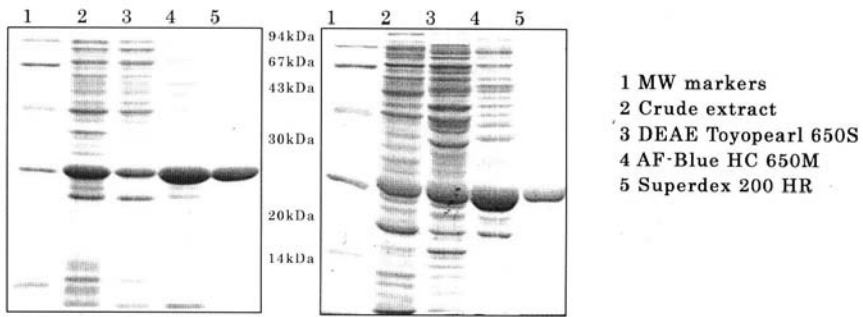
KP Buffer (pH 8.2)	50 mM
フマル酸	120 mM
NH ₄ Cl	120 mM
蒸留水	
菌体	0.055 g
Total 1 ml	

【 図 1 4 】

酵素	反応温度 (°C)	基質 (炭素源)	補酵素NAD ⁺	L-Asp mM/hr/wet g	転換効率 (%)
PaAspDH	37	フマル酸	なし	116.4	93.1
PaAspDH	37	フマル酸	添加	98.6	78.8
AfAspDH	45	L-リンゴ酸	添加	42.9	21.5

【 図 3 】

PaeAspDH(左)・ReuAspDH(右) 各精製段階での SDS-PAGE



【 配 列 表 】

2010183860000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 柴田 均

島根県松江市西川津町 1 0 6 0 国立大学法人島根大学 生物資源科学部内

(72)発明者 芦田 裕之

島根県松江市西川津町 1 0 6 0 国立大学法人島根大学 生物資源科学部内

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA08 CA02 DA06 GA11

4B050 CC03 DD02 EE10 LL05

4B064 AE17 CA19 CA21 CC24 DA16

4B065 AA01Y AA19Y AA26X AA42Y AB01 BA02 CA28 CA60