

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5882415号
(P5882415)

(45) 発行日 平成28年3月9日(2016.3.9)

(24) 登録日 平成28年2月12日(2016.2.12)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 P 19/14 (2006.01)	C 1 2 P	19/14 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N	9/24
C 1 2 R 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/21

請求項の数 4 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-158037 (P2014-158037)	(73) 特許権者	000226415 物産フードサイエンス株式会社 愛知県知多市北浜町24番12
(22) 出願日	平成26年8月1日(2014.8.1)	(73) 特許権者	311013177 日本マイクロバイオファーマ株式会社 東京都中央区京橋一丁目3番1号
(65) 公開番号	特開2015-142549 (P2015-142549A)	(74) 代理人	100110766 弁理士 佐川 慎悟
(43) 公開日	平成27年8月6日(2015.8.6)	(74) 代理人	100133260 弁理士 小林 基子
審査請求日	平成27年7月13日(2015.7.13)	(74) 代理人	100169340 弁理士 川野 陽輔
(31) 優先権主張番号	特願2013-273402 (P2013-273402)	(74) 代理人	100195682 弁理士 江部 陽子
(32) 優先日	平成25年12月27日(2013.12.27)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
早期審査対象出願			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フルクトースが付加された糖質の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌、当該発現させた大腸菌の死菌を含む組成物または当該発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであって下記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドに、末端にフルクトース残基を含む糖質および受容体基質を接触させる工程を有する、フルクトースが付加された糖質の製造方法；

(a) 下記(A)～(E)のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸；

(A) 配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列、

(イ) アミノ酸配列(A)において、1～38個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる -フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(ウ) 配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列、

(エ) アミノ酸配列(ウ)において、1～39個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる -フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(b) -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項2】

下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌または下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現させた大腸菌 ;

(a) 下記 (ア) ~ (エ) のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸 ;

(ア) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列、

(イ) アミノ酸配列 (ア) において、1 ~ 3 8 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(ウ) 配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列、

(エ) アミノ酸配列 (ウ) において、1 ~ 3 9 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項 3】

下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌を含む組成物 ;

(a) 下記 (ア) ~ (エ) のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸 ;

(ア) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列、

(イ) アミノ酸配列 (ア) において、1 ~ 3 8 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(ウ) 配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列、

(エ) アミノ酸配列 (ウ) において、1 ~ 3 9 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項 4】

下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドの製造方法であって、下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして大腸菌に発現させる工程を有する前記製造方法 ;

(a) 下記 (ア) ~ (エ) のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸 ;

(ア) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列、

(イ) アミノ酸配列 (ア) において、1 ~ 3 8 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(ウ) 配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列、

(エ) アミノ酸配列 (ウ) において、1 ~ 3 9 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるアンカータンパク質の機能を有するアミノ酸配列、

(b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フルクトースが付加された糖質の製造方法に関し、特に、 - フルクトフラノシダーゼによりフルクトースが付加された糖質を効率的に製造することができる製造方

10

20

30

40

50

法、当該製造方法に用いることができる大腸菌、組成物およびポリペプチド、ならびに当該製造方法により製造されたフルクトースが付加された糖質に関する。

【背景技術】

【0002】

- フルクトフラノシダーゼは、末端にフルクトース残基を含む糖質のフルクトースを認識して加水分解する酵素である。 - フルクトフラノシダーゼの中には、加水分解によって生じたフルクトースを受容体基質に転移させる活性を有するものも存在する。すなわち、当該活性を有する - フルクトフラノシダーゼによって、糖質や糖質以外の物質にフルクトースを転移させることにより、フルクトースが付加された糖質を製造することができる。

10

【0003】

- フルクトフラノシダーゼによるフルクトースが付加された糖質の製造方法としては、これまでに、例えば、 - フルクトフラノシダーゼを保持するコウジ菌菌糸固定化担体に糖基質を接触させる方法（特許文献1）や、ザイモナス モビリス由来のレバンスクラゼまたは菌体外インペルターゼを用いる方法（特許文献2）が、それぞれ開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2013-252056号公報

20

【特許文献2】特開2006-67958号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、特許文献1に記載の方法は、生来 - フルクトフラノシダーゼを有するコウジ菌の菌糸を珪藻土やパーライトといった担体に固定化してオリゴ糖を製造する方法であり、外来の - フルクトフラノシダーゼを用いて、簡便かつ効率的にオリゴ糖を製造するのは容易でない。なぜなら、この方法では、外来の - フルクトフラノシダーゼを導入してオリゴ糖を製造する際は、正確な評価のため、予めコウジ菌の内在性 - フルクトフラノシダーゼの活性を欠損させる必要があり、取り扱いの容易さに欠けるからである。特許文献2に記載の方法もまた、ザイモナス モビリス由来の - フルクトフラノシダーゼを用いてフルクトース配糖体を製造する方法であり、 - フルクトフラノシダーゼの由来を問わず、フルクトース配糖体を製造することができる方法ではない。

30

【0006】

本発明は、このような問題点を解決するためになされたものであって、生来 - フルクトフラノシダーゼを有しないことから、導入した - フルクトフラノシダーゼの活性評価が容易で、かつ形質転換や培養といった取り扱いも容易な大腸菌に外来の - フルクトフラノシダーゼを発現させることにより、 - フルクトフラノシダーゼの由来を問わず、効率的かつ簡便にフルクトースが付加された糖質を製造することができる製造方法、当該製造方法に用いることができる大腸菌、組成物およびポリペプチド、ならびに当該製造方法により製造されたフルクトースが付加された糖質を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意研究の結果、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と - フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させた大腸菌を用いることにより、効率的かつ簡便にフルクトースが付加された糖質を製造することができることを見出して、下記の各発明を完成した。

【0008】

(1) 本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法は、下記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌、当該発現させた大腸菌の死菌を含

50

む組成物または当該発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであって下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドに、末端にフルクトース残基を含む糖質および受容体基質を接触させる工程を有する； (a) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列または配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列のいずれかと 4 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、 (b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

【 0 0 0 9 】

(2) 本発明に係る大腸菌は、下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌または下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現させた大腸菌である； (a) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列または配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列のいずれかと 4 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、 (b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

10

【 0 0 1 0 】

(3) 本発明に係る組成物は、下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌を含む組成物である； (a) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列または配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列のいずれかと 4 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、 (b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

【 0 0 1 1 】

(4) 本発明に係るポリペプチドは、下記 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであって、下記 (b) の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドである； (a) 配列番号 6 に示す P g s A タンパク質のアミノ酸配列または配列番号 3 4 に示す C a p A タンパク質のアミノ酸配列のいずれかと 4 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、 (b) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

20

【 0 0 1 2 】

(5) 本発明に係るフルクトースが付加された糖質は、 (1) に記載の製造方法により製造された、フルクトースが付加された糖質である。

【 発明の効果 】

30

【 0 0 1 3 】

本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法、もしくは当該製造方法に用いることができる大腸菌、組成物またはポリペプチドによれば、種々の生物由来の - フルクトフラノシダーゼを用いて、簡便かつ効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 本発明に係る「 (a) および (b) の核酸を 1 のポリペプチドとして発現させた大腸菌」の一実施形態を模式的に示す図である。

【 図 2 】 p H T 4 3 - p g s A - i n d i c a 組換えベクターまたは p H T 4 3 プラスミドにより形質転換した組換えサブティリス菌に 4 5 % スクロース溶液を接触させて得た反応液中の糖組成を示す H P L C チャートである。

40

【 図 3 】 p W H 1 5 2 0 - c a p A _ o p t i - i n d i c a 組換えベクターまたは p W H 1 5 2 0 プラスミドにより形質転換した組換えメガテリウム菌に 4 5 % スクロース溶液を接触させて得た反応液中の糖組成を示す H P L C チャートである。

【 図 4 】 p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した組換え大腸菌に、受容体基質としてヒドロキノン、供与体基質としてスクロースを接触させて得た反応液 (サンプル反応液) および各種のコントロール反応液 (コントロール反応液 N o . 1 ~ 3) 中の物質の組成を示す H P L C チャートである。

【 発明を実施するための形態 】

50

【 0 0 1 5 】

以下、本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法、当該製造方法に用いることができる大腸菌、組成物およびポリペプチド、ならびに当該製造方法により製造されたフルクトースが付加された糖質について詳細に説明する。

【 0 0 1 6 】

本発明において、「糖質」には、 $C_n(H_2O)_m$ で表される化合物のほか、多価アルコールのアルデヒド、ケトン誘導体、それらに近縁の誘導体や縮合体が含まれる。すなわち、本発明に係る「糖質」には、単糖やオリゴ糖、多糖のほか、これらがタンパク質や脂質などと共有結合した複合脂質、単糖やオリゴ糖の還元基にアルコール、フェノール、サポニン、色素などの色素などのアグリコンが結合した配糖体が含まれる（岩波生物学事典 10
第4版；岩波書店発行、2005年）。また、本発明に係る「糖質」は、「糖」や「炭水化合物」と交換可能に用いられる場合がある。

【 0 0 1 7 】

本発明において、「フルクトースが付加された糖質」とは、構成物質として1以上のフルクトース残基を含む化合物をいう。本発明に係る「フルクトースが付加された糖質」として、具体的には、例えば、フルクトースとフルクトース以外の単糖とが結合してなる二糖や、ニストースあるいはケストースなどのフルクトース残基を含むオリゴ糖、フルクトース残基を含む多糖のほか、フルクトース残基を含む糖アルコールや、フルクトースと糖以外の物質（アグリコン）が結合してなる配糖体などを挙げるることができる。

【 0 0 1 8 】

なお、本発明において、オリゴ糖は、3～十数個程度の単糖が結合してなる糖をいい、「少糖」、「寡糖」と交換可能に用いられる。また、配糖体は、一般に、糖と糖以外の物質（アグリコン）とが結合した有機化合物をいい（百科事典マイペディア；日立ソリューションズ・ビジネス社、2010年5月）、詳細には、糖のヘミアセタール性またはヘミケタール性ヒドロキシ基が、糖以外の物質の原子あるいは反応基で置換した化合物をいう（生化学事典第4版；東京化学同人社発行、2007年12月）。本発明に係る配糖体は、天然に存在するものでも人工的に合成したものでもよく、O-グリコシドのほか、N-グリコシド、S-グリコシド、C-グリコシドが含まれる。

【 0 0 1 9 】

本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法は、
A) 下記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌、
(a) 配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、
(b) -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸、
B) 上記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌を含む組成物、
C) 上記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであって上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペチド、
以上A)～C)のいずれかに、末端にフルクトース残基を含む糖質および受容体基質を接触させる工程を有する。

【 0 0 2 0 】

ここで、A)の「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌」の一実施形態を、模式的に図1に示す。図1に示すように、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の一実施形態においては、(a)の核酸にコードされた、PgsAタンパク質のアミノ酸配列またはCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質の部分が大腸菌の細胞膜に結合することにより、(b)の核酸にコードされた-フルクトフラノシダーゼの部分が大腸菌の細胞表面に発現していると、本発明者らは考えている。

【0021】

なお、本発明において「核酸」は、複数のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合により結合してなる化合物をいい、デオキシリボ核酸(DNA)でもよくリボ核酸(RNA)でもよい。また、本発明において「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸がペプチド結合により結合してなる化合物をいい、その配列長は問わず、タンパク質と交換可能に用いられる場合がある。

【0022】

本発明において、「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させる」とは、上記(a)の核酸にコードされるアミノ酸配列と、上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列とを、1本のポリペプチドとして発現させることをいう。ここで、当該1本のポリペプチドにおいて、(a)の核酸にコードされるアミノ酸配列と(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列との順序は問わず、どちらがアミノ末端側でもよく、どちらがカルボキシル末端側でもよい。また、当該1本のポリペプチドは、(a)の核酸にコードされるアミノ酸配列および(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列のみからなるものでもよく、(a)の核酸にコードされるアミノ酸配列と(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列との間やそれらのアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシル末端に、1または複数個の他のアミノ酸が挿入または付加されていてもよい。

【0023】

(a)の「配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列」は、(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列からなる -フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質(以下、単に「アンカータンパク質」という場合がある。)のアミノ酸配列である。ここで、「配列番号6に示すPgsAタンパク質」は、*Bacillus subtilis*由来のアンカータンパク質であり、「配列番号34に示すCapAタンパク質」は、*Bacillus megaterium* DSM319株由来のアンカータンパク質である。本発明においては、後述する実施例4で示すように、PgsAタンパク質のアミノ酸配列またはCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質を、 -フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質として用いることができる。

【0024】

配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列とそれ以外のアミノ酸配列との同一性は、常法に従って確認することができる。例えば、FASTA(<http://www.genome.jp/tools/fast/>)、Basic local alignment search tool(BLAST;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Position-Specific Iterated BLAST(PSI-BLAST;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)などのプログラムを用いて確認することができる。なお、「同一性」とは一致性を指し、「identity」と交換可能に用いられる。

【0025】

配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号6または配列番号34のアミノ酸配列において、配列番号6または配列番号34のアミノ酸配列との同一性が45%未満とならない範囲で1または複数個のアミノ酸を欠失、置換、挿入または付加することにより得ることができる。また、常法に従い、Protein Information Resource(PIR)、SWISS-PROT、TrEMBL、Protein Research Foundation(PRF)、GenPept(NCBI Protein database)などのアミノ酸配列データベースから、FASTA(<http://www.genome.jp/tools/>

10

20

30

40

50

fasta/)、Basic local alignment search tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、Position-Specific Iterated BLAST (PSI-BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)などのプログラムを用いて配列番号6または配列番号34のアミノ酸配列とのホモロジー検索をすることにより得ることができる。

【0026】

配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列は、細菌や酵母、カビ、植物などのいずれの生物に由来するものでもよい。配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列として、具体的には、例えば、配列番号6または配列番号34のアミノ酸配列において、配列番号6または配列番号34のアミノ酸配列との同一性が45%未満とまらない範囲で1または複数個のアミノ酸を欠失、置換、挿入または付加したアミノ酸配列を挙げることができる。また、配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列と45%以上の同一性を有するアミノ酸配列としては、例えば、*Bacillus tequiensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(National Center for Biotechnology Information (NCBI) WP_024714260.1; 同一性96%)や、*Bacillus atrophaeus*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_03326671.1; 同一性86%)、*Bacillus siamensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_016937733.1; 同一性78%)、*Bacillus sonorensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_006639316.1; 同一性66%)などを挙げることができる。また、配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列と45%以上の同一性を有するアミノ酸配列としては、例えば、*Bacillus flexus*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_025908233.1; 同一性73%)、*Bacillus anthracis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_001253153.1; 同一性53%)、*Bacillus cereus*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_001996162.1; 同一性53%)、*Bacillus endophyticus*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_019393395.1; 同一性52%)、*Bacillus thuringiensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_001170049.1; 同一性51%)、*Bacillus megaterium*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_013082091.1; 同一性51%)、*Bacillus licheniformis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI AGS77947.1; 同一性47%)、*Bacillus safensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_024423669.1; 同一性47%)、*Bacillus pumilus*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_017360004.1; 同一性47%)、*Bacillus stratosphericus*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_007497516.1; 同一性47%)、*Bacillus siamensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_016937733.1; 同一性47%)、*Bacillus vallismortis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_010328824.1; 同一性46%)、*Bacillus mojavenensis*由来アンカータンパク質のアミノ酸配列(NCBI WP_010332115.1; 同一性46%)などを挙げることができる。

【0027】

ここで、本発明において「配列番号6または配列番号34のアミノ酸配列において、配

10

20

30

40

50

列番号6または配列番号34のアミノ酸配列との同一性が45%未満とならない範囲で1または複数個のアミノ酸を欠失、置換、挿入または付加したアミノ酸配列」という場合の、欠失、置換、挿入または付加するアミノ酸の個数は、例えば、1~200個、1~180個、1~160個、1~140個、1~120個、1~100個、1~80個、好ましくは1~60個、より好ましくは1~50個、さらに好ましくは1~40個、よりさらに好ましくは1~30個を挙げることができる。

【0028】

本発明に係る「 α -フルクトフラノシダーゼ」は、末端にフルクトース残基を含む糖質のフルクトースを認識して加水分解するフルクトース加水分解活性と、加水分解によって生じたフルクトースを受容体基質に転移させるフルクトース転移活性とを有する酵素である。本発明に係る「 α -フルクトフラノシダーゼ」は、酵母、カビ、植物などの生物に由来する野生型の α -フルクトフラノシダーゼであってもよく、野生型の α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列に対して、1または2以上のアミノ酸変異を導入したアミノ酸配列からなる α -フルクトフラノシダーゼであってもよい。なお、本発明において、「 α -フルクトフラノシダーゼ」は、「フルクトシルトランスフェラーゼ」、「サッカラーゼ」、「 α -D-フルクトフラノシダーゼ」、「インベルターゼ」、「インバーターゼ」または「インベルチン」と交換可能に用いられる場合がある。

【0029】

ここで、本発明において、「受容体基質」とは、 α -フルクトフラノシダーゼのフルクトース転移活性により、フルクトースの転移を受けて、フルクトースが付加され得る物質をいう。また、「供与体基質」とは、 α -フルクトフラノシダーゼのフルクトース加水分解活性によりフルクトースの加水分解を受けて、受容体基質にフルクトースを供与することができる物質をいう。

【0030】

すなわち、本発明において、「末端にフルクトース残基を含む糖質」とは、供与体基質を指す。本発明に係る「末端にフルクトース残基を含む糖質」として、具体的には、例えば、スクロースなどの末端にフルクトース残基を含む二糖やケストースなどの末端にフルクトース残基を含むオリゴ糖、末端にフルクトース残基を含む多糖のほか、末端にフルクトース残基を含む糖アルコールや末端にフルクトース残基を含む配糖体などを挙げることができる。

【0031】

また、本発明に係る「受容体基質」は、後述する実施例6(1)および(2)に示すように、単糖や二糖、オリゴ糖、配糖体などの糖質であってもよく、ヒドロキノンなどの糖質以外の物質であってもよい。本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法においては、例えば、受容体基質を単糖とすれば二糖を製造し、受容体基質を二糖やオリゴ糖とすればオリゴ糖を製造し、受容体基質を糖以外の物質とすれば配糖体を製造することができる。

【0032】

なお、本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法において、「末端にフルクトース残基を含む糖質」と「受容体基質」とは、同じ物質であってもよく、異なる物質であってもよい。

【0033】

本発明に係る「 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列」として、具体的には、例えば、*Beijerinckia indica* subsp. *indica* ATCC 9039由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(GenBank: ACB95643.1; 配列番号2)や、*Burkholderia phymatum* STM815由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(GenBank: ACC75109.1; 配列番号18)、*Aspergillus kawachi* IFO4303由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(GenBank: GAA88101.1; 配列番号22)などを挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明において、上記(a)の配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列、あるいは、上記(b)の -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(以下、「所定のアミノ酸配列」という。)をコードする核酸は、所定のアミノ酸配列からなるタンパク質を発現する生物から抽出した核酸を鋳型にして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより得ることができる。また、所定のアミノ酸配列を基にして、コドンとアミノ酸との対応関係を示す公知の遺伝暗号に従って核酸の配列を特定した後、市販されている種々の核酸合成機を用いて合成することもできる。

【0035】

本発明に係る「大腸菌」(*Escherichia coli*)は、上記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させることができる限り、どのような菌株でもよい。

【0036】

本発明に係る「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌」は、常法に従って、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現するように設計した核酸を大腸菌に導入することにより得ることができる。そのような方法として、例えば、後述する実施例1(2)および実施例1(5)に示す方法を挙げることができる。すなわち、まず、1のベクターのプロモーター配列とターミネーター配列との間に(a)および(b)の核酸を挿入して、組換えベクターを得る。このとき、(a)の核酸と(b)の核酸との間に、終始コドンが含まれないようにすれば、当該組み換えベクターを導入した大腸菌において、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させることができる。続いて、得られた組換えベクターを大腸菌に導入して一定期間培養することにより、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌を得ることができる。

【0037】

次に、上記B)の、本発明に係る「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌を含む組成物」は、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌を含む限り、その形態は問わず、例えば、粉末状でもよく液体状でもよい。上記B)の組成物は、例えば、上述の、本発明に係る(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌を溶菌、殺菌あるいは滅菌することにより得ることができる。ここで、大腸菌を溶菌、殺菌あるいは滅菌する方法は、細菌に対して一般的に用いられる溶菌方法、殺菌方法あるいは滅菌方法を挙げることができ、具体的には、例えば、高張液に大腸菌を懸濁する方法や、大腸菌を破碎、磨砕、凍結融解、超音波処理あるいは熱処理する方法を挙げることができる。また、上記B)の組成物は、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌に相当する成分を含む限り、塩沈澱、溶媒沈澱、透析、限外ろ過、ゲルろ過、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、等電点電気泳動などの何らかの処理に供したものでよく、処理に供していないものでよい。

【0038】

次に、上記C)の、本発明に係る「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであって上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド」は、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであり、かつ、上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列を含む限り、上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列のみからなるポリペプチドでもよく、上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列のアミノ末端および/またはカルボキシル末端に、1または複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであってもよい。

【0039】

10

20

30

40

50

上記C)のポリペプチドは、例えば、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌から、常法に従いポリペプチドを抽出ないし精製することにより得ることができる。ポリペプチドを抽出ないし精製する方法としては、例えば、破碎、磨砕、緩衝液への懸濁、凍結融解、超音波処理、遠心分離、熱処理、塩沈澱、溶媒沈澱、透析、限外ろ過、ゲルろ過、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、等電点電気泳動などの方法を挙げることができる。また、より簡便には、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌を、そのまま、本発明に係る上記C)のポリペプチドとして得てもよい。すなわち、上記C)のポリペプチドは、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の細胞膜に結合した状態のものでもよく、当該大腸菌の細胞膜に結合していない状態のものでもよい。

10

【0040】

本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法において、上記A)~C)のいずれかに、末端にフルクトース残基を含む糖質および受容体基質を接触させる方法としては、例えば、上記A)~C)のいずれかを、末端にフルクトース残基を含む糖質および受容体基質を含む溶液に添加し、30~50で一定時間程度静置あるいは振盪する方法を挙げることができる。

【0041】

本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法には、本発明の特徴を損なわない限り、他の工程を有してもよく、例えば、クロマトグラフィーによるフルクトースが付加された糖質の分離工程や煎糖などの結晶化工程、乾燥工程、洗浄工程、濾過工程、殺菌工程、食品添加物を添加する工程などを有してもよい。

20

【0042】

次に、本発明は、大腸菌を提供する。本発明に係る大腸菌は、下記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌または下記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌である；

(a) 配列番号6に示すPgsAタンパク質のアミノ酸配列または配列番号34に示すCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸、

30

(b) -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸。

なお、本発明に係る大腸菌において、上述した本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法と同じまたは相当する構成については、再度の説明を省略する。

【0043】

ここで、「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌」とは、(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現できる態様で含むが、未だ(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現していない大腸菌をいう。

【0044】

本発明に係る「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌」は、上述の、本発明に係る「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌」を得る方法と同様の方法において、転写開始に何らかの誘導因子を必要とする発現誘導型のプロモーター配列や、リプレッサーの解離が必要なオペレーター配列を用いることにより、得ることができる。

40

すなわち、発現誘導型のプロモーター配列を用いた場合は、誘導因子を与えずに培養すれば、「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌」を得ることができる。このような発現誘導型のプロモーター配列としては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター配列(誘導因子；アルコール、Waring RBら、Gene、第79巻、第119~130頁、1989年)、-アミラーゼ遺伝子のプロモーター配列(誘導因子；澱粉やマルトースなど、Tada S.ら、Mol. Gen. Genet.、第229巻、第301~306頁、1991年)、ThiAなどのア

50

スベルギルス属菌由来のプロモーター配列（誘導因子；チアミン、Shoji JYら、FEMS Microbiol. Lett.、第244巻、第41～46頁、2005年）などを挙げるができる。

また、リプレッサーの解離が必要なオペレーター配列を用いた場合は、リプレッサーの解離に必要な因子を与えずに培養すれば、「(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現可能に含む大腸菌」を得ることができる。このようなオペレーター配列としては、例えば、lacオペレーター配列（リプレッサーの解離に必要な因子；ラクトースやイソプロピル-D-ガラクトピラノシド（IPTG））などを挙げるができる。

【0045】

また、本発明は、組成物を提供する。本発明に係る組成物は、上記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌の死菌を含む組成物である。また、本発明は、ポリペプチドを提供する。本発明に係るポリペプチドは、上記(a)および(b)の核酸を1のポリペプチドとして発現させた大腸菌から得られたポリペプチドであって、上記(b)の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。なお、本発明に係る組成物およびポリペプチドにおいて、上述した本発明に係るフルクトースが付加された糖質の製造方法と同じまたは相当する構成については、再度の説明を省略する。

【0046】

以下、本発明について、各実施例に基づいて説明する。なお、本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって示される特徴に限定されない。

【実施例】

【0047】

<実施例1> - フルクトフラノシダーゼ発現系の構築

(1) - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸の取得

Beijerinckia indica subsp. *indica* NBRC3744（以下「*B. Indica*」と略記する。）のフルクトフラノシダーゼのクローニングを行った。具体的には、まず、*B. Indica*のゲノムDNAを常法に従って抽出した。続いて、下記の配列番号3および配列番号4のプライマーを用いて、下記の条件でポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction；PCR）を行うことにより*B. Indica*由来フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅し、常法に従ってシーケンスを行って、全長の塩基配列を決定した。*B. Indica*由来フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAの全長の塩基配列を配列番号1に、また、それにコードされる*B. Indica*由来フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列を配列番号2に、それぞれ示す。

【0048】

《*B. Indica*由来フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；*B. Indica*のゲノムDNA

フォワードプライマー；5'-ATGGCAAGTCGATCGTTTAATGTTTG TATAC-3'（配列番号3）

リバースプライマー；5'-ACGTGGCGATCATCGAAAACATAACCG GCA-3'（配列番号4）

PCR用酵素；KOD-Plus-（東洋紡社）

反応条件；95℃で10秒、60℃で20秒および68℃で2分を1サイクルとして30サイクル。

【0049】

続いて、SignalP4.1サーバー（<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>）を用いてフルクトフラノシダーゼのシグナル配列を予測した。なお、配列番号2において、シグナル配列は1～28番目に相当する。

10

20

30

40

50

【0050】

(2) 細胞表面発現系の組換えベクターの作成

下記の条件でPCRを行うことにより、*Bacillus subtilis*のPgs Aタンパク質(GenBank: AB016245.1)をコードするDNAを増幅した。得られたPCR産物を常法に従って制限酵素Nde IおよびBgl IIで消化し、これをDNA断片1とした。また、PCR産物について、常法に従ってシーケンスを行い、Pgs Aタンパク質をコードするDNAの塩基配列を確認した。Pgs Aタンパク質をコードするDNAの塩基配列を配列番号5に、それにコードされるPgs Aタンパク質のアミノ酸配列を配列番号6にそれぞれ示す。

【0051】

《Pgs Aタンパク質をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；*Bacillus subtilis* (IAM1026、ATCC9466)のゲノムDNA

フォワードプライマー(下線はNde Iサイトを示す)；5' - AAACATATGAA AAAAGAACTGAGCTTTCATG - 3' (配列番号7)

リバープライマー(下線はBgl IIサイトを示す)；5' - AAAAGATCTTT TAGATTTTAGTTTGTCACTATG - 3' (配列番号8)

PCR用酵素；KOD-Plus-(東洋紡社)

反応条件；95 で10秒、60 で20秒および68 で2分を1サイクルとして30サイクル。

【0052】

次に、下記の条件でPCRを行い、*B. Indica*由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅し、常法に従って制限酵素BamHIおよびXhoIで消化して、これをDNA断片2とした。

【0053】

《*B. Indica*由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；本実施例1(1)の*B. Indica*のゲノムDNA

フォワードプライマー(下線はBamHIサイトを示す)；5' - AAAGGATCCT CGGGTTTACCCGATACCGACTCCGCA TTCGGGACA - 3' (配列番号9)

リバープライマー(下線はXhoIサイトを示す)；5' - CCCCTCGAGTTA CTGGCCGTTTCGTGACACCATGGCCATTACC - 3' (配列番号10)

PCR用酵素；KOD-Plus-(東洋紡社)

反応条件；95 で10秒、60 で20秒および68 で2分を1サイクルとして20サイクル。

【0054】

続いて、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (タカラバイオ社)を用いて、添付の使用書に従いpCDFDuet-1プラスミド(Merck社)のNde IサイトおよびXhoIサイトにDNA断片1およびDNA断片2を挿入し、これをpCDF-pgsA-indica組換えベクターとした。

【0055】

また、pCDF-pgsA-indica組換えベクターについて、常法に従って制限酵素Nde IおよびXhoIで消化した後、電気泳動を行って精製し、Pgs Aタンパク質および*B. Indica*由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列を1のポリペプチドとして発現し得るようにコードするDNAを得て、これをDNA断片3とした。続いて、同様にNde IおよびXhoIで消化したpET42a(+)プラスミド(Merck社)に、Ligation High ver. 2(東洋紡社)を用いてDNA断片3を挿入し、これをpET-pgsA-indica組換えベクターとした。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

(3) 菌体内発現系の組換えベクターの作成

下記の条件で本実施例 1 (2) の p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクターを鑄型として P C R を行うことにより、p g s A タンパク質をコードする DNA を含まない DNA を増幅し、これを DNA 断片 4 とした。続いて、L i g a t i o n H i g h v e r . 2 (東洋紡社) を用いて、DNA 断片 4 のセルフライゲーションを行い、これを p C D F - i n d i c a 組換えベクターとした。

【 0 0 5 7 】

《 B . I n d i c a 由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする DNA が挿入された p C D F D u e t - 1 プラスミド由来の DNA 増幅用 P C R の条件》

鑄型 ; 本実施例 1 (2) の p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクター
フォワードプライマー ; 5 ' - C A T A T G T C G G G T T A C C C G A T A C C G A C - 3 ' (配列番号 1 1)

リバースプライマー ; 5 ' - T A T A T C T C C T T C T T A T A C T T A A C T A A T A - 3 ' (配列番号 1 2)

P C R 用酵素 ; K O D - P l u s - N e o (東洋紡社)

反応条件 ; 9 8 で 1 0 秒、5 9 で 3 0 秒、6 8 で 2 分 4 0 秒を 1 サイクルとして 2 5 サイクル。

【 0 0 5 8 】

また、p C D F - i n d i c a 組換えベクターを、常法に従って制限酵素 N d e I および X h o I で消化することにより、B . I n d i c a 由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする DNA を得て、これを DNA 断片 5 とした。続いて、同様に N d e I および X h o I で消化した p E T 4 2 a (+) プラスミド (M e r c k 社) に、L i g a t i o n H i g h v e r . 2 (東洋紡社) を用いて DNA 断片 5 を挿入し、これを p E T - i n d i c a 組換えベクターとした。

【 0 0 5 9 】

(4) 菌体内発現系 (可溶性) の組換えベクターの作成

下記の条件で P C R を行い、B . I n d i c a 由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする DNA を増幅し、これを DNA 断片 6 とした。

【 0 0 6 0 】

《 B . I n d i c a 由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする DNA 増幅用 P C R の条件》

鑄型 ; 本実施例 1 (3) の p C D F - i n d i c a 組換えベクター

フォワードプライマー ; 5 ' - G A T G G T T C A A C T A G T T C G G G T T A C C C G A T A C C G - 3 ' (配列番号 1 3)

リバースプライマー ; 5 ' - G T G G T G G T G C T C G A G T T A C T G G C C G T T C G T G A - 3 ' (配列番号 1 4)

P C R 用酵素 ; K O D - P l u s - N e o (東洋紡社)

反応条件 ; 9 8 で 1 0 秒、6 8 で 5 0 を 1 サイクルとして 2 5 サイクル。

【 0 0 6 1 】

また、下記の条件で P C R を行い、p E T 4 2 a (+) プラスミド由来の DNA を増幅し、これを DNA 断片 7 とした。

【 0 0 6 2 】

《 p E T 4 2 a (+) プラスミド由来の DNA 増幅用 P C R の条件》

鑄型 ; p E T 4 2 a (+) プラスミド (M e r c k 社)

フォワードプライマー ; 5 ' - C T C G A G C A C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C A C T A A T T - 3 ' (配列番号 1 5)

リバースプライマー ; 5 ' - A C T A G T T G A A C C A T C C G A T T T - 3 ' (配列番号 1 6)

P C R 用酵素 ; K O D - P l u s - N e o (東洋紡社)

10

20

30

40

50

反応条件；98 で10秒、68 で2分50秒を1サイクルとして25サイクル。

【0063】

続いて、B. Indica由来 -フルクトフラノシダーゼとpET42a(+)プラスミドに含まれるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)とが1のポリペプチドとして発現するように、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)を用いてDNA断片6およびDNA断片7を連結し、これをpET-GST-indica組換えベクターとした。なお、GSTは可溶性タンパク質であり、GSTと目的タンパク質とを融合タンパク質として発現させることにより、目的タンパク質の可溶性が向上することが報告されている。

【0064】

(5) 形質転換および形質転換体の培養

本実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクターおよびpET-pgsA-indica組み換えベクター、本実施例1(3)のpCDF-indica組換えベクターおよびpET-indica組み換えベクター、ならびに本実施例1(4)のpET-GST-indica組換えベクターを、大腸菌BL21(DE3)株のコンピテントセル(コスモバイオ社)に導入して、形質転換体として組換え大腸菌を得た。

【0065】

これを37 で一晩プレート培養した後、組換え大腸菌のクローンをピックアップしてM9 SEED培地1mLに植菌し、30、220rpmで20時間振盪培養した。続いて、培養液のうち10μLをM9 Main培地2mLに植え継ぎ、25、220rpmで24時間振盪培養した。M9 SEED培地およびM9 Main培地の組成を以下に示す。なお、M9 SEED培地およびM9 Main培地中の抗生物質は、pCDF-pgsA-indica組換えベクターおよびpCDF-indica組換えベクターにより形質転換した大腸菌についてはストレプトマイシン(終濃度50μg/mL)を、pET-pgsA-indica組換えベクター、pET-indica組換えベクターおよびpET-GST-indica組換えベクターにより形質転換した大腸菌についてはカナマイシン(終濃度30μg/mL)を、それぞれ用いた。

【0066】

M9 SEED培地(計100mL)；水 72mL、5×M9塩 20mL、20% カザミノ酸 5mL、20% D-グルコース 2mL、2mg/mL チミン 1mL、50mM CaCl₂ 0.2mL、2.5M MgCl₂ 40μL、100mg/mL FeSO₄ 28μL、抗生物質

【0067】

M9 Main培地(計100mL)；水 67mL、5×M9塩 20mL、20% カザミノ酸 5mL、2mg/mL チミン 1mL、50mM CaCl₂ 0.2mL、100mg/mL FeSO₄ 28μL、Overnight Express Autoinduction System 1(O.N.E.；Merck社) Sol. 1 2mL、O.N.E. Sol. 2 5mL、O.N.E. Sol. 3 100μL、抗生物質

【0068】

<実施例2> 細胞表面発現系の効果の検討

(1) 酵素反応

実施例1(5)の組換え大腸菌の培養液2mLを用意し、その後、培養液を12000rpm、4 で5分間遠心分離することにより組換え大腸菌を回収して、菌体の湿重量を測定した。また、30(w/w)%のスクロースを含む0.04Mのリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)を調製し、これを30%スクロース溶液とした。組換え大腸菌の培養液2mLに30%スクロース溶液350μLを添加して懸濁し、これを30、200rpmで3時間振盪することにより -フルクトフラノシダーゼの酵素反応を行い、これを反応液とした。なお、大腸菌は溶質濃度30(w/w)%程度の溶液に接すると、浸

10

20

30

40

50

透圧により菌体から水分が流出して溶菌する。

【 0 0 6 9 】

(2) 糖組成の確認

本実施例 2 (1) の反応液 5 0 μ L に水 9 5 0 μ L を加えることにより希釈した後、 1 0 0 で 1 0 分間加熱した。続いて、 4 、 1 5 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離を行って上清を回収し、孔径 0 . 4 5 μ m のフィルターで濾過して、得られた濾液を H P L C サンプルとした。次に、H P L C サンプルを下記の条件で H P L C に供して、反応液に含まれる各糖 (単糖 ; フルクトースおよびグルコース、二糖 ; スクロース、三糖以上のオリゴ糖 ; ケーストースやニストースなど) の割合を確認した。各糖の割合は、検出された全ピークの面積の総和に対する各ピークの面積の割合として、面積百分率で算出した。

10

【 0 0 7 0 】

《 H P L C の条件 》

カラム ; S H O D E X K S 8 0 2 (8 . 0 × 3 0 0 m m) 2 本

移動相 ; 水

流速 ; 1 . 0 m L / 分

注入量 ; 2 0 μ L

温度 ; 5 0

検出 ; 示差屈折率検出器 (R I D ; 昭和電工社)

【 0 0 7 1 】

次に、酵素反応に使用したスクロースの質量 (1 1 8 . 6 5 m g ; スクロース溶液 3 5 0 μ L に含まれていたスクロースの質量) に三糖以上のオリゴ糖の面積百分率を乗じて、三糖以上のオリゴ糖の量を算出し、これをオリゴ糖生成量とした。また、オリゴ糖生成量を菌体重量で除して、菌体重量あたりのオリゴ糖生成量を百分率で算出し、これをオリゴ糖生成率とした。また、酵素反応に使用したスクロースの質量 (1 1 8 . 6 5 m g) に、 1 0 0 % からスクロースの面積百分率を減じた値を乗じることにより、スクロース消費量を算出した。また、スクロース消費量を菌体重量で除して、菌体重量あたりのスクロース消費量を百分率で算出し、これをスクロース消費率とした。その結果を表 1 に示す。

20

【 0 0 7 2 】

【表 1】

β-フルクトフラノシダーゼの発現方法	組換えベクター	菌体重量(mg)	オリゴ糖生成量(mg)	スクロース消費量(mg)	オリゴ糖生成率(%) (オリゴ糖生成量/菌体重量)×100	スクロース消費率(%) (スクロース消費量/菌体重量)×100
菌体内発現	pCDF-indica	60.4	7.2	18.7	11.9	30.9
細胞表面発現	pCDF- <i>pgsA</i> -indica	38.6	30.3	104.2	78.6	269.9
菌体内発現	pET-indica	45.7	12.4	34.4	27.1	75.3
菌体内発現(可溶性)	pET-GST-indica	41.0	4.6	18.1	11.3	44.2
細胞表面発現	pET- <i>pgsA</i> -indica	22.5	26.2	82.5	116.4	366.6

30

【 0 0 7 3 】

表 1 に示すように、 p C D F - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液ではオリゴ糖生成率は 1 1 . 9 % であつたのに対して、 p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では 7 8 . 6 % であり、オリゴ糖生成率が 6 . 6 倍以上大きかつた。また、 p E T - i n d i c a 組換えベクターおよび p E T - G S T - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では、オリゴ糖生成率はそれぞれ 2 7 . 1 % および 1 1 . 3 % であつたのに対して、 p E T - p g s A - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では 1 1 6 . 4 % であり、オリゴ糖生成率がそれぞれ 4 . 2 倍以上、および 1 0 . 3 倍以上大きかつた。

40

【 0 0 7 4 】

すなわち、 p C D F - D u e t 1 プラスミドに由来する組換えベクターおよび p E T 4 2 a (+) プラスミドに由来する組換えベクターのいずれを用いた場合も、β-フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させると、β-フルクトフラノシダーゼを菌体内に発現させた場合あるいは菌体内に可溶性タンパク質として発現させた場合と比較して

50

、オリゴ糖の生成効率が顕著に大きくなることが明らかになった。これらの結果から、形質転換に用いるベクターの種類にはかかわらず、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と α -フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させると、極めて効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができることが示された。

【0075】

<実施例3> α -フルクトフラノシダーゼの由来の検討

細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と α -フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させることにより効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができるという効果が、 α -フルクトフラノシダーゼの由来にかかわらず発揮されるか否かを検討した。具体的には、*B. Indica*由来 α -フルクトフラノシダーゼと同じファミリー68に属する*Burkholderia phymatum* STM815(以下「Burk」と略記する。)の α -フルクトフラノシダーゼ、およびファミリー32に属する*Aspergillus kawachii* IFO4303(以下「Kawachii」と略記する。)の α -フルクトフラノシダーゼについて検討した。

10

【0076】

(1) α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする核酸の取得

[1-1] Burk由来 α -フルクトフラノシダーゼ

実施例1(1)に記載の方法により、Burkの α -フルクトフラノシダーゼのクローニングおよびシーケンスを行った。ただし、PCRの条件は下記のとおりとした。Burk由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAの全長の塩基配列を配列番号17に、それにコードされるBurk由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列を配列番号18に、それぞれ示す。なお、配列番号18において、シグナル配列は1~35番目に相当する。

20

【0077】

《Burk由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；BurkのゲノムDNA

フォワードプライマー；5'-AAACTAAAATCTAAAAGATCTCAGACTGCAACGCCAGGCTTCCCG-3'(配列番号19)

リバースプライマー；5'-GGTTTCTTTACCAAGACTCGAGTTACTGGCTGTTGCCCGCCCTGCCCGTTTCC-3'(配列番号20)

30

PCR用酵素；KOD-Plus-(東洋紡社)

反応条件；94℃で15秒、58℃で20秒および68℃で2分を1サイクルとして21サイクル。

【0078】

[1-2] Kawachii由来 α -フルクトフラノシダーゼ

次に、Kawachiiの α -フルクトフラノシダーゼ(GenBank:GAA88101.1)をコードするDNAをジェンスクリプト社に依頼して人工合成して取得した。Kawachii由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAの全長の塩基配列を配列番号21に、それにコードされるkawachii由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列を配列番号22にそれぞれ示す。なお、配列番号22において、シグナル配列は1~24番目に相当する。

40

【0079】

(2)細胞表面発現系の組換えベクターの作成

[2-1] Burk由来 α -フルクトフラノシダーゼ

本実施例3(1)[1-1]で行ったPCRにより増幅したBurk由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを、DNA断片8とした。また、下記の条件でPCRを行うことにより、PgSAタンパク質をコードするDNAが挿入されたpCDFDuet-1プラスミド由来のDNAであって、*B. Indica*由来 α -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを含まないDNAを増幅し、これ

50

をDNA断片9とした。

【0080】

《PgsAタンパク質をコードするDNAが挿入されたpCDFDuet-1プラスミド由来のDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクター

フォワードプライマー；5'-TCTGGTAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTT-3'(配列番号23)

リバースプライマー；5'-TTTAGATTTTAGTTTGTCACTATGATCAAT-3'(配列番号24)

反応条件；98 で10秒、68 で2分25秒を1サイクルとして25サイクル。

10

【0081】

続いて、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)を用いて、添付の使用書に従いDNA断片8およびDNA断片9を連結し、これをpCDF-pgsA-burk組換えベクターとした。

【0082】

[2-2] Kawachii由来 -フルクトフラノシダーゼ

下記の条件でPCRを行うことにより、Kawachii由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅し、これをDNA断片10とした。

【0083】

《Kawachii由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；本実施例3(1)[1-2]のKawachii由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA

フォワードプライマー；5'-AAATCTAAAAGATCCTCCGTGGTCATCGACTAC-3'(配列番号25)

リバースプライマー；5'-TTTACCAGACTCGAGTCAATACTGACGATCCGGC-3'(配列番号26)

PCR用酵素；KOD-Plus-Neo(東洋紡社)

反応条件；98 で10秒、68 で50秒を1サイクルとして25サイクル。

20

【0084】

また、下記の条件で実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクターを鋳型としてPCRを行うことにより、B.Indica由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを含まないDNAを増幅し、これをDNA断片11とした。

30

【0085】

《PgsAタンパク質をコードするDNAが挿入されたpCDFDuet-1プラスミド由来のDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクター

フォワードプライマー；5'-CTCGAGTCTGGTAAGAAACCGCTGCTGCGAAA-3'(配列番号27)

リバースプライマー；5'-GGATCTTTTAGATTTTAGTTTGTCACTATGATCAA-3'(配列番号28)

PCR用酵素；KOD-Plus-Neo(東洋紡社)

反応条件；98 で10秒、68 で2分25秒を1サイクルとして25サイクル。

40

【0086】

続いて、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)を用いて、添付の使用書に従いDNA断片10およびDNA断片11を連結し、これをpCDF-pgsA-kawachii組換えベクターとした。

【0087】

(3) 菌体内発現系の組換えベクターの作成

50

[3 - 1] Burk由来 - フルクトフラノシダーゼ

下記の条件で本実施例3(2)[2-1]のpCDF - pgsA - burk組換えベクターを鋳型としてPCRを行うことにより、pgsAタンパク質をコードするDNAを含まないDNAを増幅し、これをDNA断片12とした。続いて、Ligation High ver. 2(東洋紡社)を用いて、添付の使用書に従いDNA断片12のセルフライゲーションを行い、これをpCDF - burk組換えベクターとした。

【0088】

《Burk由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAが挿入されたpCDF Duet - 1プラスミド由来のDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；本実施例3(2)[2-1]のpCDF - pgsA - burk組換えベクター

フォワードプライマー；5' - CATATGCA GACTGCAACGCCAGGCT - 3' (配列番号29)

リバースプライマー；5' - TATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATA - 3' (配列番号30)

PCR用酵素；KOD - Plus - Neo (東洋紡社)

反応条件；98 で10秒、59 で30秒、68 で2分40秒を1サイクルとして25サイクル。

【0089】

[3 - 2] Kawachii由来 - フルクトフラノシダーゼ

下記の条件で本実施例3(2)[2-2]のpCDF - pgsA - kawachii組換えベクターを鋳型としてPCRを行うことにより、pgsAタンパク質をコードするDNAを含まないDNAを増幅し、これをDNA断片13とした。続いて、Ligation High ver. 2(東洋紡社)を用いて、添付の使用書に従いDNA断片13のセルフライゲーションを行い、これをpCDF - kawachii組換えベクターとした。

【0090】

《Kawachii由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAが挿入されたpCDF Duet - 1プラスミド由来のDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；本実施例3(2)[2-2]のpCDF - pgsA - kawachii組換えベクター

フォワードプライマー；5' - CATATGTCCGTGGTCATCGACTAC - 3' (配列番号31)

リバースプライマー；5' - TATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATA - 3' (配列番号32)

PCR用酵素；KOD - Plus - Neo (東洋紡社)

反応条件；98 で10秒、59 で30秒、68 で2分40秒を1サイクルとして25サイクル。

【0091】

(4) 形質転換および形質転換体の培養

本実施例3(2)[2-1]のpCDF - pgsA - burk組換えベクター、本実施例3(2)[2-2]のpCDF - pgsA - kawachii組換えベクター、本実施例3(3)[3-1]のpCDF - burk組換えベクターおよび本実施例3(3)[3-2]のpCDF - kawachii組換えベクターを、実施例1(5)に記載の方法により大腸菌に導入し、得られた組換え大腸菌を培養した。

【0092】

(5) 酵素反応およびオリゴ糖量の測定

本実施例3(4)の組換え大腸菌の培養液を用いて、実施例2(1)に記載の方法により - フルクトフラノシダーゼの酵素反応を行った。その後、実施例2(2)に記載の方法により反応液に含まれる各糖の割合を測定し、オリゴ糖生成量、オリゴ糖生成率、スクロース消費量およびスクロース消費率を算出した。その結果を表2に示す。表2には、比較のため、表1に記載のpCDF - indica組換えベクターおよびpCDF - pgs

10

20

30

40

50

A - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液の結果も併せて示す。

【 0 0 9 3 】

【表 2】

β -FFace (Family分類)	β -フルクトフラノシダーゼの発現方法	組換えベクター	菌体重量(mg)	オリゴ糖生成量(mg)	スクロース消費量(mg)	オリゴ糖生成率(%) (オリゴ糖生成量/菌体重量) $\times 100$	スクロース消費率(%) (スクロース消費量/菌体重量) $\times 100$
Indica (Family68)	菌体内発現	pCDF-indica	60.4	7.2	18.7	11.9	30.9
Indica (Family68)	細胞表面発現	pCDF-pgsA-indica	38.6	30.3	104.2	78.6	269.9
burk (Family68)	菌体内発現	pCDF-burk	51.9	19.2	89.6	37.0	172.6
burk (Family68)	細胞表面発現	pCDF-pgsA-burk	16.3	25.5	92.6	156.7	568.0
Kawachi (Family32)	菌体内発現	pCDF-kawachii	54.7	18.9	105.6	34.5	193.1
Kawachi (Family32)	細胞表面発現	pCDF-pgsA-kawachii	28.0	68.7	108.6	245.2	388.0

10

【 0 0 9 4 】

表 2 に示すように、p C D F - b u r k 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液ではオリゴ糖生成率は 3 7 . 0 % であつたのに対して、p C D F - p g s A - b u r k 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では 1 5 6 . 7 % であり、オリゴ糖生成率が 4 . 2 倍以上大きかった。また、p C D F - k a w a c h i i 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液ではオリゴ糖生成率は 3 4 . 5 % であつたのに対して、p C D F - p g s A - k a w a c h i i 組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では 2 4 5 . 2 % であり、オリゴ糖生成率が 7 . 1 倍以上大きかった。

20

【 0 0 9 5 】

すなわち、B u r k 由来 - フルクトフラノシダーゼおよび K a w a c h i i 由来 - フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させると、B . i n d i c a 由来 - フルクトフラノシダーゼと同様に、菌体内に発現させた場合と比較して、オリゴ糖の生成効率が顕著に大きくなることが明らかになった。これらの結果から、- フルクトフラノシダーゼの由来ないしファミリーの差異に関わらず、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と融合して 1 のポリペプチドとして発現させると、極めて効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができることが示された。

30

【 0 0 9 6 】

< 実施例 4 > アンカータンパク質の検討

細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と - フルクトフラノシダーゼとを 1 のポリペプチドとして発現させることにより効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができるという効果が、アンカータンパク質の種類にかかわらず発揮されるか否かを検討した。具体的には、P g s A タンパク質のアミノ酸配列を基に B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l (B L A S T) を用いて検索し、下記 (ア) および (イ) のアンカータンパク質を抽出し、これらについて検討した； (ア) P g s A タンパク質のアミノ酸配列と同一性が 4 5 % である B a c i l l u s m e g a t e r i u m D S M 3 1 9 株の C a p A タンパク質、 (イ) P g s A タンパク質のアミノ酸配列との同一性が 3 2 % で、C a p A タンパク質のアミノ酸配列との同一性が 3 6 % である B r e v i b a c i l l u s b r e v i s N B R C 1 0 0 5 9 9 株のタンパク質 (g e n i n f o i d e n t i f i e r r (G I) 番号 2 2 6 3 1 3 3 4 1 ; 以下「b r e v タンパク質」という。) 。

40

【 0 0 9 7 】

(1) 細胞表面発現系の組換えベクターの作成

50

[1 - 1] CapAタンパク質をコードするDNAの増幅

CapAタンパク質をコードするDNA配列を大腸菌において最適化したコドンでコードし、かつ、3'末端側にBglIIの制限酵素サイトを付加した塩基配列を設計し、これをcapA_opti遺伝子とした。capA_opti遺伝子の塩基配列を配列番号33に、それにコードされるアミノ酸配列を配列番号34に、それぞれ示す。次に、capA_opti遺伝子のDNAを人工合成し、これを鋳型として下記の条件でPCRを行うことにより、CapAタンパク質をコードするDNAを増幅し、これをDNA断片14とした。

【0098】

《CapAタンパク質をコードするDNA増幅用PCRの条件》

10

鋳型；人工合成したcapA_opti遺伝子のDNA

フォワードプライマー；5'-TAAGAAGGAGATATACATATGAAAGAAAGAAACTGAACTTCCAAG-3'（配列番号35）

リバースプライマー；5'-CGGGTAACCCGATTGAGATCTATTTGCTGGGCTTTCGTTCTTTTGT-3'（配列番号36）

PCR用酵素；KOD-Plus-（東洋紡社）

反応条件；94 で15秒、58 で20秒および68 で2分を1サイクルとして21サイクル。

【0099】

[1 - 2] brevタンパク質をコードするDNAの増幅

20

Brevibacillus brevis NBRC100599株のゲノムDNAを常法に従って抽出した。続いて、下記の条件でPCRを行うことにより、brevタンパク質をコードするDNAを増幅し、これをDNA断片15とした。また、PCR産物について常法に従ってシーケンスを行い、brevタンパク質をコードするDNAの全長の塩基配列を決定した。brevタンパク質をコードするDNAの全長の塩基配列を配列番号37に、また、それにコードされるbrevタンパク質のアミノ酸配列を配列番号38に、それぞれ示す。

【0100】

《brevタンパク質をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；Brevibacillus brevis NBRC100599株のゲノムDNA

30

フォワードプライマー；5'-GAAGGAGATATACATATGAACGAGAACAGATCAAG-3'（配列番号39）

リバースプライマー；5'-GTAACCCGAGGATCTGGGGGCAGTCTCCACCGC-3'（配列番号40）

PCR用酵素；KOD-Plus-Neo（東洋紡社）

反応条件；98 で10秒、68 で1分10秒を1サイクルとして45サイクル。

【0101】

[1 - 3] 組換えベクターの作成

1 - 3 - 1 CapAタンパク質

40

下記の条件で実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクターを鋳型としてPCRを行うことにより、pgsAタンパク質をコードするDNAを含まないがB.Indica由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅し、これをDNA断片16とした。続いて、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて、添付の使用書に従い本実施例4(1)[1-1]のDNA断片14とDNA断片16とを連結し、これをpCDF-capA_opti-indica組換えベクターとした。

【0102】

《B.Indica由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAが挿入されたpCDFDuet-1プラスミド由来のDNA増幅用PCRの条件》

50

鋳型；実施例 1 (2) の p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクター
 フォワードプライマー；5' - A G A T C T C A A T C G G G T T A C C C G A T A C C
 G A C - 3' (配列番号 4 1)
 リバースプライマー；5' - C A T A T G T A T A T C T C C T T C T T A T A C T T A
 A C - 3' (配列番号 4 2)
 P C R 用酵素；K O D - P l u s - N e o (東洋紡社)
 反応条件；9 8 で 1 0 秒、6 8 で 3 分 2 0 秒を 1 サイクルとして 2 5 サイクル。

【 0 1 0 3 】

1 - 3 - 2 b r e v タンパク質

下記の条件で実施例 1 (2) の p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクターを鋳
 型として P C R を行うことにより、P g s A タンパク質をコードする DNA を含まない D
 N A を増幅し、これを DNA 断片 1 7 とした。続いて、I n - F u s i o n H D C l o
 n i n g K i t (タカラバイオ社) を用いて、添付の使用書に従い本実施例 4 (1) [
 1 - 2] の DNA 断片 1 5 と DNA 断片 1 7 とを連結し、これを p C D F - b r e v - i
 n d i c a 組換えベクターとした。

【 0 1 0 4 】

《 B . I n d i c a 由来 - フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードする DNA
 が挿入された p C D F D u e t - 1 プラスミド由来の DNA 増幅用 P C R の条件》

鋳型；実施例 1 (2) の p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクター
 フォワードプライマー；5' - A G A T C C T C G G G T T A C C C G A T A C C G A -
 3' (配列番号 4 3)
 リバースプライマー；5' - A T G T A T A T C T C C T T C T T A T A C T T A A C T
 - 3' (配列番号 4 4)
 P C R 用酵素；K O D - P l u s - N e o (東洋紡社)
 反応条件；9 8 で 1 0 秒、6 8 で 3 分 2 0 秒を 1 サイクルとして 2 5 サイクル。

【 0 1 0 5 】

(2) 酵素反応および糖組成の確認

本実施例 4 (1) の p C D F - c a p A _ o p t i - i n d i c a 組換えベクターおよ
 び p C D F - b r e v - i n d i c a 組換えベクターを、実施例 1 (5) に記載の方法に
 より大腸菌に導入し、得られた組換え大腸菌を培養した。続いて、これらの組換え大腸菌
 の培養液を用いて、実施例 2 (1) に記載の方法により - フルクトフラノシダーゼの酵
 素反応を行った。その後、実施例 2 (2) に記載の方法により反応液に含まれる各糖の割
 合を測定し、オリゴ糖生成量、オリゴ糖生成率、スクロース消費量およびスクロース消費
 率を算出した。その結果を表 3 に示す。表 3 には、比較のため、表 1 に記載の p C D F -
 i n d i c a 組換えベクターおよび p C D F - p g s A - i n d i c a 組換えベクターに
 より形質転換した大腸菌の反応液の結果も併せて示す。

【 0 1 0 6 】

【表 3】

アンカータンパク質	組換えベクター	菌体重量(mg)	オリゴ糖生成量(mg)	スクロース消費量(mg)	オリゴ糖生成率(%) (オリゴ糖生成量/菌体重量)×100	スクロース消費率(%) (スクロース消費量/菌体重量)×100
無し(菌体内発現系)	pCDF-indica	60.4	7.2	18.7	11.9	30.9
PgsA	pCDF-pgsA-indica	38.6	30.3	104.2	78.6	269.9
CapA	pCDF-capA_opti-indica	24.4	76	319	312.2	1308.9
brev	pCDF-brev-indica	53.1	1	3	1.0	5.0

【 0 1 0 7 】

表 3 に示すように、p C D F - i n d i c a 組換えベクターにより形質転換した大腸菌
 の反応液ではオリゴ糖生成率は 1 1 . 9 % であったのに対して、p C D F - p g s A - i

ndica組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では78.6%、pCDF-capA__opti-indica組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では312.2%、pCDF-brev-indica組換えベクターにより形質転換した大腸菌の反応液では1.0%であった。すなわち、pCDF-indica組換えベクターを用いた場合と比較して、オリゴ糖生成率は、pCDF-pgsA-indica組換えベクターを用いた場合は6.6倍以上、pCDF-capA__opti-indica組換えベクターを用いた場合は26.2倍以上大きかったのに対して、pCDF-brev-indica組換えベクターを用いた場合はおよそ0.08倍と小さかった。

【0108】

すなわち、brevタンパク質により -フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させると、菌体内に発現させた場合と比較して、オリゴ糖の生成効率が小さくなる一方で、PgsAタンパク質やCapAタンパク質により -フルクトフラノシダーゼを大腸菌の細胞表面に発現させると、菌体内に発現させた場合と比較して、オリゴ糖の生成効率が顕著に大きくなることが明らかになった。これらの結果から、PgsAタンパク質のアミノ酸配列またはCapAタンパク質のアミノ酸配列のいずれかと45%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアンカータンパク質と -フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させることにより、効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができることが明らかになった。

【0109】

<実施例5> 宿主の検討

細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と -フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させることにより効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができるという効果が、宿主の種類にかかわらず発揮されるか否かを検討した。具体的には、PgsAタンパク質が由来する*Bacillus subtilis*およびCapAタンパク質が由来する*Bacillus megaterium*を宿主とした場合について検討した。

【0110】

(1) *Bacillus subtilis*を宿主とした場合

[1-1] 組換えベクターの作成

下記の条件でPCRを行うことにより、PgsAタンパク質および*B. Indica*由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅し、これをDNA断片18とした。

【0111】

《PgsAタンパク質および*B. Indica*由来 -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA増幅用PCRの条件》

鋳型；実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクター

フォワードプライマー；5' - AAGGAGGAAGGATCAATGAAAAAGA
ACTGAGCTTTCATG - 3' (配列番号45)

リバースプライマー；5' - CCCGGGGACGTCGACTTACTGGCCGTT
CGTGACACCATGG - 3' (配列番号46)

PCR用酵素；KOD-Plus-Neo(東洋紡社)

反応条件；95 で20秒、50 で30秒、68 で2分を1サイクルとして25サイクル。

【0112】

また、*Bacillus subtilis*用分泌発現ベクターであるpHT43プラスミド(MoBiTec社)の塩基配列をもとに下記配列番号47および配列番号48のプライマーを設計し、下記の条件でPCRを行うことにより、pHT43プラスミド由来のDNAを増幅し、これをDNA断片19とした。

【0113】

《pHT43プラスミド由来のDNA増幅用PCRの条件》

10

20

30

40

50

鋳型；pHT43プラスミド（MoBiTec社）

フォワードプライマー；5'-GTCGACGTCCTCCCGGGGCAGCCCGCCT
AATG-3'（配列番号47）

リバースプライマー；5'-TGATCCTTCCTCCTTTAATTGGGAATT
GTT-3'（配列番号48）

PCR用酵素；KOD-Plus-Neo（東洋紡社）

反応条件；95 で20秒、68 で5分、68 で5分を1サイクルとして25サイク
ル。

【0114】

続いて、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用い
て添付の使用書に従いDNA断片18とDNA断片19とを連結し、これをpHT43-
pgsA-indica組換えベクターとした。

【0115】

[1-2] 形質転換体の作成

本実施例5(1)[1-1]のpHT43-pgsA-indica組換えベクターを
、実施例1(5)に記載の方法により大腸菌に導入して組換え大腸菌を培養した後、組換
え大腸菌からpHT43-pgsA-indica組換えベクターを回収した。回収した
pHT43-pgsA-indica組換えベクターおよびpHT43プラスミド（Mo
BiTec社）を、エレクトロポレーションにより*Bacillus subtilis*
RIK1285株（*B. subtilis* Secretory Protein Exp
ression System；TAKARA社）に導入して形質転換体を得て、これを
組換えサブティリス菌とした。エレクトロポレーションはGENE PULSER II（
バイオラッド社）を用いて、以下 1 ~ 8 の手順で行った。

【0116】

1 *Bacillus subtilis* RIK1285（*B. subtilis* S
ecretory Protein Expression System；TAKARA
社）のグリセロールストックから適量をLBプレートに広げ、37 で一晩（約16時間
）培養を行った後、シングルコロニーを突いて、25mLのLB培地を入れた250mL
容量のフラスコに植菌し、28 で一晩（約16時間）前培養を行い、これを前培養液と
した。

2 終濃度0.5Mとなるようにソルビトールを添加したLB培地を調製し、これを本
培養培地とした。50mLの本培養培地を入れた250mL容量の三角フラスコに前培養
液5mLを加え、37、220rpmで本培養を行い、これを本培養液とした。本培養
は、濁度の値が定常期（OD600 = 0.85 ~ 0.95）になるまで行った。

3 本培養液の三角フラスコを氷中に10分間以上放置した後、5000×g、4
で10分間遠心分離を行った。上清を除去した後、氷冷したSolution A（0.5
M ソルビトール、0.5M マンニトール、0.5M トレハロース、10% グリセロー
ル）を用いて菌体の洗浄を4回行った。

4 続いて、菌体を適量のSolution Aに懸濁した後、60μLずつ分注し
て-80 で保存し、これをエレクトロポレーション用菌体とした。

5 エレクトロポレーション用菌体を氷中で溶解し、サンプルとしてpHT43-pg
sA-indica組換えベクターを、コントロールとしてpHT43プラスミド（Mo
BiTec社）を、それぞれ適量加えた後、氷冷しておいた0.1cmギャップのキュ
ベットに移し、1~1.5分間放置した。

6 22KV/cm（25μF、200）でパルスをかけた後、Solution
B（0.5Mのソルビトールおよび0.38Mのマンニトールを含むLB培地）を1mL
加え、37 で3時間穏やかに振とう培養を行った。

7 その培養液を3500rpmで5分間遠心分離を行い、上清を除去した。100μ
LのSolution Bを加えて懸濁し、終濃度5μg/mLのchloramph
enicolを含むLBプレートに塗布して、37 で一晩培養した。

10

20

30

40

50

8 LBプレート上に出現したコロニーを、終濃度5 µg/mLのchloramphenicolおよび終濃度1 mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を含むL培地1 mLに加え、30、220 rpmで24時間巡回培養し、これを組換えサブティリス菌培養液とした。

【0117】

[1-4] 酵素反応および糖組成の確認

45 (w/w) %のスクロースを含む0.04 Mのリン酸カリウムバッファーを調製し、これを45 %スクロース溶液とした。本実施例5(1)[1-2] 8の組換えサブティリス菌培養液を4、3500 rpmで10分間遠心分離して菌体を回収し、500 µLの45 %スクロース溶液に懸濁し、これを30、220 rpmで24時間振盪することによりβ-フルクトフラノシダーゼの酵素反応を行った。続いて、50 %アセトニトリル水溶液を用いて反応液を25倍に希釈し、HPLCサンプルとした。次に、HPLCサンプルを下記の条件でHPLCに供して、糖組成を確認した。その結果を図2に示す。

10

【0118】

《HPLC分析条件》

カラム：Cosmosil Sugar-D 4.6 × 150 mm

溶離液：アセトニトリル水溶液(0~9分；72.5~57.5 %、9~11分；72.5 %)

カラム温度：25

流速：1.5 mL / 分

20

注入量：1.5 µL

検出：コロナ荷電粒子検出器(CAD；サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

【0119】

図2に示すように、pHT43-pgsA-indica組換えベクターにより形質転換した組換えサブティリス菌の反応液と、pHT43プラスミドにより形質転換した組換えサブティリス菌(コントロール)の反応液とは、ほぼ同じ形状のHPLCチャートであり、いずれにおいても、三糖以上のオリゴ糖ないしグルコースやフルクトースの生成はほとんど確認されなかった。この結果から、Bacillus subtilisにおいて、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質とβ-フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させると、効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができないことが明らかになった。

30

【0120】

(2) Bacillus megateriumを宿主とした場合

[2-1] 組換えベクターの作成

下記の条件でPCRを行うことにより、CapAタンパク質およびB. Indica由来β-フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅し、これをDNA断片20とした。

【0121】

《CapAタンパク質およびB. Indica由来β-フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列をコードするDNA増幅用PCRの条件》

40

鋳型；実施例4(1)のpCDF-capA_opti-indica組換えベクター
フォワードプライマー；5'-AGGGGGAATGACAAATGAAAGAAA
GAAACTGAACCTCC-3'(配列番号49)

リバープライマー；5'-ACTAGTTTGGACCAATTTACTGGCCGTT
CGTGACACCATGG-3'(配列番号50)

PCR用酵素；KOD-Plus-Neo(東洋紡社)

反応条件；94 で15秒、58 で20秒、68 で3分を1サイクルとして21サイクル。

【0122】

また、Bacillus megaterium用発現ベクターであるpWH1520

50

プラスミド (MoBiTec社) の塩基配列をもとに下記配列番号 51 および配列番号 52 のプライマーを設計し、下記の条件で PCR を行うことにより、pWH1520 プラスミド由来の DNA を増幅し、これを DNA 断片 21 とした。

【0123】

《pWH1520 プラスミドの DNA 増幅用 PCR の条件》

鋳型；pWH1520 プラスミド (MoBiTec社)

フォワードプライマー；5' - ATGGTCCAAACTAGTACTAATAAATTAAT - 3' (配列番号 51)

リバースプライマー；5' - TTGTCATTTCCCCCTTTGATTTAAGTGAAC - 3' (配列番号 52)

PCR 用酵素；KOD-Plus-Neo (東洋紡社)

反応条件；94 で 15 秒、68 で 9 分を 1 サイクルとして 35 サイクル。

【0124】

続いて、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社) を用いて、添付の使用書に従い DNA 断片 20 と DNA 断片 21 とを連結し、これを pWH1520-capA_opti-indica 組換えベクターとした。

【0125】

[2-2] 形質転換体の作成

本実施例 5 (2) [2-1] の pWH1520-capA_opti-indica 組換えベクターを、実施例 1 (5) に記載の方法により大腸菌に導入して組換え大腸菌を培養した後、組換え大腸菌から pWH1520-capA_opti-indica 組換えベクターを回収した。回収した pWH1520-capA_opti-indica 組換えベクターと、コントロールとして pWH1520 プラスミド (MoBiTec社) とを、プロトプラスト法によりそれぞれ *Bacillus megaterium* に導入して形質転換体を得て、これを組換えメガテリウム菌とした。プロトプラスト法は、*Bacillus megaterium* Protoplast (Mobitec社) を用いて、添付の使用書に従って行った。得られた組換えメガテリウム菌は、終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含む L 培地 1 mL に加え、30、220 rpm で 6 時間旋回培養した後、キシロースを終濃度 0.5 (w/w) % となるよう培地に添加し、同条件でさらに 18 時間旋回培養して、これを組換えメガテリウム菌培養液とした。

【0126】

[2-3] 酵素反応および糖組成の確認

本実施例 5 (2) [2-2] の組換えメガテリウム菌培養液について、本実施例 5 (1) [1-4] に記載の方法により酵素反応を行った後、反応液の糖組成の確認を行った。その結果を図 3 に示す。

【0127】

図 3 に示すように、pWH1520-capA_opti-indica 組換えベクターにより形質転換した組換えメガテリウム菌の反応液と、pWH1520 プラスミドにより形質転換した組換えメガテリウム菌の反応液とは、ほぼ同じ形状の HPLC チャートであり、いずれにおいても、三糖以上のオリゴ糖ないしグルコースやフルクトースの生成はほとんど確認されなかった。この結果から、*Bacillus megaterium* において、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と -フルクトフラノシダーゼとを 1 のポリペプチドとして発現させると、効率的にフルクトースが付加された糖質を製造することができないことが明らかになった。

【0128】

以上の本実施例 5 (1) [1-4] および (2) [2-3] の結果から、PgsA タンパク質は *Bacillus subtilis* に由来し、CapA タンパク質は *Bacillus megaterium* に由来するにも関わらず、これらを宿主として、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と -フルクトフラノシダーゼとを 1 のポリペプチドとして発現させた場合は、効率的にフルクトースが付加された糖質を製造すること

10

20

30

40

50

ができないことが明らかになった。

【0129】

また、従来よりタンパク質の発現に多用される酵母は内在性の β -フルクトフラノシダーゼを有し(<http://www.mfc.co.jp/product/kouso/invertase/>)、このため、外来の β -フルクトフラノシダーゼを導入してフルクトースが付加された糖質を製造する際は、当該内在性 β -フルクトフラノシダーゼの活性(スクロースの資化性)を欠損させた変異株を用いる必要があり(例えば、特許第3628336号、第24頁(3))、 β -フルクトフラノシダーゼによるフルクトースが付加された糖質の製造方法における宿主としては、汎用性や取り扱いの容易さに欠ける。

【0130】

以上のことから、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と β -フルクトフラノシダーゼとを1のポリペプチドとして発現させた微生物によるフルクトースが付加された糖質の製造方法における宿主としては、大腸菌が至適であることが明らかになった。

【0131】

<実施例6> 受容体基質の検討

細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と融合して1のポリペプチドとして大腸菌に発現させた β -フルクトフラノシダーゼにより、フルクトースの転移を受けることができる物質(受容体基質)について検討した。具体的には、単糖、二糖および配糖体、ならびに糖質以外の物質としてヒドロキノンが受容体基質となり得るか否かについて検討した。

【0132】

(1) 単糖、二糖および配糖体

[1-1] 酵素反応

実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクターにより形質転換した実施例1(5)の組換え大腸菌の培養液を12000rpm、4℃で5分間遠心分離に供して集菌した後、菌体湿重量にして約7mg分用意した。また、フルクトース残基の供与体基質としてスクロース(グラニュー糖;三井製糖社)を、受容体基質として単糖(D(+)-キシロース(和光純薬社)およびL(+)-アラビノース(和光純薬社))、二糖(メリビオース(和光純薬社)およびラクトース水合物(和光純薬社))ならびに配糖体(β -メチル-D(+)-グルコシド(和光純薬社))を用意し、表4に示す組成の基質溶液No.1~5を調製した。基質溶液の溶媒は、0.04Mリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)を用いた。7mgの湿菌体に対して基質溶液No.1~5をそれぞれ200 μ Lずつ添加して懸濁し、これを、40℃、200rpmで1時間振盪することにより β -フルクトフラノシダーゼの酵素反応を行い、反応液を得た。基質溶液No.1~5を添加して得られた反応液を、それぞれ、反応液No.1~5とした。

【0133】

【表4】

	基質溶液No. 1	基質溶液No. 2	基質溶液No. 3	基質溶液No. 4	基質溶液No. 5
溶媒	0.04Mのリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)				
供与体基質 (w/w)%	スクロース;50.8	スクロース;50.6	スクロース;49.1	スクロース;66.8	スクロース;52.1
受容体基質 (w/w)%	D(+)-キシロース;49.2	L(+)-アラビノース;49.4	メリビオース;50.9	ラクトース水合物;33.2	α -メチル-D(+)-グルコシド;47.9
基質濃度 (w/w)%	33.3	33.3	33.3	27.3	33.3

【0134】

[1-2] 糖組成の確認

本実施例6(1)[1-1]の反応液No.1~5各50 μ Lに水450 μ Lおよびアセトニトリル500 μ Lを加えることにより希釈した後、70℃で10分間加熱した。続いて、2500xg、15000xgで10分間遠心分離を行って上清を回収し、孔径0.45

10

20

30

40

50

μmのフィルターで濾過して、得られた濾液をHPLCサンプルとした。これを下記の条件でHPLCに供して、反応液に含まれる各糖の割合を測定した。各糖の割合は、検出された全ピークの面積の総和に対する各ピークの面積の割合として、面積百分率で算出した。その結果を表5に示す。

【0135】

《HPLCの条件》

カラム：TOSOH TSK gel Amide 80 粒子径5 μm (4.6 × 250 mm)

溶離液：アセトニトリル水溶液（反応液No. 1～2および5のHPLCサンプル；78%、反応液No. 3～4のHPLCサンプル；70%）

カラム温度：70

流速：1.0 mL / 分

注入量：20 μL

検出；示差屈折率検出器（RID；昭和電工社）

【0136】

【表5】

	各糖の割合(%)						
	受容体基質に由来		供与体基質に由来				その他
	受容体基質	受容体基質由来オリゴ糖	D(+)-フルクトース	D(+)-グルコース	スクロース	スクロース由来オリゴ糖	
反応液No.1	D(+)-キシロース 41.4	18.1	7.0	26.2	6.6	0.7	-
反応液No.2	L(+)-アラビノース 39.5	27.9	3.2	24.9	4.5	-	-
反応液No.3	メリビオース 39.2	20.8	4.5	21.1	11.9	2.3	0.2
反応液No.4	ラクトース-水和物 20.8	18.9	6.1	24.4	25.0	3.6	1.1
反応液No.5	α-メチル-D(+)-グルコシド 42.9	16.4	6.3	22.1	11.3	1.0	-

【0137】

表5に示すように、反応液No. 1～5のいずれにも、受容体基質に由来するオリゴ糖が含まれることが確認された。すなわち、反応液No. 1～5において、D(+)-キシロース、L(+)-アラビノース、メリビオース、ラクトース-水和物およびα-メチル-D(+)-グルコシドにフルクトース残基が転移されて、オリゴ糖が生成したことが明らかになった。これらの結果から、糖質は、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と融合して1のポリペプチドとして大腸菌に発現させたα-フルクトフラノシダーゼの受容体基質となりうることを示された。

【0138】

(2) ヒドロキノン

[2-1] 酵素反応

実施例1(2)のpCDF-pgsA-indica組換えベクターにより形質転換した実施例1(5)の組換え大腸菌の培養液を、菌体の湿重量にして10mg分用意した。また、フルクトース残基の供与体基質としてスクロース（グラニュー糖；三井製糖社）を、受容体基質としてヒドロキノン（和光純薬社）をそれぞれ用意した。50mMの酢酸バ

ッファー (pH 6.0) 1 mL にスクロース 342 mg (終濃度 1 M) およびヒドロキノン 28 mg (終濃度 0.25 M) を溶解し、これを基質溶液とした。10 mg の湿菌体に対して 50 倍量の体積の基質溶液を添加して懸濁した後、40、200 rpm で 1 時間振盪することにより、 α -フルクトフラノシダーゼの酵素反応を行い、これをサンプル反応液とした。また、下記の組成のコントロール溶液 No. 1 ~ 3 を用意し、同様に 40、200 rpm で 1 時間振盪し、コントロール反応液 No. 1 ~ 3 を得た。

【0139】

コントロール溶液 No. 1 ; 10 mg の湿菌体に対して、50 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) を 50 倍量 (体積比) 添加。

コントロール溶液 No. 2 ; 基質溶液のみ (湿菌体を含まない)。

コントロール溶液 No. 3 ; 10 mg の湿菌体に対して、終濃度 1 M のスクロースを含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) を 500 μ L 添加。

【0140】

[2-2] 反応液に含まれる物質の確認

本実施例 6 (2) [2-1] のサンプル反応液およびコントロール反応液 No. 1 ~ 3 について、本実施例 6 (1) [1-2] に記載の方法により HPLC を行い、反応液に含まれる物質の確認を行った。ただし、HPLC の条件は下記のとおりとした。その結果を図 4 に示す。なお、280 nm の UV 検出では主としてヒドロキノンおよびそれに由来する生成物が検出され、ELSD では主として糖およびそれに由来する生成物が検出される。

【0141】

《HPLC の条件》

カラム : Unison UK - Amino

溶離液 : アセトニトリル水溶液 (0 ~ 30 分 ; 98 ~ 70 % グラジエント)

カラム温度 : 60

流速 : 0.4 mL / 分

注入量 : 1 μ L

検出 ; UV 検出器 (280 nm) および蒸発光散乱検出器 (ELSD)

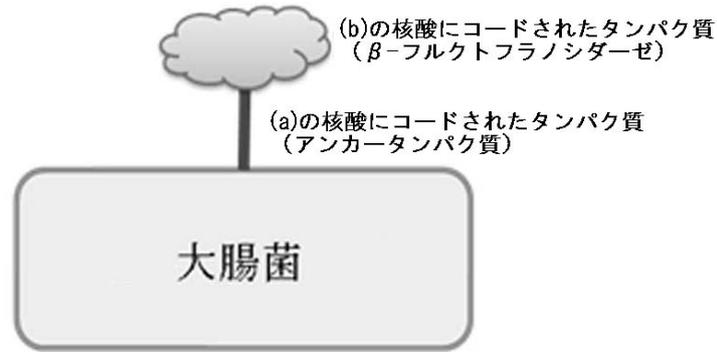
【0142】

図 4 の最上段の HPLC チャートにおいて矢印で示すように、サンプル反応液においてのみ、保持時間約 12 分、約 19 分および約 24 分にピークが確認された。同様の保持時間におけるピークは、コントロール反応液 No. 1 で検出されなかったことから菌体由来のものではなく、コントロール反応液 No. 2 で検出されなかったことからヒドロキノンあるいはスクロースではなく、コントロール反応液 No. 3 で検出されなかったことからスクロースに α -フルクトフラノシダーゼが作用して生成する生成物 (グルコース、フルクトース、ケストースなどのオリゴ糖など) ではないことが分かる。すなわち、サンプル反応液において、ヒドロキノンにフルクトースが転移されて、配糖体が生成したことが明らかになった。これらの結果から、糖質以外の物質もまた、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と融合して 1 のポリペプチドとして大腸菌に発現させた α -フルクトフラノシダーゼの受容体基質となりうることを示された。

【0143】

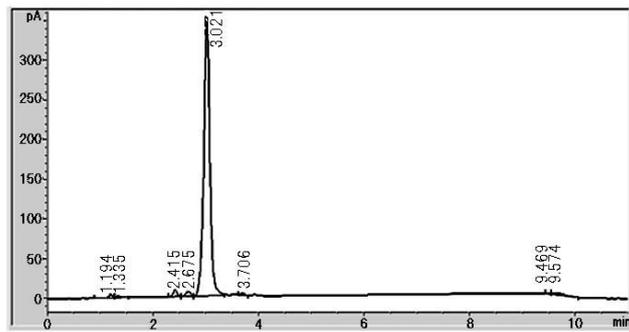
以上の本実施例 (1) [1-2] および (2) [2-2] の結果から、細胞表面に発現させるためのアンカータンパク質と融合して 1 のポリペプチドとして大腸菌に発現させた α -フルクトフラノシダーゼにより、糖質や糖質以外の物質を受容体基質として、フルクトースが付加された糖質を製造することができることを示された。

【 図 1 】

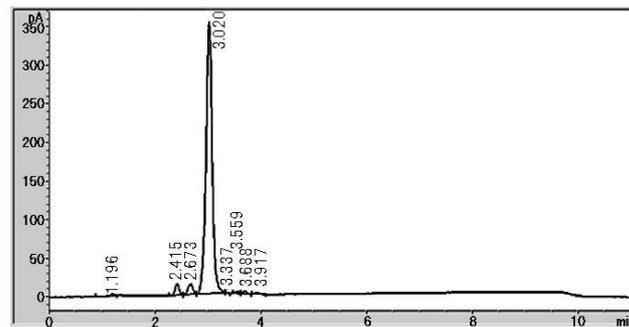


【 図 2 】

pHT43-pgsA-indica組換えベクターにより
形質転換した組換えサブティリス菌

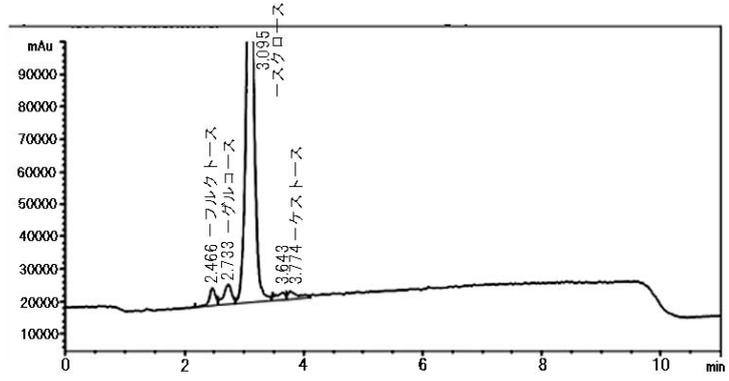


pHT43プラスミドにより
形質転換した組換えサブティリス菌

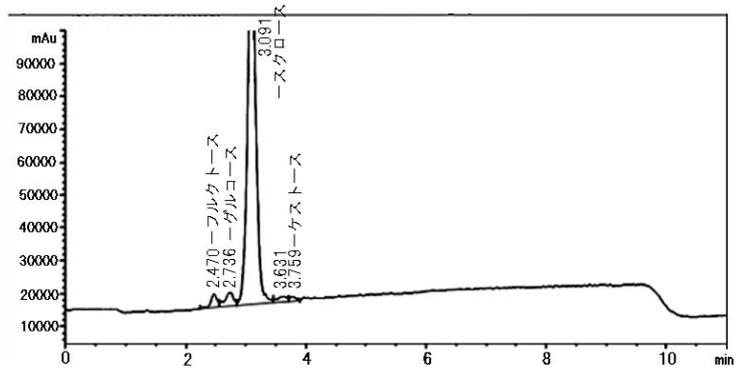


【 図 3 】

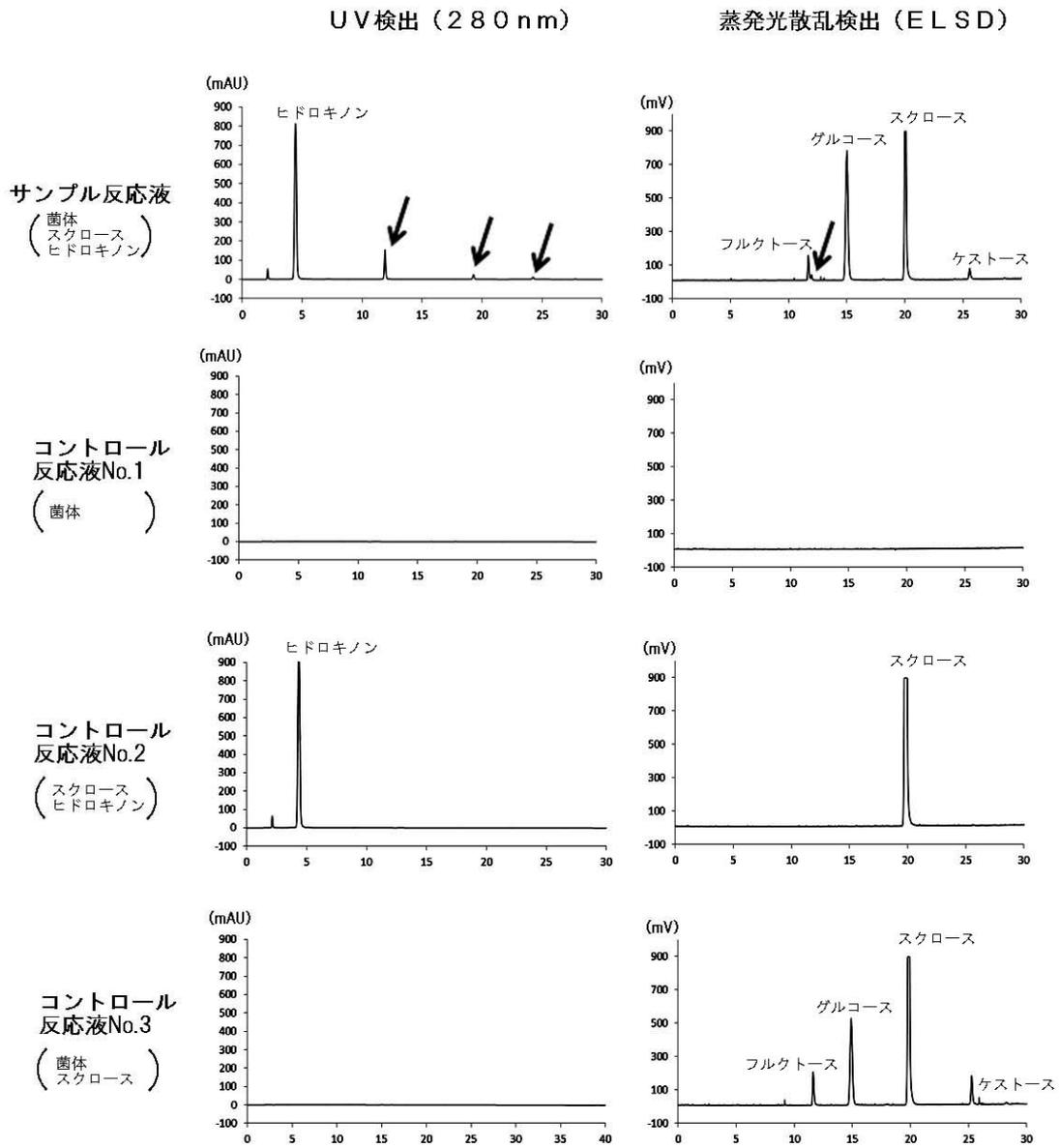
pWH1520-capA_opti-indica
組換えベクターにより形質
転換した組換えメガテリウム菌



pWH1520プラスミドにより形質
転換した組換えメガテリウム菌



【 図 4 】



【 配列表 】

[0005882415000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:19

- (72)発明者 栃尾 巧
愛知県知多市北浜町24番12 物産フードサイエンス株式会社内
- (72)発明者 伊藤 有未
愛知県知多市北浜町24番12 物産フードサイエンス株式会社内
- (72)発明者 中村 早岐
愛知県知多市北浜町24番12 物産フードサイエンス株式会社内
- (72)発明者 藤井 匡
東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内
- (72)発明者 田村 圭輔
東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内

審査官 一宮 里枝

- (56)参考文献 特表平10-504182(JP,A)
特開平08-047394(JP,A)
特開2004-222573(JP,A)
特開2009-207364(JP,A)
特開2005-312426(JP,A)
NARITA, J., et al., Display of active enzymes on the cell surface of Escherichia coli using PgsA anchor protein and thei, Appl Microbiol Biotechnol, 2006年 5月, Vol. 70, No. 5, pp. 564-572

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 P 1 9 /
C 1 2 N 1 / 2 1
C 1 2 N 9 / 2 4
C 1 2 N 1 5 /
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / A G R I C
O L A / S C I S E A R C H (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q
S w i s s P r o t / G e n e S e q