

(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2013-51966

(P2013-51966A)

(43) 公開日 平成25年3月21日(2013.3.21)

(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 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02 Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 P 7/22 (2006.01)	C 1 2 P 7/22	4 B 0 6 3
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 B 0 6 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-246695 (P2012-246695)	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社
(22) 出願日	平成24年11月8日 (2012.11.8)		東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(62) 分割の表示	特願2009-548072 (P2009-548072) の分割	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
原出願日	平成20年12月25日 (2008.12.25)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-336227 (P2007-336227)	(72) 発明者	嶋田 良和 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内
(32) 優先日	平成19年12月27日 (2007.12.27)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	保田 世津子 徳島県板野郡北島町鯛浜字西ノ須51-65
(31) 優先権主張番号	特願2008-54874 (P2008-54874)	(72) 発明者	高橋 真行 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内
(32) 優先日	平成20年3月5日 (2008.3.5)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-80570 (P2008-80570)		
(32) 優先日	平成20年3月26日 (2008.3.26)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エクオール合成に関与する酵素

(57) 【要約】

【課題】本発明は、エクオール合成の関与する酵素、前記酵素をコードする遺伝子及びこれらを用いてエクオール及びその中間体を製造する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】ジヒドロダイゼイン合成酵素、テトラヒドロダイゼイン合成酵素、及びエクオール合成酵素、並びにこれらをコードする遺伝子を提供する。更に、これらの酵素を用いてジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン、及びノ又はエクオールを合成する方法を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の(Aa)～(Ac)のいずれかであるポリペプチド：

(Aa) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Ab) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Ac) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

以下の(Ad)～(Af)のいずれかであるポリヌクレオチド：

(Ad) 配列番号 4 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ae) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Af) 前記(Ad)又は(Ae)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

ダイゼインに対して、請求項 1 に記載のポリペプチド、並びにNADPH及び/又はNADHを作用させる工程を含む、ジヒドロダイゼインの製造方法。

20

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリペプチド、又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドに対する結合性を有する抗体。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の抗体を被験試料に接触させる工程を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する、プローブ。

30

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する、プライマー。

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載のプローブを用いて、請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを検出又は測定する方法。

## 【請求項 9】

検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するものである、請求項 8 に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド、ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド、及びテトラヒドロダイゼインを基質としてエクオールを合成する活性を有するポリペプチド、並びにこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。更に、本発明は、前記ポリペプチドを利用したジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダ

50

イゼイン、及びエクオールの製造方法、並びにそれに利用される製造装置に関し、これらに関連した技術を提供する。

【背景技術】

【0002】

従来、イソフラボン誘導体は、生理学的又は薬学的に様々な効果があると考えられており、食品原料や医薬品原料として利用されている。しかしながら、イソフラボン誘導体に関する機能が解明されるに連れて、従来信じられていたようにイソフラボン誘導体のみがエストロゲン様の効果を示すのではなく、種々の腸内細菌によりこれら誘導体が菌体内で代謝(生合成)を受けた後に、より強いエストロゲン様の作用を有するエクオールが産生され、このエクオールが菌体外に放出された後腸管から吸収されることによりエストロ

10

【0003】

そこで、エクオールを体内で有効に利用させることは、高齢化社会を迎えたわが国などでは、特に骨粗鬆症を代表とする慢性老人性疾患への対応の面からも重要である。そして、上述したようにエクオール産生腸内細菌を内在しているヒトと、いないヒトが存在するという現実を考えれば、エクオールの効率的な人的生産を念頭に置き、その材料作りに対しても目を向けなければならない。

20

【0004】

このような背景の下、エクオール合成原料の供給という面で、当該生合成経路に係る酵素の同定およびその利用は極めて重要である。しかしながら、これら生合成経路において関連するいくつかの中間生成物を生産或いは触媒する酵素に関する情報は全くなく、関連酵素の同定が望まれていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2006-296434号公報

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、エクオール合成の原料となるジヒドロダイゼイン合成に携わる酵素を提供することを目的とする。具体的には、本発明は、ダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチドを提供することを目的とする。更に、本発明は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドを利用したジヒドロダイゼインの合成に関する技術等を提供することを目的とする。

【0007】

また、本発明は、エクオール合成の原料となるテトラヒドロダイゼイン合成に携わる酵素を提供することを目的とする。具体的には、本発明は、ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチドを提供することを目的とする。更に、本発明は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドを利用したテトラヒドロダイゼインの合成に関する技術等を提供することを目的とする。

40

【0008】

さらに、本発明は、エクオール合成に携わる酵素を提供することを目的とする。具体的には、本発明は、テトラヒドロダイゼインを基質としてエクオールを合成する活性を有するポリペプチドを提供することを目的とする。更に、本発明は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドを利用したエクオールの合成に関する技術等を提供することを目的とする。

50

## 【 0 0 0 9 】

さらに、本発明は、ダイゼインからエクオールを製造するにあたり生成されるジヒドロダイゼインやテトラヒドロダイゼインという中間体の製造方法、及び得られた中間体を利用できるエクオールの製造方法を提供することを目的とする。更に、本発明は、これらの製造に利用される製造装置を提供することを目的とする。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意努力を重ねた結果、エクオール産生腸内細菌より、エクオール合成の原料となる、ジヒドロダイゼインを合成することのできる酵素、テトラヒドロダイゼインを合成することのできる酵素、及びエクオールを合成することのできる酵素を単離し、これらの構造を明らかにすることに成功した。また、本願発明者らは、更なる研究を重ね、前記の酵素を利用して、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン、エクオールを人為的に製造することに成功した。本発明は、かかる知見に基づいて更に改良を重ねることにより完成したものである。

10

## 【 0 0 1 1 】

即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する：

項 A 1 . 以下の(Aa) ~ (Ac)のいずれかであるポリペプチド：

(Aa) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Ab) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

20

(Ac) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

項 A 2 . 以下の(Ad) ~ (Af)のいずれかであるポリヌクレオチド：

(Ad) 配列番号 4 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ae) 配列番号 1 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Af) 前記(Ad)又は(Ae)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

30

項 A 3 . 項 A 2 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

項 A 4 . 項 A 3 に記載の発現ベクターによって形質転換された組換え細胞。

項 A 5 . 組換え細胞が細菌性原核細胞である、項 A 4 に記載の組換え細胞。

項 A 6 . 細菌性原核細胞がラクトコッカス属に属するものである、項 A 5 に記載の組換え細胞。

項 A 7 . 項 A 4 乃至 A 6 のいずれかに記載の細胞を培養し、ダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドを得る工程を含む、ポリペプチドの製造方法。

項 A 8 . 項 A 7 に記載の製造方法により得られるポリペプチド。

40

項 A 9 . ダイゼインに対して、項 A 1 又は A 8 に記載のポリペプチド、並びにNADPH及び/又はNADHを作用させる工程を含む、ジヒドロダイゼインの製造方法。

項 A 1 0 . ダイゼインに、項 A 4 乃至 A 6 のいずれかに記載の細胞を作用させる工程を含む、ジヒドロダイゼインの製造方法。

項 A 1 1 . 項 A 1 に記載のポリペプチド、又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドに結合性を有する抗体。

項 A 1 2 . 項 A 1 1 に記載の抗体を被験試料に接触させる工程を含む、項 A 1 に記載のポリペプチド又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法。

項 A 1 3 . 検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するもの

50

である、項 A 1 2 に記載の方法。

項 A 1 4 . 項 A 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する、プローブ。

項 A 1 5 . 項 A 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する、プライマー。

項 A 1 6 . 項 A 1 4 に記載のプローブを用いて、項 A 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドを検出又は測定する方法。

項 A 1 7 . 検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するものである、項 A 1 6 に記載の方法。

項 A 1 8 . 項 A 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、項 A 2 に記載のポリヌクレオチド又はこれらの一部をPCRにより増幅させる工程を含む、項 A 1 6 に記載の方法。

項 A 1 9 . 項 A 1 記載のポリペプチド、又は項 A 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを含有することを特徴とする、ジヒドロダイゼイン合成酵素組成物。

項 A 2 0 . 更にNADPH及び/又はNADHを含む、項 A 1 9 に記載の組成物。

項 A 2 1 . (Ai)項 A 1 記載のポリペプチド、又は項 A 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチド、(Aii)NADPH及び/又はNADH、及び(Aiii)ダイゼインを含有することを特徴とする、ジヒドロダイゼイン合成原料組成物。

項 A 2 2 . (Aiv)項 A 4 乃至 A 6 のいずれかに記載の細胞、及び(Aiii)ダイゼインを含有することを特徴とする、ジヒドロダイゼイン合成原料組成物。

項 A 2 3 . (Ai)項 A 1 記載のポリペプチド、又は項 A 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチド、(Aii)NADPH及び/又はNADH、及び(Aiii)ダイゼインを含む、ジヒドロダイゼイン合成用キット。

項 A 2 4 . (Aiv)項 A 4 乃至 6 のいずれかに記載の細胞、及び(Aiii)ダイゼインを含む、ジヒドロダイゼイン合成用キット。

項 A 2 5 . 少なくとも項 A 1 1 に記載の抗体を含む、項 A 1 記載のポリペプチド、又は項 A 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを測定するための免疫学的測定用キット。

項 A 2 6 . 少なくとも項 A 1 5 に記載のプライマーを含む、項 A 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドの検出用PCR用キット。

項 A 2 7 . 項 A 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は項 A 2 に記載のポリヌクレオチドを含有する細胞の同定用である、項 A 2 6 に記載の同定用キット。

項 A 2 8 . PCR用のキットである、項 A 2 7 に記載の同定用キット。

項 A 2 9 . 項 A 1 に記載のポリペプチドからなる、ジヒドロダイゼイン合成酵素。

項 B 1 . 以下の(Ba) ~ (Bc)のいずれかであるポリペプチド：

(Ba) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Bb) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Bc) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列に対して 60 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

項 B 2 . 以下の(Bd) ~ (Bf)のいずれかであるポリヌクレオチド：

(Bd) 配列番号 10 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Be) 配列番号 7 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Bf) 前記(Bd)又は(Be)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下

10

20

30

40

50

でハイブリダイズし、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

項 B 3 . 項 B 2 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

項 B 4 . 項 B 3 に記載の発現ベクターによって形質転換された組換え細胞。

項 B 5 . 組換え細胞が細菌性原核細胞である、項 B 4 に記載の組換え細胞。

項 B 6 . 細菌性原核細胞がラクトコッカス属に属するものである、項 B 5 に記載の組換え細胞。

項 B 7 . 項 B 4 乃至 B 6 のいずれかに記載の細胞を培養し、ジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドを得る工程を含む、ポリペプチドの製造方法。

項 B 8 . 項 B 7 に記載の製造方法により得られるポリペプチド。

項 B 9 . ジヒドロダイゼインに対して、項 B 1 又は B 8 に記載のポリペプチド、並びに NADPH 及び / 又は NADH を作用させる工程を含む、テトラヒドロダイゼインの製造方法。

項 B 10 . ジヒドロダイゼインに、項 B 4 乃至 B 6 のいずれかに記載の細胞を作用させる工程を含む、テトラヒドロダイゼインの製造方法。

項 B 11 . 項 B 1 に記載のポリペプチド、又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドに結合性を有する抗体。

項 B 12 . 項 B 11 に記載の抗体を被験試料に接触させる工程を含む、項 B 1 に記載のポリペプチド又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法。

項 B 13 . 検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するものである、項 B 12 に記載の方法。

項 B 14 . 項 B 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する、プローブ。

項 B 15 . 項 B 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する、プライマー。

項 B 16 . 項 B 14 に記載のプローブを用いて、項 B 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドを検出又は測定する方法。

項 B 17 . 検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するものである、項 B 16 に記載の方法。

項 B 18 . 項 B 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、項 B 2 に記載のポリヌクレオチド又はこれらの一部を PCR により増幅させる工程を含む、項 B 16 に記載の方法。

項 B 19 . 項 B 1 に記載のポリペプチド、又は項 B 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを含有することを特徴とする、テトラヒドロダイゼイン合成酵素組成物。

項 B 20 . 更に NADPH 及び / 又は NADH を含む、項 B 19 に記載の組成物。

項 B 21 . (Bi) 項 B 1 に記載のポリペプチド、又は項 B 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチド、(Bii) NADPH 及び / 又は NADH、並びに (Biii) ジヒドロダイゼインを含有することを特徴とする、テトラヒドロダイゼイン合成原料組成物。

項 B 22 . (Biv) 項 B 4 乃至 6 のいずれかに記載の細胞、及び (Biii) ジヒドロダイゼインを含有することを特徴とする、テトラヒドロダイゼイン合成原料組成物。

項 B 23 . (Bi) 項 B 1 に記載のポリペプチド、又は項 B 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチド、(Bii) NADPH 及び / 又は NADH、並びに (Biii) ジヒドロダイゼインを含む、テトラヒドロダイゼイン合成用キット。

項 B 24 . (Biv) 項 B 4 乃至 6 のいずれかに記載の細胞、及び (Biii) ジヒドロダイゼインを含む、テトラヒドロダイゼイン合成用キット。

項 B 25 . 少なくとも項 B 11 に記載の抗体を含む、項 B 1 に記載のポリペプチド、又は項 B 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを測定するための免疫学的測定用キ

10

20

30

40

50

ット。

項 B 2 6 . 少なくとも項 B 1 5 に記載のプライマーを含む、項 B 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドの検出用PCR用キット。

項 B 2 7 . 項 B 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は項 B 2 に記載のポリヌクレオチドを含有する細胞の同定用である、項 B 2 6 に記載の同定用キット。

項 B 2 8 . PCR用のキットである、項 B 2 7 に記載の同定用キット。

項 B 2 9 . 項 B 1 に記載のポリペプチドからなる、テトラヒドロダイゼイン合成酵素。

項 C 1 . 以下の(Ca) ~ (Cc)のいずれかであるポリペプチド：

(Ca) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Cb) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド；

(Cc) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド。

項 C 2 . 以下の(Cd) ~ (Cf)のいずれかであるポリヌクレオチド：

(Cd) 配列番号 1 6 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ce) 配列番号 1 3 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Cf) 前記(Cd)又は(Ce)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

項 C 3 . 項 C 2 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

項 C 4 . 項 C 3 に記載の発現ベクターによって形質転換された組換え細胞。

項 C 5 . 組換え細胞が細菌性原核細胞である、項 C 4 に記載の組換え細胞。

項 C 6 . 細菌性原核細胞がラクトコッカス属に属するものである、項 C 5 に記載の組換え細胞。

項 C 7 . 項 C 4 乃至 C 6 のいずれかに記載の細胞を培養し、テトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを生成する活性を有するポリペプチドを得る工程を含む、ポリペプチドの製造方法。

項 C 8 . 項 C 7 に記載の製造方法により得られるポリペプチド。

項 C 9 . テトラヒドロダイゼインに対して、項 C 1 又は C 8 に記載のポリペプチドを作用させる工程を含む、エクオールの製造方法。

項 C 1 0 . テトラヒドロダイゼインに、項 C 4 乃至 C 6 のいずれかに記載の細胞を作用させる工程を含む、エクオールの製造方法。

項 C 1 1 . 項 C 1 に記載のポリペプチド、又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドに結合性を有する抗体。

項 C 1 2 . 項 C 1 1 に記載の抗体を被験試料に接触させる工程を含む、項 C 1 に記載のポリペプチド又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法。

項 C 1 3 . 検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するものである、項 C 1 2 に記載の方法。

項 C 1 4 . 項 C 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する、プローブ。

項 C 1 5 . 項 C 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有する、プライマー。

項 C 1 6 . 項 C 1 4 に記載のプローブを用いて、項 C 1 に記載のポリペプチドをコード

10

20

30

40

50

するポリヌクレオチド、又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドを検出又は測定する方法。  
項 C 1 7 . 検出又は測定対象となるポリペプチドが、細菌性原核細胞内に存在するものである、項 C 1 6 に記載の方法。

項 C 1 8 . 項 C 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、項 C 2 に記載のポリヌクレオチド又はこれらの一部をPCRにより増幅させる工程を含む、項 C 1 6 に記載の方法。

項 C 1 9 . 項 C 1 に記載のポリペプチド、又は項 C 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを含有することを特徴とする、エクオール合成酵素組成物。

項 C 2 0 . (Ci)項 C 1 に記載のポリペプチド、又は項 C 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチド、並びに(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有することを特徴とする、エクオール合成原料組成物。

項 C 2 1 . (Ciii)項 C 4 乃至 C 6 のいずれかに記載の細胞、及び(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有することを特徴とする、エクオール合成原料組成物。

項 C 2 2 . (Ci)項 C 1 に記載のポリペプチド、又は項 C 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチド、並びに(Cii)テトラヒドロダイゼインを含む、エクオール合成用キット。

項 C 2 3 . (Ciii)項 C 4 乃至 C 6 のいずれかに記載の細胞、及び(Cii)テトラヒドロダイゼインを含む、エクオール合成用キット。

項 C 2 4 . 少なくとも項 C 1 1 に記載の抗体を含む、項 C 1 に記載のポリペプチド、又は項 C 2 のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを測定するための免疫学的測定用キット。

項 C 2 5 . 少なくとも項 C 1 5 に記載のプライマーを含む、項 C 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドの検出用PCR用キット。

項 C 2 6 . 項 C 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は項 C 2 に記載のポリヌクレオチドを含有する細胞の同定用である、項 C 2 5 に記載の同定用キット。

項 C 2 7 . PCR用のキットである、項 C 2 6 に記載の同定用キット。

項 C 2 8 . 項 C 1 に記載のポリペプチドからなる、エクオール合成酵素。

項 D 1 . 以下の(第 1 工程)及び(第 2 工程)を含む、テトラヒドロダイゼインの製造方法：

(第 1 工程)ダイゼインに、以下の(Aa)~(Ac)のいずれかであるポリペプチドからなる酵素、並びに N A D P H 及び / 又は N A D H を用させることにより、ジヒドロダイゼインを生成する工程；

(Aa)配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Ab)配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び / 又は付加したアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Ac)配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(第 2 工程)ジヒドロダイゼインに、以下の(Ba)~(Bc)のいずれかであるポリペプチドからなる酵素、並びに N A D P H 及び / 又は N A D H を作用させることにより、テトラヒドロダイゼインを生成する工程；

(Ba)配列番号 7 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Bb)配列番号 7 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び / 又は付加したアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Bc)配列番号 7 に記載のアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

10

20

30

40

50

項 D 2 . 項 D 1 に記載の方法により製造された、テトラヒドロダイゼインを含有する生成物。

項 D 3 . 以下の(第 2 工程)及び(第 3 工程)を含む、エクオールの製造方法：

(第 2 工程)ジヒドロダイゼインに、以下の(Ba)~(Bc)のいずれかであるポリペプチドからなる酵素、並びに N A D P H 及び / 又は N A D H を作用させることにより、テトラヒドロダイゼインを生成する工程；

(Ba)配列番号 7 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Bb)配列番号 7 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び / 又は付加したアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Bc)配列番号 7 に記載のアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(第 3 工程)テトラヒドロダイゼインに、以下の(Ca)~(Cc)のいずれかであるポリペプチドからなる酵素、並びに N A D P H 及び / 又は N A D H を作用させることにより、エクオールを製造する工程、

(Ca)配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Cb)配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び / 又は付加したアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド；

(Cc)配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド。

項 D 4 . 項 D 3 に記載の方法により製造された、エクオールを含有する生成物。

項 D 5 . (第 1 工程)~(第 3 工程)を含む、エクオールの製造方法。

項 D 6 . 項 D 5 に記載の方法により製造された、エクオールを含有する生成物。

項 D 7 . 以下の(Ad)~(Af)、(Bd)~(Bf)及び(Cd)~(Cf)からなる群より選択される少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを有する発現ベクター；

(Ad)配列番号 4 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ae)配列番号 1 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Af)前記(Ad)又は(Ae)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Bd)配列番号 1 0 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Be)配列番号 7 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Bf)前記(Bd)又は(Be)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Cd)配列番号 1 6 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ce)配列番号 1 3 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Cf)前記(Cd)又は(Ce)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

項 D 8 . 項 D 7 に記載の発現ベクターによって形質転換された組換え細胞。

項 D 9 . 組換え細胞が細菌性原核細胞である、項 D 8 に記載の組換え細胞。

項 D 1 0 . 細菌性原核細胞がラクトコッカス属に属するものである、項 D 9 に記載の組換え細胞。

10

20

30

40

50

項 D 1 1 . 以下の ( 第 4 工程 ) ~ ( 第 6 工程 ) の少なくとも 2 つの工程を含む、ジヒドロ  
 ダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び / 又はエクオールの製造方法 :

( 第 4 工程 ) (Ad) ~ (Af) のいずれかであるポリヌクレオチドを有する組換え細胞をダイゼ  
 インを含有する培地で培養することにより、ジヒドロダイゼインを生成させる工程、

(Ad) 配列番号 4 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド ;

(Ae) 配列番号 1 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチ  
 ド ;

(Af) 前記 (Ad) 又は (Ae) のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件  
 下でハイブリダイズし、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を  
 有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ;

( 第 5 工程 ) (Bd) ~ (Bf) のいずれかであるポリヌクレオチドを有する組換え細胞をジヒド  
 ロダイゼインを含有する培地で培養することにより、テトラヒドロダイゼインを生成させ  
 る工程、

(Bd) 配列番号 1 0 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド ;

(Be) 配列番号 7 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチ  
 ド ;

(Bf) 前記 (Bd) 又は (Be) のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件  
 下でハイブリダイズし、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを生  
 成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ;

( 第 6 工程 ) (Cd) ~ (Cc) のいずれかであるポリヌクレオチドを有する組換え細胞をテトラ  
 ヒドロダイゼインを含有する培地で培養することにより、エクオールを生成させる工程、

(Cd) 配列番号 1 6 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド ;

(Ce) 配列番号 1 3 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオ  
 チド ;

(Cf) 前記 (Cd) 又は (Ce) のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件  
 下でハイブリダイズし、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを生成する活  
 性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ;

ここで、(Ad) ~ (Af)、(Bd) ~ (Bf) 及び (Cd) ~ (Cf) からなる群より選択されるポリヌクレオ  
 チドの少なくとも 2 つが一つの組換え細胞内にあってもよい。

項 D 1 2 . 組換え細胞が細菌性原核細胞である、項 D 1 1 に記載の製造方法。

項 D 1 3 . 細菌性原核細胞がラクトコッカス属に属するものである、項 D 1 2 に記載の製  
 造方法。

項 D 1 4 . 項 D 1 1 ~ C 1 3 のいずれかに記載の方法により製造された、ジヒドロダイゼ  
 イン、テトラヒドロダイゼイン及び / 又はエクオールを含有する生成物。

項 D 1 5 . 以下の ( 第 1 反応槽 ) ~ ( 第 3 反応槽 ) の少なくとも 1 つの反応槽を備える、  
 ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び / 又はエクオールの製造装置 :

( 第 1 反応槽 ) (Aa) ~ (Ac) のいずれかであるポリペプチドからなる酵素が固定されている  
 反応手段を有しており、該ポリペプチドからなる酵素を用いてダイゼインからジヒドロダ  
 イゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のダイゼインと接触でき  
 るように配置されている ;

( 第 2 反応槽 ) (Ba) ~ (Bc) のいずれかであるポリペプチドからなる酵素が固定されている  
 反応手段を有しており、該ポリペプチドからなる酵素を用いてジヒドロダイゼインからテ  
 トラヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のジヒドロ  
 ダイゼインと接触できるように配置されている ;

( 第 3 反応槽 ) (Ca) ~ (Cc) のいずれかであるポリペプチドからなる酵素が固定されている  
 反応手段を有しており、該ポリペプチドからなる酵素を用いてテトラヒドロダイゼインか  
 らエクオールを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のテトラヒドロダイ  
 ゼインと接触できるように配置されている ;

ここで、前記反応手段の少なくとも 2 つは一つの反応槽に共に存在していてもよい。

項 D 1 6 . 以下の ( 第 4 反応槽 ) ~ ( 第 6 反応槽 ) の少なくとも 1 つの反応槽を備える、

10

20

30

40

50

ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置：

(第4反応槽)(Ad)~(Af)のいずれかであるポリヌクレオチドを有する組換え細胞が固定されている反応手段を有しており、該反応手段を用いてダイゼインからジヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のダイゼインと接触できるように配置されている；

(第5反応槽)(Bd)~(Bf)のいずれかであるポリヌクレオチドを有する組換え細胞が固定されている反応手段を有しており、該反応手段を用いてジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のジヒドロダイゼインと接触できるように配置されている；

(第6反応槽)(Cd)~(Cf)のいずれかであるポリヌクレオチドを有する組換え細胞が固定されている反応手段を有しており、該反応手段を用いてテトラヒドロダイゼインからエクオールを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のテトラヒドロダイゼインと接触できるように配置されている；

ここで、前記反応手段の少なくとも2つが一つの反応槽に共に存在していてもよい。

【発明の効果】

【0012】

本発明のポリペプチドによれば、(1)ダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成すること、(2)ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成すること、及び(3)テトラヒドロダイゼインを基質としてエクオールを合成することができる。従って、本発明は、ダイゼインからエクオールを製造する際に出現し得る中間体であるジヒドロダイゼイン及び/又はテトラヒドロダイゼインの工業的な合成、更にはエクオールの工業的な合成を実現する上で有用である。従来、エクオール産生菌については取り扱いが困難な嫌気性菌株しか見出されていないが、本発明によって、従来のエクオール産生菌を使用せずとも、エクオールの工業的製造への道が開かれる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】実施例A1におけるHPLC分析の結果を示す。図1中、上に示す3つのクロマトグラフは、Control(補酵素未添加)、補酵素としてNADHを添加、補酵素としてNADPHを添加した場合に得られた酵素反応生成物のHPLC分析結果である。また、図1中、下に示す棒グラフは、Control(補酵素未添加)、補酵素としてNADHを添加、補酵素としてNADPHを添加した場合において、ジヒドロダイゼインに相当するピーク面積を示す図である。

【図2】実施例A2において実施したMono Q HPLCの結果を図2中、上に、各フラクションにおけるジヒドロダイゼイン合成酵素の活性を図2中、下に示す。酵素活性はダイゼインを基質とし、生成したジヒドロダイゼインのピーク面積を示す。

【図3】実施例A2において実施したSDS-PAGEの結果を図3中の左に、各フラクションにおけるジヒドロダイゼイン合成酵素の活性を図3中の右に示す。酵素活性はダイゼインを基質とし、生成したジヒドロダイゼインのピーク面積を示す。SDS PAGEには市販のゲル板(SuperSep<sup>TM</sup>10-20%(和光純薬工業株式会社))を使用した。

【図4】実施例A4におけるペプチドマッピングを行った結果及び各ピークに対応するペプチドのアミノ酸配列を示す。図4中、上に示すHPLC分析チャート内に示す矢印の番号は各々、1:FDEPVYPQAE、2:ASRMVMDAVHEGYIAG、3:GYIGNLEVENRAIRMPMで示されるペプチドを示す。

【図5】実施例A5において実施したDenerative-PCR産物のアガロース電気泳動の結果を示す。(1)E1-N-terminal-31とE1-internal-RP1、(2)E1-N-terminal-37とE1-internal-RP1、(3)E1-N-terminal-F32とE1-internal-RP1、マーカーM1: /Styl、M2:100bp Ladder

【図6】実施例A7において実施したRT-PCR産物のアガロース電気泳動の結果を示す。上の図は、ジヒドロダイゼイン合成酵素であり、下の図は、リボゾームRNAである。

【図7】実施例A8において実施したSDS-PAGEの結果を示す。

【図8】実施例A8において実施したHPLC分析の結果を示す。上の図はコントロール、真

10

20

30

40

50

ん中の図は pET-E1-His、下の図はpET21aを示す。

【図 9】実施例 1 における HPLC 分析の結果を示す。図 9 の中で、上のチャートは、シス - テトラヒドロダイゼイン (REF-000312) の HPLC 分析結果；中のチャートは、基質にジヒドロダイゼインを用い、菌破砕物を酵素源にして得られた酵素反応生成物の HPLC 分析結果；下のチャートは、トランス - テトラヒドロダイゼイン (REF-000313) の HPLC 分析結果をそれぞれ示す。

【図 10】実施例 B 1 における HPLC 分析の結果を示す。図 10 の中で、上の 2 つのチャートは、基質にシス - テトラヒドロダイゼイン (REF-000312) を用い、菌破砕物を酵素源にして得られた酵素反応生成物の HPLC 分析結果；下の 2 つのチャートは、基質にトランス - テトラヒドロダイゼイン (REF-000313) を用い、菌破砕物を酵素源にして得られた酵素反応生成物の HPLC 分析結果をそれぞれ示す。

【図 11】実施例 B 2 における HPLC 分析の結果を示す。図 11 の中で、上に示す 3 つのチャートは、Control (補酵素未添加)、補酵素として NADH を添加、補酵素として NADPH を添加した場合に得られた酵素反応生成物の HPLC 分析結果である。また、図 11 の中で、下に示す棒グラフは、Control (補酵素未添加)、補酵素として NADH を添加、補酵素として NADPH を添加した場合において、テトラヒドロダイゼインに相当するピーク面積を示す図である。

【図 12】実施例 B 3 におけるゲルろ過 HPLC 分析の結果を示す。図 12 中、上のグラフは標準タンパク質のゲルろ過 HPLC 分析結果；中のグラフは各フラクションの酵素活性を生成したテトラヒドロダイゼインに相当するピーク面積として示したもの；下のグラフは各フラクションのタンパク質に相当する吸収 (280nm) の強度を示す。

【図 13】実施例 B 3 において SDS-PAGE を行った結果を示す。

【図 14】実施例 B 4 において SDS-PAGE を行った結果を示す。

【図 15】実施例 B 5 において決定したジヒドロダイゼイン合成 (E1) 酵素遺伝子周辺ゲノム構造の模式図を示す。

【図 16 - 1 - a】実施例 B 6 において LC-MS 分析にて取得したデータ及びそれから推定される消化ペプチドのアミノ酸配列の一例を示す。図 16 - 1 中に L で表されるアミノ酸残基は、明細書中において X で表されるアミノ酸残基と同一である。上の図は、ペプチド：TPGVAASVADEXK についてである。下の図は、ペプチド：MPGAPVFGK についてである。

【図 16 - 1 - b】実施例 B 6 において LC-MS 分析にて取得したデータ及びそれから推定される消化ペプチドのアミノ酸配列の一例を示す。図 16 - 1 中に L で表されるアミノ酸残基は、明細書中において X で表されるアミノ酸残基と同一である。上の図は、ペプチド：TPGVAASVADEXK についてである。下の図は、ペプチド：MPGAPVFGK についてである。

【図 16 - 2 - a】実施例 B 6 において LC-MS 分析にて取得したデータ及びそれから推定される消化ペプチドのアミノ酸配列の一例を示す。図 16 - 2 中に L で表されるアミノ酸残基は、明細書中において X で表されるアミノ酸残基と同一である。上の図は、ペプチド：KXXXTGTTK についてである。下の図は、VTQEXXCAHGAFVCGSGR についてである。

【図 16 - 2 - b】実施例 B 6 において LC-MS 分析にて取得したデータ及びそれから推定される消化ペプチドのアミノ酸配列の一例を示す。図 16 - 2 中に L で表されるアミノ酸残基は、明細書中において X で表されるアミノ酸残基と同一である。上の図は、ペプチド：KXXXTGTTK についてである。下の図は、VTQEXXCAHGAFVCGSGR についてである。

【図 16 - 3】実施例 B 6 において LC-MS 分析にて取得したデータ及びそれから推定される消化ペプチドのアミノ酸配列の一例 (WXSPEESVGQR) を示す。図 16 - 3 中に L で表されるアミノ酸残基は、明細書中において X で表されるアミノ酸残基と同一である。

【図 17】実施例 B 7 における HPLC 分析の結果を示す。図 17 の中で、上の左 2 つのチャートは基質にジヒドロダイゼインを用い、ORF-US2 ポリペプチドを発現させた反応液を酵素源にして得られた酵素反応生成物の HPLC 分析結果 (ORF-US2)；上の右 2 つのチャートはタンパク質合成させていない反応液を酵素源にして得られた酵素反応生成物の HPLC 分析結果 (NC) を示す。また、図 17 の中で、下に示す棒グラフは、NC (タンパク質合成無し)、DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼ発現反応液)、ORF-US2 (ORF-US2 ポリペプチド発現反

10

20

30

40

50

応液)を酵素源として酵素反応を行った場合における酵素反応中のDD(ジヒドロダイゼイン)及びTHD(テトラヒドロダイゼイン)に相当するピーク面積を示す図である。

【図18】実施例B8においてSDS-PAGEを行った結果を示す。

【図19】実施例B8におけるHPLC分析の結果を示す。図19の中で、上の2つのチャートの上段は、基質にジヒドロダイゼインを用い、組換えORF-US2ポリペプチドを発現するプラスミドpET21-US2の形質転換体由来の菌破砕液を酵素源にして得られた酵素反応生成物のHPLC分析結果(pET21-US2)を示す。図19の中で、上の2つのチャートの下段は、基質にジヒドロダイゼインを用い、ネガティブコントロールであるpET21a形質転換体由来の菌破砕液を酵素源にして得られた酵素反応生成物のHPLC分析結果(pET21a)を示す。また、図19の中で、下に示す棒グラフは、ORF-US2ポリペプチドを発現させた反応液またはpET21a形質転換体由来の菌破砕液を酵素源として酵素反応を行った場合における酵素反応中のジヒドロダイゼイン(DD)ならびにシス-(c-THD)及びトランス-テトラヒドロダイゼイン(t-THD)に相当するピーク面積を示す図である。

【図20】実施例C1におけるHPLC分析の結果を示す。

【図21】実施例C2において実施したSDS-PAGEの結果を示す。

【図22】実施例C3において実施したHPLC分析の結果を示す。上の図はスタンダード、真ん中の図はpET-US3、下の図はpET21aについてである。

【図23】実施例D2において実施したHPLC分析の結果を示す。最上図はスタンダード、上から二番目の図はE1及びE2、上から三番目の図はE1、一番下の図はE2についてである。

【図24】実施例D3において実施したHPLC分析の結果を示す。最上図はスタンダード、上から二番目の図はE2及びE3、上から三番目の図はE2、一番下の図はE3についてである。

【図25】実施例D4において実施したHPLC分析の結果を示す。最上図はスタンダード、上から二番目の図はE1、E2及びE3、上から三番目の図はE1、上から四番目の図はE2、一番下の図はE3についてである。

【図26】E1酵素に対する金属イオンの影響を示す。

【図27】配列番号1、2及び3に記載のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【図28】配列番号7、8及び9に記載のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【図29】配列番号13、14及び15に記載のアミノ酸配列のアライメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書におけるアミノ酸、ポリペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)および当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### A:ジヒドロダイゼイン合成酵素

本項では、ジヒドロダイゼイン合成酵素(以下、E1酵素と表記する場合もある)について詳しく説明する。ジヒドロダイゼイン合成酵素に関する一般的な説明は、別段の記載がされる場合を除き、後述するテトラヒドロダイゼイン合成酵素及びエクオール合成酵素についても適用される。

【0016】

#### A-1.ポリペプチド

本発明は、ダイゼインを基質として利用し、ジヒドロダイゼインを合成するポリペプチドとして、以下の(Aa)~(Ac)のポリペプチド(以下、該ポリペプチドを「E1ポリペプチド」と表記することもある)を提供する:

(Aa)配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド;例えば1~250個、好ましくは1~200個、より好ましくは1~150個、より好ましくは1~100個、より好ましくは、1~50個、より好ましくは1~30個、更に好ましくは1~15個、更により好ましくは1~5個、特に好ましくは1~4個、より特に好ましくは1~3個、最も好

10

20

30

40

50

ましくは1又は2個が挙げられる。

(Ab)配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Ac)配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

【0017】

上記(Ab)のポリペプチドにおいて、「1若しくは複数」の範囲は、該ポリペプチドがダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成する活性を有することを限度として特に限定されないが、このような(Ab)のポリペプチドの具体例としては、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号1に記載されるアミノ酸配列と比較して配列番号2に記載されるアミノ酸配列は、3個のアミノ酸が置換している。配列番号1に記載のアミノ酸配列と比較して配列番号3に記載のアミノ酸配列は、10個のアミノ酸が置換している。配列番号2に記載されるアミノ酸配列は、バクテロイデス・オバタスE-23-15株(FERM BP-6435号)由来のE1酵素に相当する。配列番号3に記載されるアミノ酸配列は、ストレプトコッカス・コンステラタス A6G-225株(FERM BP-6437号)由来のE1酵素に相当する。

10

【0018】

また、上記(Ab)のポリペプチドにおけるアミノ酸の置換としては、特に制限されないが、ポリペプチドの表現型に変化を来さないという観点から、類似アミノ酸同士による置換が好ましい。具体的には、類似アミノ酸としては、以下のようにグループ分けができる：

20

芳香族アミノ酸：Phe、Trp、Tyr

脂肪族アミノ酸：Ala、Leu、Ile、Val

極性アミノ酸：Gln、Asn

塩基性アミノ酸：Lys、Arg、His

酸性アミノ酸：Glu、Asp

水酸基を有するアミノ酸：Ser、Thr

側鎖の小さいアミノ酸：Gly、Ala、Ser、Thr、Met。

30

【0019】

更に、上記(Ab)のポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加は、ポリペプチドの高次構造に大きく影響しない領域やジヒドロダイゼイン合成酵素としての活性中心に阻害的影響を与えない領域で為されることが望ましい。そのような領域とは、例えば、配列番号1、2、及び3に記載のアミノ酸配列の間で保存性の低い領域及びその近辺、又はN末端領域又はC末端領域を挙げることができる。具体的には、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、第45番目のロイシン、第80番目のアスパラギン第167番目のバリン、第231番目のアスパラギン酸、第233番目のイソロイシン、第435番目のアルギニン、第459番目のアスパラギン酸、第462番目のバリン、第528番目のアルギニン、第540番目のセリン、及び第639番目イソロイシン、並びにこれらのアミノ酸の近辺の領域を挙げることができる。前記「近辺の領域」とは、ジヒドロダイゼイン合成酵素活性に影響を与えない範囲において、前記の特定の位置のアミノ酸を基点として、例えば、前後5個以内のアミノ酸、好ましくは前後4個以内のアミノ酸、より好ましくは前後3個のアミノ酸、特に好ましくは前後2個のアミノ酸を意味し、より特に好ましくは前後1個のアミノ酸である。

40

【0020】

配列番号1に記載のアミノ酸配列において第112番目～第116番目のアミノ酸配列は、NADPH結合ドメインに相当すると考えられる。NADPH結合ドメインの機能を阻害しない限り、当該5個のアミノ酸からなる配列において、アミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加が為されていてもよい。好ましくは、当該配列において、3個以下のアミノ酸

50

、より好ましくは2個以下のアミノ酸、更に好ましくは1個のアミノ酸に対してそのような変異が為されていてもよく、最も好ましくは、当該アミノ酸配列には変異が為されていない。特に、第112番目、115番目及び116番目のアミノ酸に対しては、置換、欠失、挿入又は付加は為されていないことが好ましい。

【0021】

配列番号1に記載のアミノ酸配列における第260番目のヒスチジンはも上記プロトンリレーサイトに関与すると考えられる。よって、プロトンリレーサイトの機能を阻害しない限り、当該ヒスチジンは他のアミノ酸に置換されていてもよいが、好ましくは置換されていない。

【0022】

配列番号1に示されるアミノ酸配列において、第343番目～第363番目のアミノ酸からなる配列は、Fe-Sクラスターモチーフに相当すると考えられる。よって、当該モチーフの機能を阻害しない限り、当該配列において任意のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されていてもよいが、第343番目、第346番目、第350番目及び第363番目のシステインは変異されていないことが好ましい。当該配列における前記3個のアミノ酸以外のアミノ酸が他のアミノ酸に置換される場合は、好ましくは、4個以下のアミノ酸が置換され、より好ましくは3個以下のアミノ酸が置換され、更に好ましくは2個以下のアミノ酸が置換され、特に好ましくは1個のアミノ酸が置換されている。最も好ましくは、当該配列において、アミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加は為されていない。

【0023】

配列番号1に記載のアミノ酸配列において、第390番目～第413番目のアミノ酸からなる配列は、FAD結合ドメインに相当すると考えられる。よって、当該ドメインの機能を阻害しない限り、当該配列において任意のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されていてもよいが、第390番目、第392番目、及び第395番目のグリシンは、変異されていないことが好ましい。当該配列においてアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加される場合は、好ましくは4個以下のアミノ酸、より好ましくは3個以下のアミノ酸、更に好ましくは2個以下のアミノ酸、特に好ましくは1個のアミノ酸について為されていることが好ましい。最も好ましくは、当該配列においてアミノ酸の変異は為されていない。

【0024】

配列番号1に記載のアミノ酸配列において、第512番目～第540番目のアミノ酸からなる配列も、FAD結合ドメインに相当すると考えられる。よって、当該ドメインの機能を阻害しない限り、当該配列において任意のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されていてもよいが、第512番目、第514番目、及び第517番目のグリシンは、変異されていないことが好ましい。当該配列においてアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加される場合は、好ましくは4個以下のアミノ酸、より好ましくは3個以下のアミノ酸、更に好ましくは2個以下のアミノ酸、特に好ましくは1個のアミノ酸について為されていることが好ましい。最も好ましくは、当該配列においてアミノ酸配列において変異は為されない。

【0025】

上記のような機能が想定されるアミノ酸配列領域を示すアライメントを図26に示す。

【0026】

特定のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加させる技術は公知である。

【0027】

上記(Ac)のポリペプチドにおいて、アミノ酸の同一性は、配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して、例えば60%以上であればよいが、通常80%以上、好ましくは85%以上、更に好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、更に特に好ましくは99%以上であることが望ましい。

【0028】

上記(Ac)のポリペプチドの具体例としては、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリ

10

20

30

40

50

ペプチド及び配列番号3のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号1のアミノ酸配列と配列番号2のアミノ酸配列とのアミノ酸の同一性は、99.5%であり、配列番号1のアミノ酸配列と配列番号3のアミノ酸配列とのアミノ酸の同一性は、98.6%である(Blast2)。従って、本発明の好適な一実施形態において、(Ac)ポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して、好ましくは98.6%以上、より好ましくは99.5%以上の同一性を有する。

#### 【0029】

アミノ酸配列の同一性は、市販の又は電気通信回線(インターネット)を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、例えば、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、SEARCH等のソフトウェアを用いて計算される。具体的には、BLAST検索に一般的に用いられる主な初期条件は、以下の通りである。即ち、Advanced BLAST 2.1において、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、及びLambda ratioをそれぞれ11、1、0.85(デフォルト値)にして、他の各種パラメータもデフォルト値に設定して検索を行うことにより、アミノ酸配列の同一性(identity)の値(%)を算出する。

10

#### 【0030】

また、上記(Ab)及び(Ac)のポリペプチドにおいて、「ダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性」は、次のようにして確認することができる。即ち、下記組成の基質溶液中に、確認対象となるポリペプチドを0.001 mg/mLとなるように添加し、37℃で2時間インキュベートし、その後、溶液中にジヒドロダイゼインの有無を確認する。インキュベート後の溶液にジヒドロダイゼインの存在が確認された場合、そのポリペプチドは「ダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性」を有していると判定される。

20

#### 【0031】

##### 基質溶液の組成

0.1 M リン酸カリウム緩衝液  
 1 mM PMSF(フェニルメチルスルフォニルフルオリド)  
 2 mM dithiothreitol  
 5 mM Sodium hydrosulfite  
 2 mM NADPH又はNADH  
 40 μM ダイゼイン  
 pH 7.0

30

#### 【0032】

##### 酵素特性

E1ポリペプチドは、ダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成する酵素活性を有する。よって、E1ポリペプチドは、E1酵素とも称される。E1酵素は、Sodium hydrosulfite等の還元剤やマンガンイオンや鉄イオン等の金属イオンの存在により、その酵素活性が賦活化される。E1酵素は、補酵素として、NADPH又はNADHを必要とし、至適温度は30℃付近であり、至適pHは7.0である。E1酵素は、ダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成するだけでなく、その逆反応、即ち、ジヒドロダイゼインを基質としてダイゼインを合成することも可能である。

40

#### 【0033】

E1ポリペプチドは、後述する遺伝子工学的手法により製造することができるが、E1ポリペプチド産生能を有する微生物から単離精製することも可能である。また、E1ポリペプチドは、配列番号1、2、又は3に記載のアミノ酸配列情報に従って、一般的な化学合成法により製造することもできる、該化学合成法には、通常液相法及び固相法によるペプチド合成法が包含される。

#### 【0034】

以下、E1ポリペプチド産生能を有する微生物から、E1ペプチドを単離精製する方法について、説明する。先ず、E1ポリペプチド産生能を有する微生物の菌体を破砕し、該微生物

50

の粗抽出物を得る。ここで、菌体の破碎には、フレンチプレス、セルミル等の破碎機による処理；低張溶液下超音波処理等の通常の菌体破碎処理に使用されている方法が使用される。また、得られた粗抽出物には、適当な緩衝液を添加しておいてもよい。また、E1ポリペプチドが嫌気性に馴化している場合には、得られた粗抽出物に適当な還元剤を添加し、E1ポリペプチドの失活を抑制しておくことが望ましい。得られた粗抽出物に対しては、その精製度を上げるために、更に、硫酸アンモニウム沈殿、エタノール等を利用した有機溶媒沈殿、又は等電点沈殿等の精製処理に供しても良い。次いで、粗抽出物を、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、各種アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー等の処理に供することにより、E1ポリペプチドを含む画分を得ることができる。なお、これらのクロマトグラフィーによる処理は、必要に応じてオープンカラムを使用してもよく、またHPLCを使用してもよい。また、斯くして得られたE1ポリペプチドを含む画分の純度については、電気泳動、特にSDS-PAGEによって、可視的に簡便に推定できる。また、E1ポリペプチドは、アミノ酸配列分析法；MALDI-TOF MS、ESI Q-TOF MS又はMALDI Q-TOF MS等の質量分析装置を利用した質量分析法；ペプチドマスフィンガープリンティング法等によって確認することもできる。

10

#### 【0035】

また、ここで、E1ポリペプチド産生能を有する微生物は、ダイゼインを所定量含有する培地（特に限定されないが、例えば0.01 µg/mL以上含有する培地）で培養されることが、効率的にE1ペプチドを産生させる点で望ましい。

20

#### 【0036】

また、E1ポリペプチドは、単量体として存在しても良いが、ジヒドロダイゼイン合成能を有する限り、2量体又はそれ以上の多量体として存在してもよい。また、E1ポリペプチドは、安定性を向上させる目的等で、必要に応じて、ポリエチレングリコール又は糖鎖を付加修飾されたものであってもよい。

#### 【0037】

E1ポリペプチドは、ダイゼインを基質として、ジヒドロダイゼインに変換する触媒的役割を演じることができる。該ジヒドロダイゼインは、後述するテトラヒドロダイゼイン合成酵素（E2酵素）及びエクオール合成酵素（E3酵素）によってエクオールに変換される。エクオールは生体内において、種々の生理作用を発揮するものと考えられており、その意味において、エクオールの合成原料を提供できるE1ポリペプチドは重要であると言える。

30

#### 【0038】

##### A - 2 . ポリヌクレオチド

本発明は、更に、ダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、該ポリヌクレオチドを「E1ポリヌクレオチド」と表記することもある）を提供する。具体的には、E1ポリヌクレオチドとして、以下の(Ad)～(Af)のポリヌクレオチドを提供する：

(Ad) 配列番号4に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ae) 配列番号1に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

40

(Af) 前記(Ad)又は(Ae)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

#### 【0039】

配列番号1に記載のアミノ酸配列は、配列番号4に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。配列番号2に記載のアミノ酸配列は、配列番号5に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。配列番号3に記載のアミノ酸配列は、配列番号6に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。

#### 【0040】

50

上記(Af)のポリヌクレオチドにおいて、「ストリンジェントな条件下にハイブリダイズする」とは、標準的なハイブリダイゼーション条件下に、2つのポリヌクレオチド断片が互いにハイブリダイズできることを意味し、本条件は、Sambrook et al., Molecular Cloning : A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USAに記載されている。より具体的には、「ストリンジェントな条件」とは、6.0x SSC中で、約45 にてハイブリダイゼーションを行い、そして2.0x SSCによって50 にて洗浄することを意味する。このような上記(Af)のポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号5に記載のヌクレオチド配列及び配列番号6に記載のヌクレオチド配列を挙げることができる。

【0041】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、通常、プローブとして使用するポリヌクレオチドのヌクレオチド配列と一定以上の同一性を有する。その同一性は、例えば60%以上、好ましくは70%以上、更に好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、更に特に好ましくは98%以上である。ヌクレオチド配列の同一性は、市販の又は電気通信回線(インターネット)を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、例えば、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、SSEARCH等のソフトウェアを用いて計算される。具体的には、BLAST検索に一般的に用いられる主な初期条件は、以下の通りである。即ち、Advanced BLAST 2.1において、プログラムにblastnを用い、各種パラメータはデフォルト値に設定して検索を行うことにより、ヌクレオチド配列の同一性の値(%)を算出する。

【0042】

配列番号4のヌクレオチド配列と配列番号5のヌクレオチド配列との塩基配列の同一性は、99.6%であり、配列番号4のヌクレオチド配列と配列番号6のヌクレオチド配列との塩基配列の同一性は、97.6%である(Blast2)。従って、本発明の好適な一実施形態において、(Af)のポリヌクレオチドは、配列番号4に記載のヌクレオチド配列に対して、97.6%以上の相当性を有し、より好ましくは99.6%以上の相当性を有することが好ましい。

【0043】

また、上記(Af)のポリヌクレオチドにおいて、「ダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性」は、上記(Ab)又は(Ac)のポリペプチドの場合と同様の方法で確認される。

【0044】

E1ポリヌクレオチドは、配列番号4、5、又は6の配列情報に基づいて、化学的DNA合成法により製造、取得することができるが、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる〔Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)；続生化学実験講座「遺伝子研究法I、II、III」、日本生化学会編(1986)等参照〕。

【0045】

化学的DNA合成法としては、フォスフォアミダイト法による固相合成法を例示することができる。この合成法には自動合成機を利用することができる。

【0046】

また、一般的遺伝子工学的手法としては、具体的には、E1ポリヌクレオチドが発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから、E1ポリヌクレオチドに特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981)；Science122, 778 (1983)等〕。

【0047】

ここで、cDNAの起源としては、E1ポリヌクレオチドを発現する生物であれば特に制限されないが、具体的には、エクオール産生能を有する微生物、好ましくはエクオール産生能を有する乳酸菌、バクテロイデス属に属する菌及びストレプトコッカス属に属する菌

10

20

30

40

50

、更に好ましくはエクオール産生能を有するラクトコッカス・ガルビエ、バクテロイデス・オパタス、及びストレプトコッカス・コンステラタス、特に好ましくはエクオール産生能を有する糞便由来のラクトコッカス・ガルビエ、特にエクオール産生能を有する糞便由来のラクトコッカス・ガルビエであるラクトコッカス20-92株（FERM BP-10036号；独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて寄託）、バクテロイデス・オパタスE-23-15株（FERM BP-6435号；独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて寄託）、ストレプトコッカス・コンステラタス A6G-225株（FERM BP-6437号；独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号）にて寄託）が例示される。

【0048】

また、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従って実施することができる。また、本発明のポリヌクレオチドをcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAによって産生されるポリペプチドに対して、該ポリペプチド特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のヌクレオチド配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せ等を例示できる。

【0049】

ここで用いられるプローブとしては、E1ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に関する情報（例えば、配列番号4、5、又は6のヌクレオチド配列）をもとにして化学合成されたDNA等が一般的に例示できる。また、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列情報に基づき設定したセンスプライマー及び/又はアンチセンスプライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

【0050】

E1ポリヌクレオチドの取得に際しては、PCR法〔Science130, 1350 (1985)〕またはその変法によるDNA若しくはRNA増幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法〔Rapid amplification of cDNA ends；実験医学、12(6), 35 (1994)〕、特に5'-RACE法〔M.A. Frohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998 (1988)〕等の採用が好適である。これらRACE法及び5'-RACE法は、真核生物由来のE1ポリヌクレオチドを取得する際に有用である。

【0051】

かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、E1ポリヌクレオチドの配列情報に基づいて適宜設定することができ、これは常法に従って合成できる。尚、増幅させたDNA若しくはRNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法、ハイブリダイゼーション法等によることができる。

【0052】

E1ポリヌクレオチドによれば、通常遺伝子工学的手法を用いることにより、該ポリヌクレオチドの産物（即ち、上記ポリペプチド）を容易に大量に、安定して製造することができる。従来、エクオール産生菌については取り扱いが困難な嫌気性菌株しか見出されていないが、E1ポリヌクレオチドの単離に成功したことによって、従来のエクオール産生菌を使用せずとも、エクオールの工業的生産への道が開かれる。

【0053】

A-3. 発現ベクター

本発明の発現ベクターは、E1ポリヌクレオチドを含んでおり、且つ該E1ポリヌクレオチドを発現できるものであれば特に制限されず、一般に宿主細胞との関係から適宜選択される。

【0054】

宿主細胞として原核生物の細胞を使用する場合、発現ベクターとしては、例えば該宿主

10

20

30

40

50

細胞中で複製可能なプラスミドベクターであって、このベクター中に上記ポリヌクレオチドが発現できるように上記ポリヌクレオチドの上流にプロモーター及びSD（シヤイン・アンド・ダルガーノ）塩基配列を付与した発現プラスミドを挙げることができる。具体的には、P<sub>L</sub>プロモーター、T7プロモーターおよびlacプロモーターを利用した発現プラスミドを挙げるができる。他の好ましい細菌発現ベクターとしてはtacプロモーター又はtrcプロモーターを利用したプラスミドpKK233 - 2及びpKK233 - 3等を挙げるができる。ただし、これらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターをも利用できる。

【0055】

また、宿主細胞として真核細胞を使用する場合、発現ベクターとしては、通常発現しようとする上記ポリヌクレオチドの上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。上記ポリヌクレオチドを挿入するのに有用な真核生物ベクターはよく知られている。例えば、適当な真核生物ベクターとしてはpCD及びpCMVを例示することができる。また、これらの他には、必要に応じて、MMTV又はSV40後期プロモーターを利用したpMSG及びpSVLを挙げるができる。ただし、これらに限定されず公知の各種の真核生物及びベクターをも利用できる。

10

【0056】

A - 4 . 組み換え細胞

本発明は、上記E1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターによって形質転換された組み換え細胞（形質転換体）を提供する。

20

【0057】

組み換え細胞に使用される宿主細胞としては、原核細胞及び真核細胞のいずれを使用してもよい。

【0058】

宿主細胞として使用される原核細胞としては、ラクトコッカス属に属する乳酸菌等の細菌性原核細胞を好適に使用できるが、他に、好気的条件下で生育可能な細菌性原核細胞（例えば、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等）を例示することができる。

【0059】

宿主細胞として使用される真核細胞としては、例えば、酵母、アスペルギルス等の真核微生物；ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞；L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞等を例示することができる。

30

【0060】

また、上記発現ベクターを宿主細胞に導入する方法は、特に制限されず、一般的な各種方法を採用することができる。例えば、上記発現ベクターの宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）等の多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法に従って行うことができ、その具体的手法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション（transvection）、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレップローディング（scrape loading）、弾丸導入（ballistic introduction）、感染等が挙げられる。

40

【0061】

50

該組み換え細胞は、ジヒドロダイゼイン変換酵素であるE1ポリペプチドを産生できるので、ジヒドロダイゼイン変換酵素の製造のために利用することができ、また細胞の状態のままジヒドロダイゼインの製造に利用することもできる。

【0062】

A - 5 . 組み換え細胞を用いたポリペプチドの製造

E1ポリヌクレオチドが導入された組み換え細胞を培養し、細胞及び又は培養物からE1ポリペプチドを回収することにより、E1ポリペプチドを製造することができる。

【0063】

培養は、宿主に適した培地を用いて継代培養又はバッチ培養を行えばよい。培養は、組み換え細胞の内外に生産されたE1ポリペプチド量を指標にして、E1ポリペプチドが適量得られるまで行えばよい。

【0064】

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

【0065】

また、斯くして得られるE1ポリペプチドは、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作〔「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987) 等参照〕により分離、精製できる。具体的には、上記「A - 1 . ポリペプチド」の欄に記載の「E1ポリペプチド産生能を有する微生物から、E1ペプチドを単離精製する方法」と同様の方法が例示される。

【0066】

A - 6 . E1ポリペプチドを用いたジヒドロダイゼインの製造

本発明は、E1ポリペプチドを用いたジヒドロダイゼインの製造方法を提供する。即ち、該製造方法では、E1ポリペプチドを、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。好ましくは、E1ポリペプチドを、NADPHの存在下で、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。

【0067】

E1ポリペプチドのジヒドロダイゼイン合成酵素活性は、 $Mn^{2+}$ 及び $Fe^{2+}$ の存在によって賦活されるため、 $Mn^{2+}$ 及び/又は $Fe^{2+}$ の存在下でE1ペプチドをダイゼインに作用させることが好ましい。E1ポリペプチドの当該酵素活性を賦活することができる限り $Mn^{2+}$ 及び/又は $Fe^{2+}$ の反応溶液における濃度は特に制限されない。 $Fe^{2+}$ の濃度は、好ましくは2mM以上であり、より好ましくは2mM~100mMであり、さらに好ましくは10mM~40mMである。 $Mn^{2+}$ の濃度は、好ましくは0.2 $\mu$ Mであり、より好ましくは0.2 $\mu$ M~100mMであり、更に好ましくは1.0 $\mu$ M~40mMである。

【0068】

本製造方法に採用される反応は、適当な緩衝液中で行うことができる。例えば、緩衝液としては、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液等を例示される。また、該反応におけるpH条件については、E1ポリペプチドの所望の酵素活性が失活しない範囲で適宜反応条件とすることができるが、好ましくはpH 5.0~10.0、更に好ましくは6.0~8.0を例示することができる。

【0069】

また、該反応には、必要に応じてPMSF、EDTA等のプロテアーゼ阻害剤を適量添加してもよい。また、上記ポリペプチドが嫌気性菌由来であることを考慮すると、DTT、2ME、DET、Sodium hydrosulfite等の還元剤を適量添加してもよい。

【0070】

本製造方法に採用される反応は、例えば、反応開始時に溶媒中で各成分を下記の濃度範囲を満たすように添加して原料混合物を調製し、これを20~45℃、好ましくは25~40℃、

10

20

30

40

50

更に好ましくは30～38 の温度条件で、0.5～10時間、好ましくは1～6時間、更に好ましくは2～4時間インキュベートすることにより実施される：

上記ポリペプチドが0.0001～1.0重量%、好ましくは0.001～0.1重量%、更に好ましくは0.001～0.01重量%；

ダイゼインが0.0001～10.0重量%、好ましくは0.001～1.0重量%、更に好ましくは0.001～0.1重量%；及び

NADPH及び/又はNADHが0.01～5重量%、好ましくは0.05～1重量%、更に好ましくは0.1～0.5重量%。

#### 【0071】

また、本発明は、ジヒドロダイゼインを合成するための混合原料として、(Ai)E1ポリペプチド、(Aii)NADPH及び/又はNADH、及び(Aiii)ダイゼインを含有するジヒドロダイゼイン合成原料組成物を提供する。更に本発明はジヒドロダイゼインを合成するための混合原料として、(Ai)E1ポリペプチド、(Aii)NADPH及び/又はNADH、(Aiii)ダイゼイン、並びに(Aiv)  $Mn^{2+}$  及び/又は  $Fe^{2+}$  を含有するジヒドロダイゼイン合成原料組成物を提供する。該合成原料組成物を前述する条件でインキュベートすることにより、該合成原料組成物中のダイゼインをジヒドロダイゼインに変換することができる。該合成原料組成物は、上記ジヒドロダイゼインの製造において、反応開始時の原料混合物に相当するものであり、該合成原料組成物におけるE1ポリペプチドの配合濃度、NADPH及び/又はNADHの配合濃度、ダイゼインの配合濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等についても、上記製造方法に採用される反応系（反応開始時の原料混合溶液）の場合と同様である。

10

20

#### 【0072】

更に、本発明は、ジヒドロダイゼインを合成するためのキットとして、(Ai)E1ポリペプチド、(Aii)NADPH及び/又はNADH、並びに(Aiii)ダイゼインを含有するジヒドロダイゼイン合成用キットを提供する。本発明は、ジヒドロダイゼインを合成するためのキットとして、(Ai)E1ポリペプチド、(Aii)NADPH及び/又はNADH、(Aiii)ダイゼイン、並びに(Aiv)  $Mn^{2+}$  及び/又は  $Fe^{2+}$  を含有するジヒドロダイゼイン合成用キットを提供する。該合成用キットには、前述する条件でダイゼインからジヒドロダイゼインの合成を簡易に実施できるように、各成分が必要に応じて分けられて備えられていればよい。また、該合成用キットには、必要に応じて、使用する緩衝液が含まれていても良い。更に、該合成用キットは、ジヒドロダイゼインの合成を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

30

40

#### 【0073】

##### A-7. ジヒドロダイゼイン合成酵素組成物

本発明は、更に、E1ポリペプチドを含むジヒドロダイゼイン合成酵素組成物を提供する。該酵素組成物は、E1ポリペプチドを用いたジヒドロダイゼインの製造方法において、ジヒドロダイゼイン合成酵素として好適に使用される。

#### 【0074】

該酵素組成物は、粗精製の状態のE1ポリペプチドであってもよく、また粗精製又は精製されたE1ポリペプチドを適当な担体に配合したものであってもよい。

#### 【0075】

該酵素組成物において、E1ポリペプチドの配合割合については、上記ジヒドロダイゼインの製造方法において、ジヒドロダイゼイン合成酵素として使用できる限り、特に制限されない。具体的には、該酵素組成物の総量当たり、E1ポリペプチドが0.001～20.0重量%、好ましくは0.005～5.0重量%、更に好ましくは0.01～1.0重量%が例示される。

#### 【0076】

該酵素組成物には、E1ポリペプチドの補酵素として作用するNADPH及び/又はNADHを含んでいても良い。該酵素組成物にNADPH及び/又はNADHを配合する場合、該NADPH及び/又はNADHの配合割合については、特に制限されないが、該酵素組成物当たり、0.0005～25.0重量%、好ましくは0.005～5.0重量%、更に好ましくは0.01～2.5重量%が例示される。

50

## 【0077】

また好適な一実施形態において、該酵素組成物は、 $Mn^{2+}$ 及び/又は $Fe^{2+}$ を含む。該酵素組成物に $Mn^{2+}$ 及び/又は $Fe^{2+}$ の金属イオンを含む場合、金属イオンの配合割合は、E1ポリペプチドのジヒドロダイゼイン合成酵素活性を賦活することができる限り特に制限されない。 $Fe^{2+}$ の配合割合は、当該組成物当たり、好ましくは2mM以上であり、より好ましくは2mM~100mMであり、更に好ましくは10mM~40mMである。 $Mn^{2+}$ の配合割合は、当該組成物当たり、好ましくは0.2 $\mu$ M以上であり、より好ましくは0.2 $\mu$ M~100mMであり、更に好ましくは1.0 $\mu$ M~40mM配合される。

## 【0078】

更に、該酵素組成物には、E1ポリペプチドの他に、該ポリペプチドの安定性を向上せしめるために、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、システイン等の抗酸化剤を含んでいても良い。また、該酵素組成物の保存性を担保するために、必要に応じて、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等の保存剤を添加してもよい。

## 【0079】

A-8. 上記組み換え細胞を用いたジヒドロダイゼインの製造方法

本発明は、E1ポリヌクレオチドが導入された組み換え細胞を用いたジヒドロダイゼインの製造方法を提供する。即ち、該製造方法では、上記組み換え細胞を、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。

## 【0080】

本製造方法に採用される反応は、上記組み換え細胞が生存でき、且つダイゼインをジヒドロダイゼインに変換できる環境下で実施される。

## 【0081】

具体的には、上記組み換え細胞が生育可能な培地中に、上記組み換え細胞、及びダイゼインを適量添加して培養を行うことにより実施される。

## 【0082】

本製造方法において、使用される培地は、組み換え細胞の宿主細胞として採用した細胞の種類に応じて、慣用される各種のものを適宜選択利用される。

## 【0083】

また、該培地には、必要に応じてPMSF、EDTA等のプロテアーゼ阻害剤を適量添加してもよい。また、上記ポリペプチドが嫌気性菌由来であることを考慮すると、DTT、2ME、DET、Sodium hydrosulfite等の還元剤を適量添加してもよい。また、上記組み換え細胞を利用する場合、NADPH及び/又はNADHの添加は、必須ではないが、必要に応じて、培地中にNADPH及び/又はNADHを添加しても良い。更に、該培地には、 $Mn^{2+}$ 及び/又は $Fe^{2+}$ を添加してもよい。

## 【0084】

本製造方法は、具体的には、ダイゼインを0.001~1重量%、好ましくは0.01~1重量%、更に好ましくは0.01~0.5重量%を含む培地に、上記組み換え細胞を接種し、生育可能温度条件下で6~30時間、好ましくは7~24時間、更に好ましくは7~18時間インキュベートすることにより実施される。

## 【0085】

また、本発明は、ジヒドロダイゼインを合成するための混合原料として、(Aiv)上記組み換え細胞、及び(Aiii)ダイゼインを含有するジヒドロダイゼイン合成原料組成物を提供する。該合成原料組成物を前述する条件で培養することにより、該合成原料組成物中のダイゼインをジヒドロダイゼインに変換することができる。該合成原料組成物は、上記ジヒドロダイゼインの製造において、反応開始時の原料混合物に相当するものであり、該合成原料組成物における上記組み換え細胞、及びダイゼインの濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等についても、上記製造方法に採用される条件等と同様である。

## 【0086】

10

20

30

40

50

更に、本発明は、ジヒドロダイゼインを合成するためのキットとして、(Aiv)上記組み換え細胞、及び(Aiii)ダイゼインを含有するジヒドロダイゼイン合成用キットを提供する。また、本発明は、ジヒドロダイゼインを合成するためのキットとして、(Aiv)上記組み換え細胞、(Aiii)ダイゼイン、並びに(Aiv)  $Mn^{2+}$  及び/又は  $Fe^{2+}$  を含有するジヒドロダイゼイン合成用キットを提供する。該合成用キットには、前述する条件でダイゼインからジヒドロダイゼインの合成を簡易に実施できるように、上記組み換え細胞とダイゼインが、必要に応じて区分けされて備えられていればよい。また、該合成用キットには、必要に応じて、緩衝液や培地が含まれていても良い。更に、該合成用キットは、ジヒドロダイゼインの合成を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

10

## 【0087】

なお、該合成用キットに含まれる上記組み換え細胞は、公知の方法で保存されたものであってもよい。組み換え細胞を保存する技術は公知であり、例えば、ジメチルホルムアミド等に組み換え細胞を入れて凍結乾燥機でアンブルが真空状態になるよう処理した後、4～25℃で保存する方法等を挙げることができる。この他にも、10%グリセロール加保存培地に菌体を懸濁し、これを専用アンブルに収め、液体窒素タンク(-150～-196℃)で保管する液体窒素法を挙げられる。

## 【0088】

A-9. 上記ポリペプチドに結合性を有する抗体

本発明は、更に、E1ポリペプチドに結合性を有する抗体(IgG抗体)を提供する。

20

## 【0089】

モノクローナル抗体は、従来法に従って作製される。具体的には、ハーローとレーン(Harlow, H. and Lane, D.)、「抗体：実験室マニュアル」中、コールドスプリングハーバーラボ(Cold Spring Harbor Lab)、ニューヨーク、139-240頁(1988)に記載の方法に従って作製することができる。

## 【0090】

また、ポリクローナル抗体についても、従来法に従って作製される。具体的には、細胞工学実験プロトコル(東京大学医科学研究所制癌研究部編、1992年、155～173ページ)等に記載の方法に従って作製することができる。

## 【0091】

ポリクローナルIgG抗体及びモノクローナルIgG抗体とも、通常の硫酸アンモニウム沈澱法及びプロテインAクロマトグラフィー等により精製することができる。

30

## 【0092】

A-10. 上記ポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法

更に、本発明は、上記抗体を用いてE1ポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法を提供する。具体的には、該免疫学的方法は、上記抗体を被験試料に接触させることにより実施される。即ち、上記抗体を被験試料に接触させることにより、被験試料中にE1ポリペプチドが存在する場合には、上記抗体とE1ポリペプチドが特異的に結合する。次いで、E1ポリペプチドに結合した上記抗体を検出し、必要に応じてこれを定量することにより、被験試料中の上記ポリペプチドを検出又は測定することができる。

40

## 【0093】

ここで、被験試料とは、E1ポリペプチドの検出又は測定の対象となる試料である。E1ポリペプチドは、細菌性原核細胞内に見出されることが予測されるので、細菌性原核細胞内に存在するE1ポリペプチドの検出又は測定の目的に、該免疫学的方法は好適である。なお、細胞内に存在するE1ポリペプチドの検出又は測定を行う場合には、当該細胞に対して破砕処理を行ったもの、又は該破砕処理の後にタンパク質の精製処理を行ったものを被験試料として使用すればよい。

## 【0094】

抗体を利用した免疫学的方法によって、目的のポリペプチドを検出又は測定する手法は公知であり、当業者であれば、免疫学的方法における適当な諸条件については適宜設定可

50

能である。例えば、ラジオイムノアッセイ法、ELISA法等を採用し、適当な条件を適宜設定すればよい。

【0095】

更に、本発明は、E1ポリペプチドを検出又は測定するためのキットとして、上記抗体を含有する免疫学的検出用キットを提供する。該検出用キットには、必要に応じて、E1ポリペプチドが標準品として含まれていてもよい。更に、該検出用キットには、前述する条件でE1ポリペプチドの検出を簡易に実施できるように、その他に使用される試薬等が、必要に応じて備えられていてもよい。また、該検出用キットは、E1ポリペプチドの検出を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいてもよい。

【0096】

A - 11 . 上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの検出又は測定する方法

また、本発明は、E1ポリヌクレオチドを検出又は測定する方法を提供する。該方法は、具体的には、E1ポリヌクレオチドに結合するプローブを被験試料と接触させることにより実施される。即ち、該プローブを被験試料に接触させることにより、被験試料中にE1ポリヌクレオチドが存在する場合には、該プローブとE1ポリヌクレオチドがハイブリダイズする。次いで、この二本鎖の形成の有無を検出し、必要に応じてこれを定量することにより、被験試料中のE1ポリヌクレオチドを検出又は測定することができる。

【0097】

ここで、被験試料とは、E1ポリヌクレオチドの検出又は測定の対象となる試料である。E1ポリヌクレオチドは、細菌性原核細胞内に見出されることが予測されるので、細菌性原核細胞内に存在するE1ポリヌクレオチドの検出又は測定の目的に、該方法は好適である。なお、細胞内に存在するE1ポリヌクレオチドの検出又は測定を行う場合には、当該細胞に対して破碎処理を行ったもの、又は該破碎処理の後に核酸の精製処理を行ったものを被験試料として使用すればよい。

【0098】

また、該方法に使用されるプローブとしては、上記ポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズできるヌクレオチド配列を有するものが使用される。ここで、ストリンジентな条件とは、プローブ又はプライマーとして用いられる通常の条件を挙げることができるが、具体的には上記A - 2 . セクションに示す条件が例示される。

【0099】

該プローブは、E1ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列（例えば、配列番号4、5、又は6に記載のヌクレオチド配列）に関する情報を基にして化学合成したものであってもよく、また既に取得されたE1ポリヌクレオチドやその断片からなるものであってもよい。また、該プローブは、通常、標識したプローブを用いるが、非標識であってもよい。また、該プローブをPCR用のプライマー（センスプライマー又はアンチセンスプライマー）として使用する場合、その長さについては、約10~40ヌクレオチド程度、特に20~30ヌクレオチド程度が好ましく例示される。

【0100】

該方法は、該プローブを用いて、上記ポリヌクレオチドを特異的に検出する方法としては、例えば、ブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンプロット法、ノーザンプロット法、PCR法等が挙げられるが、感度の点からは、該プローブをプライマーとして利用したPCR法によりE1ポリヌクレオチド又はその一部を増幅する方法が好適に採用される。

【0101】

PCR法としては、例えばRT - PCR法が例示されるが、当該分野で用いられる種々の変法を適応することが出来る。PCR法を用いて、E1ポリヌクレオチドの存在とその量を定量することも可能である。該方法としては、MSSA法の如き競合的定量法(Kinoshita, M., et al., CCA, 228, 83-90 (1994))、または一本鎖DNAの高次構造の変化に伴う移動度の変化を利用した突然変異検出法として知られるPCR - SSCP法(Orita, M.,

10

20

30

40

50

et al., Genomics, 5, 874-879 (1989)) を例示できる。

【 0 1 0 2 】

更に、本発明は、E1ポリヌクレオチドを検出又は測定するためのキットとして、上記プローブを含有するE1ポリヌクレオチド検出用キットを提供する。該検出用キットには、前述する条件でE1ポリヌクレオチドの検出を簡易に実施できるように、上記プローブ以外に使用される試薬等が、必要に応じて備えられていてもよい。また、該検出用キットは、E1ポリヌクレオチドを含有する細胞を同定するためのキットとして使用することもできる。また、該検出用キットとしては、精度の高い検出を可能にするという観点から、好ましくはPCRによる検出を行うためのキットが挙げられる。

【 0 1 0 3 】

B . テトラダイゼイン合成酵素

B - 1 . ポリペプチド

本発明は、ジヒドロダイゼインを基質として利用しテトラヒドロダイゼインを合成するポリペプチドとして、以下の(Ba) ~ (Bc)のポリペプチド(以下、該ポリペプチドを「E2ポリペプチド」と表記することもある)を提供する：

(Ba) 配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Bb) 配列番号7に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Bc) 配列番号7に記載のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

【 0 1 0 4 】

上記(Bb)のポリペプチドにおいて、「1若しくは複数」の範囲は、該ポリペプチドがジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有することを限度として特に限定されないが、例えば1 ~ 50個、好ましくは1 ~ 30個、より好ましくは1 ~ 15個、更に好ましくは1 ~ 5個、より更に好ましくは1 ~ 4個、特に好ましくは1 ~ 3個、更に特に好ましくは1又は2個が挙げられる。

【 0 1 0 5 】

このような(Bb)のポリペプチドの具体例としては、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号7に記載のアミノ酸配列と比較して配列番号8に記載のアミノ酸配列は、2個のアミノ酸配列が置換されており、N末端に24アミノ酸からなるアミノ酸配列が付加されている。配列番号7に記載のアミノ酸配列と比較して配列番号9に記載のアミノ酸配列と、20個のアミノ酸が置換されており、1個のアミノ酸が欠失している。配列番号8に記載されるアミノ酸配列は、バクテロイデス・オバタスE-23-15株(FERM BP-6435号)由来のE2酵素に相当する。配列番号9に記載されるアミノ酸配列は、ストレプトコッカス・コンステラタス A6G-225株(FERM BP-6437号)由来のE2酵素に相当する。

【 0 1 0 6 】

上記(Bb)のポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加は、前記A-1.セクションに記載されるE1ポリペプチドにおける置換、欠失、挿入又は付加に準じて為され得る。(Bb)のポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加は、ポリペプチドの高次構造に大きく影響しない領域やテトラヒドロダイゼイン合成酵素としての活性中心に阻害的影響を与えない領域で為されることが望ましい。そのような領域としては、例えば、配列番号7、8、及び9に記載のアミノ酸配列の間で保存性の低い領域及びその近辺、又はN末端領域又はC末端領域を挙げることができる。具体的には、配列番号7に記載されるアミノ酸配列において、第7番目のバリン、第8番目のプロリン、第26番目のバリン、第36番目のロイシン、第46番目のアルギニン、第94番目のアスパラギン酸、第101番目のグルタミン酸、第126番目のグリシン、第137番目のイソロイシ

10

20

30

40

50

ン、第156番目のグルタミン、第157番目のリジン、159番目のアスパラギン酸、第160番目、第171番目のアラニン、第185番目のシステイン、第221番目のセリン、第233番目のアラニン、第241番目のバリン、第258番目のセリン、第266番目のイソロイシン、及び第286番目のバリン、並びにこれらのアミノ酸の近辺の領域を挙げることができる。前記「近辺の領域」とは、テトラヒドロダイゼイン合成酵素活性に影響を与えない範囲において、前記の特定の位置のアミノ酸を基点として、前後5個以内のアミノ酸、好ましくは、前後4個以内のアミノ酸、より好ましくは前後3個以内のアミノ酸、更に好ましくは前後2個以内のアミノ酸、特に好ましくは前後1個のアミノ酸である。

**【0107】**

配列番号7に記載されるアミノ酸配列において、第38番目～45番目のアミノ酸からなる配列は、NADPH結合ドメインに相当すると考えられる。よって、当該ドメインの機能が阻害されない限り、当該配列において、任意のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されていてもよいが、好ましくは、第38番目のスレオニン、第39番目のグリシン、第43番目のグリシン、及び第45番目のグリシンは変異されていないことが好ましい。当該配列においてアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加される場合は、好ましくは4個以下のアミノ酸、より好ましくは3個以下のアミノ酸、更に好ましくは2個以下のアミノ酸、特に好ましくは1個のアミノ酸について為されていることが好ましい。

10

**【0108】**

配列番号7に記載されるアミノ酸配列において、第115番目～第118番目のアミノ酸から成る配列は、SDRファミリーに保存性の高いモチーフに相当すると考えられる。当該配列においてアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加が為される場合は、好ましくは3個以下のアミノ酸、より好ましくは2個以下のアミノ酸、更に好ましくは1個のアミノ酸について為される。当該配列においては、アミノ酸の変異が為されないことが最も好ましい。

20

**【0109】**

配列番号7に記載されるアミノ酸配列において、第168番目のセリン、第182番目のヒスチジン、第186番目のリジンは、E2酵素の活性中心に関与していると考えられる。よって、当該酵素活性を阻害しない限り、前記3個のアミノ酸を任意の他のアミノ酸に置換することができるが、これらのアミノ酸に対しては、変異が為されていないことが好ましい。

30

**【0110】**

配列番号7に記載されるアミノ酸配列において、第212番目～217番目のアミノ酸から成る配列は、補因子との結合に関与すると考えられる。よって、当該機能を阻害しない限り、当該配列において任意のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されていてもよいが、好ましくは、第212番目のプロリン、第213番目のグリシン、及び第217番目のスレオニンは変異されない。当該配列においてアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加される場合は、好ましくは3個以下のアミノ酸、より好ましくは2個以下のアミノ酸、更に好ましくは1個のアミノ酸について為されている。特に好ましくは、当該配列においてアミノ酸の変異が為されていない。上記のような機能が想定されるアミノ酸配列領域を示すアライメントを図27に示す。

40

**【0111】**

上記(Bc)のポリペプチドにおいて、アミノ酸の同一性は、配列番号7に記載のアミノ酸配列に対して、例えば60%以上であればよいが、通常80%以上、好ましくは85%以上、更に好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、更に特に好ましくは99%以上であることが望ましい。

**【0112】**

上記(Bc)のポリペプチドの具体例としては、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号7に記載のアミノ酸配列と配列番号8に記載のアミノ酸配列との同一

50

性は、99.3%であり、配列番号7に記載のアミノ酸配列と配列番号9に記載のアミノ酸配列との同一性は、93.0%である(Blast2)。従って、本発明の好適な一実施形態において、(Bc)ポリペプチドは、配列番号7に記載のアミノ酸配列に対して、好ましくは93.0%以上、より好ましくは99.3%以上の同一性を有する。

#### 【0113】

また、上記(Bb)及び(Bc)のポリペプチドにおいて、「ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性」は、次のようにして確認することができる。即ち、下記組成の基質溶液中に、確認対象となるポリペプチドを0.001 mg/mLとなるように添加し、37℃で2時間インキュベートし、その後、溶液中にテトラヒドロダイゼインの有無を確認する。インキュベート後の溶液にテトラヒドロダイゼインの存在が確認された場合、そのポリペプチドは「ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性」を有していると判定される。

#### 【0114】

##### 基質溶液の組成

0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)

1 mM PMSF(フェニルメチルスルフォニルフルオリド)

2 mM dithiothreitol

5 mM Sodium hydrosulfite

2 mM NADPH

2 mM NADH

40 μM ジヒドロダイゼイン

#### 【0115】

##### 酵素特性

E2ポリペプチドは、ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する酵素活性を有する。よって、E2ポリペプチドは、E2酵素とも称される。E2酵素は、補酵素として、NADPH又はNADHを必要とする。E2酵素の至適温度は37℃付近であり、至適pHは4.5である。E2酵素は、ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成するだけでなく、その逆反応、即ち、テトラヒドロダイゼインを基質としてジヒドロダイゼインを合成することも可能である。

#### 【0116】

E2ポリペプチドは、前記E1ペプチドと同様に、配列番号10、11、又は12に記載のヌクレオチド配列情報を用いて遺伝子工学的手法で得ることができる。また、配列番号7、8、又は9に記載のアミノ酸配列情報に基づいて化学合成法によって得ることもできる。さらにE2ポリペプチド産生能を有する微生物から単離精製することによって得ることも可能である。これらの方法は、上記A-1.セクションの記載に準じて行うことができる。

#### 【0117】

E2ポリペプチド産生能を有する微生物は、所望量のジヒドロダイゼイン、さらにはダイゼインを含有する培地で培養してもよい。この場合でも、E2ポリペプチド産生能を有する微生物からE2ポリペプチドを産生させることができる。

#### 【0118】

E2ポリペプチドは、単量体として存在しても良いが、テトラヒドロダイゼイン合成能を有する限り、2量体又はそれ以上の多量体として存在してもよい。また、E2ポリペプチドは、安定性を向上させる目的等で、必要に応じて、ポリエチレングリコール又は糖鎖を付加修飾されたものであってもよい。

#### 【0119】

E2ポリペプチドは、ジヒドロダイゼインを基質として、テトラヒドロダイゼインに変換する触媒的役割を演じることができる。該テトラヒドロダイゼインは、更に後述するエクオール合成酵素によってエクオールに変換される。エクオールは生体内において、種々の生理作用を発揮するものと考えられており、その意味において、エクオールの合成原料を提供できるE2ポリペプチドは重要であると言える。このように、本発明は、前記(Ba)~(B

10

20

30

40

50

c)のポリペプチドを含むテトラヒドロダイゼイン合成酵素を提供する。

【0120】

B-2. ポリヌクレオチド

本発明は、更に、ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、該ポリヌクレオチドを「E2ポリヌクレオチド」と表記することもある）を提供する。具体的には、E2ポリヌクレオチドとして、以下の(Bd)～(Bf)のポリヌクレオチドを提供する：

(Bd)配列番号10に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Be)配列番号7に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Bf)前記(Bd)又は(Be)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0121】

配列番号7に記載のアミノ配列は、配列番号10に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。配列番号8のアミノ酸配列は、配列番号11に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。配列番号9に記載のアミノ酸配列は、配列番号12に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。

【0122】

上記(Bf)ポリヌクレオチドに関する「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、前記A-2.に記載の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」と同義である。(Bf)のポリヌクレオチドの具体例としては、配列番号11に記載のヌクレオチド配列及び配列番号12に記載のヌクレオチド配列を挙げることができる。配列番号10に記載のヌクレオチド配列と配列番号11に記載のヌクレオチド配列との塩基配列の相同性は、99.7%であり、配列番号10に記載のヌクレオチド配列と配列番号12に記載のヌクレオチド配列との塩基配列の相同性は、91.0%である(Blast2)。従って、本発明の好適な一実施形態において、(Bf)のポリヌクレオチドは、配列番号10に記載のヌクレオチド配列に対して、91.0%以上の相当性を有し、より好ましくは99.7%以上の相当性を有する。

【0123】

上記(Bf)のポリヌクレオチドにおいて、「ジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性」は、上記(Bb)又は(Bc)のポリペプチドの場合と同様の方法で確認される。

【0124】

E2ポリヌクレオチドは、配列番号10、11、又は12に記載の配列情報に基づいて、化学的合成法又は遺伝子工学的手法によって製造・取得することが可能である。具体的な手法としては、上記E1ポリヌクレオチドに関するA-2.セクションに記載した方法を使用することができる。そのような方法は、必要に応じて、修正・変更することができる。

【0125】

E2ポリヌクレオチドのcDNAの起源としては、E2ポリヌクレオチドを発現する微生物であれば特に制限されないが、具体的には、エクオール産生能を有する微生物、好ましくはエクオール産生能を有する乳酸菌、バクテロイデス属に属する菌及びストレプトコッカス属に属する菌、更に好ましくはエクオール産生能を有するラクトコッカス・ガルビエ、バクテロイデス・オパタス、及びストレプトコッカス・コンステラタス、特に好ましくはエクオール産生能を有する糞便由来のラクトコッカス・ガルビエ、特にエクオール産生能を有する糞便由来のラクトコッカス・ガルビエであるラクトコッカス20-92株(FERM BP-10036号；独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて寄託)、バクテロイデス・オパタスE-23-15株(FERM BP-6435号；独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて寄託)、ストレプトコッカス・コンステラタス A6G-225株(FERM BP-6437号；独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日

10

20

30

40

50

本国茨城県つくば市東1丁目1番1号)にて寄託)が例示される。

【0126】

通常の遺伝子工学的手法を用いて、E2ポリヌクレオチドを発現させることにより、該ポリヌクレオチドの産物(即ち、上記ポリペプチド)を容易に大量に、安定して製造することができる。従来、エクオール産生菌については取り扱いが困難な嫌気性菌株しか見出されていないが、E2ポリヌクレオチドの単離に成功したことによって、従来のエクオール産生菌を使用せずとも、エクオールの工業的生産への道が開かれる。

【0127】

B - 3 . 発現ベクター

本発明の発現ベクターは、E2ポリヌクレオチドを含んでおり、且つ該E2ポリヌクレオチドを発現できるものであれば特に制限されず、E1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターと同様に、一般に宿主細胞との関係から適宜選択される。具体的な宿主細胞としては、前記A-3.セクションに記載のものを使用することができる。

10

【0128】

B - 4 . 組換え細胞

本発明は、上記E2ポリヌクレオチドを含む発現ベクターによって形質転換された組換え細胞(形質転換体)を提供する。組換え細胞に使用される宿主細胞としては、前記A - 4 . セクションに記載のものを特に制限なく使用することができる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法については、上記A - 4 . セクションの記載に従って行うことができる。

20

【0129】

該組換え細胞は、テトラヒドロダイゼイン変換酵素であるE2ポリペプチドを産生できるので、テトラヒドロダイゼイン変換酵素の製造のために利用することができ、また細胞の状態のままテトラヒドロダイゼインの製造に利用することもできる。

【0130】

B - 5 . 組換え細胞を用いたポリペプチドの製造

E2ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を培養し、培養物からE2ポリペプチドを回収することにより、E2ポリペプチドを製造することができる。培養は、前記A - 5 . セクションの記載に準じて行うことができる。

【0131】

B - 6 . E2ポリペプチドを用いたテトラヒドロダイゼインの製造

本発明は、E2ポリペプチドを用いたテトラヒドロダイゼインの製造方法を提供する。即ち、該製造方法では、E2ポリペプチドを、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ジヒドロダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。

30

【0132】

本製造方法に採用される反応は、前記A - 6 . セクションに記載されるような適当な緩衝液中で行うことができる。

【0133】

本製造方法に採用される反応は、例えば、反応開始時に緩衝液(反応開始時の原料混合物)中で各成分を下記の濃度範囲を満たすように添加し、上記E2ポリペプチド、ジヒドロダイゼイン等の原料、及びテトラヒドロダイゼイン等の生成物に変質・不活性化されない温度条件で、0.5~10時間、好ましくは1~6時間、更に好ましくは2~4時間インキュベートすることにより実施される。このような温度条件であれば反応温度は限定されないが、例えば0 以下に設定する際は、これらの反応温度で凍結しない緩衝液等が用いられる。反応温度は、好ましくは0~45 、さらに好ましくは0~37 が例示される。また、テトラヒドロダイゼインにはシス型及びトランス型が存在するが、前記反応温度や時間等の条件を変更することによりシス型とトランス型の生成をコントロールすることも可能である。例えば、反応温度0 として、シス型及びトランス型が混在したテトラヒドロダイゼインを生成させることが可能であり、37 としてトランス型を優先して生成させることが可

40

50

能である。

【0134】

上記の製造方法における各成分の濃度範囲とは、以下の通りである。

【0135】

E2ポリペプチドが0.0001~1.0重量%、好ましくは0.001~0.1重量%、更に好ましくは0.001~0.01重量%；  
ジヒドロダイゼインが0.0001~10.0重量%、好ましくは0.001~1.0重量%、更に好ましくは0.001~0.1重量%；及び  
NADPH及び/又はNADHが0.01~5重量%、好ましくは0.05~1重量%、更に好ましくは0.1~0.5重量%。

10

【0136】

また、本発明は、テトラヒドロダイゼインを合成するための混合原料として、(Bi)E2ポリペプチド、(Bii)NADPH及び/又はNADH、並びに(Biii)ジヒドロダイゼインを含有するテトラヒドロダイゼイン合成原料組成物を提供する。該合成原料組成物を前述する条件でインキュベートすることにより、該合成原料組成物中のジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換することができる。該合成原料組成物は、上記テトラヒドロダイゼインの製造において、反応開始時の原料混合物に相当するものであり、該合成原料組成物におけるE2ポリペプチドの配合濃度、NADPH及び/又はNADHの配合濃度、ジヒドロダイゼインの配合濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等についても、上記製造方法に採用される反応系（反応開始時の原料混合溶液）の場合と同様である。

20

【0137】

更に、本発明は、テトラヒドロダイゼインを合成するためのキットとして、(Bi)E2ポリペプチド、(Bii)NADPH及び/又はNADH、並びに(Biii)ジヒドロダイゼインを含有するテトラヒドロダイゼイン合成用キットを提供する。該合成用キットには、前述する条件でジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインの合成を簡易に実施できるように、各成分が必要に応じて分けられて備えられていなければならない。また、該合成用キットには、必要に応じて、使用する緩衝液が含まれていても良い。更に、該合成用キットは、テトラヒドロダイゼインの合成を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

30

【0138】

B-7. テトラヒドロダイゼイン合成酵素組成物

本発明は、更に、E2ポリペプチドを含むテトラヒドロダイゼイン合成酵素組成物を提供する。該酵素組成物は、E2ポリペプチドを用いたテトラヒドロダイゼインの製造方法において、テトラヒドロダイゼイン合成酵素として好適に使用される。

【0139】

該酵素組成物は、粗精製の状態のE2ポリペプチドであってもよく、また粗精製又は精製されたE2ポリペプチドを適当な担体に配合したものであってもよい。該担体は、E2ポリペプチドの活性に悪影響を与えないものであり、適当量配合される。

【0140】

該酵素組成物において、E2ポリペプチドの配合割合については、上記テトラヒドロダイゼインの製造方法において、テトラヒドロダイゼイン合成酵素として使用できる限り、特に制限されない。具体的には、該酵素組成物の総量当たり、E2ポリペプチドが0.001~20.0重量%、好ましくは0.005~5.0重量%、更に好ましくは0.01~1.0重量%が例示される。

40

【0141】

該酵素組成物には、E2ポリペプチドの補酵素として作用するNADPH及び/又はNADHを含んでいても良い。該酵素組成物にNADPH及び/又はNADHを配合する場合、該NADPH及び/又はNADHの配合割合については、特に制限されないが、該酵素組成物当たり、0.005~50.0重量%、好ましくは0.05~10.0重量%、更に好ましくは0.1~5.0重量%が例示される。

【0142】

更に、該酵素組成物には、E2ポリペプチドの他に、該ポリペプチドの安定性を向上せし

50

めるため及び/又は保存性を担保するために、上記A-7.セクションに記載の各種の酸化剤や保存剤を添加することもできる。

【0143】

B-8.上記組換え細胞を用いたテトラヒドロダイゼインの製造方法

本発明は、E2ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を用いたテトラヒドロダイゼインの製造方法を提供する。即ち、該製造方法では、上記組み換え細胞を、ジヒドロダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。

【0144】

本製造方法に採用される反応は、上記組換え細胞が生存でき、且つジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換できる環境下で実施される。

10

【0145】

具体的には、上記組換え細胞が生育可能な培地中に、上記組換え細胞、及びジヒドロダイゼインを適量添加して培養を行うことにより実施される。

【0146】

本製造方法において、使用される培地は、組換え細胞の宿主細胞として採用した細胞の種類に応じて、慣用される各種のものを適宜選択利用される。

【0147】

また、該培地には、必要に応じてPMSF、EDTA等のプロテアーゼ阻害剤を適量添加してもよい。また、上記ポリペプチドが嫌気性菌由来であることを考慮すると、DTT、2ME、DET、Sodium hydrosulfite等の還元剤を適量添加してもよい。また、上記組換え細胞を利用する場合、NADPH及び/又はNADHの添加は、必須ではないが、必要に応じて、培地中にNADPH及び/又はNADHを添加しても良い。

20

【0148】

本製造方法は、具体的には、ジヒドロダイゼインを0.001~1重量%、好ましくは0.01~0.5重量%、更に好ましくは0.01~0.1重量%を含む培地に、上記組換え細胞を接種し、生育可能温度条件下で7~30時間、好ましくは15~24時間、更に好ましくは17~20時間インキュベートすることにより実施される。ここで、生育可能温度条件は特に限定されず、前記「B-6.E2ポリペプチドを用いたテトラヒドロダイゼインの製造」と同様の温度で実施することができる。

30

【0149】

また、本発明は、テトラヒドロダイゼインを合成するための混合原料として、(Biv)上記組換え細胞、及び(Biii)ジヒドロダイゼインを含有するテトラヒドロダイゼイン合成原料組成物を提供する。該合成原料組成物を前述する条件で培養することにより、該合成原料組成物中のジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換することができる。該合成原料組成物は、上記テトラヒドロダイゼインの製造において、反応開始時の原料混合物に相当するものであり、該合成原料組成物における上記組換え細胞、及びジヒドロダイゼインの濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等についても、上記製造方法に採用される条件等と同様である。

【0150】

更に、本発明は、テトラヒドロダイゼインを合成するためのキットとして、(Biv)上記組換え細胞、及び(Biii)ジヒドロダイゼインを含有するテトラヒドロダイゼイン合成用キットを提供する。該合成用キットには、前述する条件でジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインの合成を簡易に実施できるように、上記組換え細胞とジヒドロダイゼインが、必要に応じて区分けされて備えられていればよい。また、該合成用キットには、必要に応じて、緩衝液や培地が含まれていても良い。更に、該合成用キットは、テトラヒドロダイゼインの合成を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

40

【0151】

なお、該合成用キットに含まれる上記組み換え細胞は、公知の方法で保存されたもので

50

あってもよい。組換え細胞を保存する技術は公知であり、例えば、ジメチルホルムアミド等に組み換え細胞を入れて凍結乾燥機でアンプルが真空状態になるよう処理した後、4～25で保存する方法等を挙げることができる。この他にも、10%グリセロール加保存培地に菌体を懸濁し、これを専用アンプルに収め、液体窒素タンク(-150～-196)で保管する液体窒素法を挙げられる。

【0152】

B-9. 上記ポリペプチドに結合性を有する抗体

本発明は、更に、E2ポリペプチドに結合性を有する抗体(IgG抗体)を提供する。

【0153】

モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、従来法に従って作製される。具体的には、前記A-9.セクションに記載の方法に従って作成することができる。

10

【0154】

B-10. 上記ポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法

更に、本発明は、上記抗体を用いてE2ポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法を提供する。具体的には、該免疫学的方法は、前記A-10.セクションに記載の方法に準じて行うことができる。

【0155】

本発明は、E2ポリペプチドを検出又は測定するためのキットとして、上記抗体を含有する免疫学的検出用キットを提供する。該検出用キットには、必要に応じて、E2ポリペプチドが標準品として含まれていてもよい。更に、該検出用キットには、前述する条件でE2ポリペプチドの検出を簡易に実施できるように、その他に使用される試薬等が、必要に応じて備えられていてもよい。また、該検出用キットは、E2ポリペプチドの検出を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいてもよい。

20

【0156】

B-11. 上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの検出又は測定する方法

また、本発明は、E2ポリヌクレオチドを検出又は測定する方法を提供する。該方法は、具体的には、E2ポリヌクレオチドに結合するプローブを被験試料と接触させることにより実施され、前記A-11.セクションに記載の方法に準じて行うことができる。

【0157】

更に、本発明は、E2ポリヌクレオチドを検出又は測定するためのキットとして、上記プローブを含有するE2ポリヌクレオチド検出用キットを提供する。該検出用キットには、前述する条件でE2ポリヌクレオチドの検出を簡易に実施できるように、上記プローブ以外に使用される試薬等が、必要に応じて備えられていてもよい。また、該検出用キットは、E2ポリヌクレオチドを含有する細胞を同定するためのキットとして使用することもできる。また、該検出用キットとしては、精度の高い検出を可能にするという観点から、好ましくはPCRによる検出を行うためのキットが挙げられる。

30

【0158】

C. エクオール合成酵素

C-1. ポリペプチド

本発明は、テトラヒドロダイゼインを基質として利用しエクオールを合成するポリペプチドとして、以下の(Ca)～(Cc)のポリペプチド(以下、該ポリペプチドを「E3ポリペプチド」と表記することもある)を提供する：

40

(Ca) 配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Cb) 配列番号13に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド；

(Cc) 配列番号13に記載のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド。

【0159】

50

上記(Cb)のポリペプチドにおいて、「1若しくは複数」の範囲は、該ポリペプチドがテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有することを限度として特に限定されないが、例えば1~200個、好ましくは1~150個、より好ましくは1~100個、より好ましくは1~50個、より好ましくは1~45個、より好ましくは1~40個、より好ましくは1~30個、より好ましくは1~15個、更に好ましくは1~5個、更により好ましくは1~4個、特に好ましくは1~3個、更に特に好ましくは1又は2個が挙げられる。

#### 【0160】

このような(Cb)のポリペプチドの具体例としては、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号13に記載のアミノ酸配列と比較して配列番号14に記載のアミノ酸配列は、2個のアミノ酸が置換されている。配列番号13に記載のアミノ酸配列と比較して、配列番号15に記載のアミノ酸配列は、アミノ酸42個が置換されており、C末端に1個のアミノ酸(グルタミン酸)が付加されている。配列番号14に記載されるアミノ酸配列は、バクテロイデス・オパタスE-23-15株(FERM BP-6435号)由来のE3酵素に相当する。配列番号15に記載されるアミノ酸配列は、ストレプトコッカス・コンステラタス A6G-225株(FERM BP-6437号)由来のE3酵素に相当する。

#### 【0161】

上記(Cb)のポリペプチドにおける「アミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加」は、前記A-1.セクションに記載されるE1ペプチドにおける置換、欠失、挿入、又は付加に準じて為され得る。上記(Cb)のポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加については、ポリペプチドの高次構造に大きく影響しない領域やエクオール合成酵素としての活性中心に影響を与えない領域において為されることが望ましい。そのような領域としては、例えば、配列番号13、14、及び15に記載のアミノ酸配列の間で保存性の低い領域及びその近辺、並びにN末端領域又はC末端領域を挙げることができる。具体的には、配列番号13に記載のアミノ酸配列において、第3番目のグルタミン酸、第28番目のアルギニン、第29番目のグルタミン酸、第32番目のアルギニン、第61番目のアスパラギン、第80番目のイソロイシン、第92番目のアスパラギン、第112番目のアスパラギン酸、第119番目のアラニン、第129番目のアスパラギン、第172番目のアスパラギン酸、第174番目のアラニン、第204番目のセリン、第206番目のグルタミン酸、第223番目のスレオニン、第230番目のバリン、第244番目のプロリン、第246番目のチロシン、第280番目のスレオニン、第282番目のアルギニン、第285番目のアラニン、第307番目のバリン、第322番目のアラニン、第347番目のグルタミン酸、第359番目のグリシン、第360番目のセリン、第366番目のアラニン、第367番目のロイシン、第368番目のイソロイシン、第372番目のバリン、第373番目のアスパラギン酸、第374番目のスレオニン、第377番目のアラニン、第380番目のアラニン、第381番目のアスパラギン酸、第399番目のグルタミン、第403番目のプロリン、第404番目のメチオニン、第405番目のバリン、第406番目のグルタミン酸、第407番目のグリシン、第426番目のアルギニン、第434番目のバリン、第436番目のアラニン、第438番目のチロシン、及び第440番目のアラニン、並びにこれらのアミノ酸の近辺の領域を挙げることが出来る。前記「近辺の領域」とは、エクオール合成酵素活性を阻害しない範囲において、前記の特定の位置のアミノ酸を基点として、前後5個以内のアミノ酸、好ましくは前後4個のアミノ酸、より好ましくは前後3個のアミノ酸、更に好ましくは前後2個のアミノ酸、特に好ましくは前後1個のアミノ酸である。前記保存性の低い領域及びその近辺として、好ましくは、配列番号13に記載のアミノ酸配列において、第25番目~第35番目に相当する領域、第170番目~177番目に相当する領域、第201番目~第208番目に相当する領域、242番目~248番目に相当する領域、第276番目~第289番目に相当する領域、第355番目~第385番目に相当する領域、第396番目~第409番目に相当する領域、及び第431番目~第443番目に相当する領域を挙げることが出来る。

10

20

30

40

50

## 【0162】

配列番号13に記載されるアミノ酸配列において、第14番目のアミノ酸～第19番目のアミノ酸から成る配列は、FAD結合ドメインに相当すると考えられる。よって、当該ドメインの機能を阻害しない限り、当該配列において任意のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されていてもよいが、好ましくは第14番目のグリシン、第16番目のグリシン及び第19番目のグリシンは変異されていない。当該配列において、アミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されている場合は、好ましくは3個以下のアミノ酸、より好ましくは2個以下のアミノ酸、更に好ましくは1個のアミノ酸について為され、最も好ましくは変異は為されていない。

## 【0163】

図28に配列番号13、14及び15に記載のアミノ酸配列のアライメントを示す。

## 【0164】

上記(Cc)のポリペプチドにおいて、アミノ酸の同一性は、配列番号13に記載のアミノ酸配列に対して、例えば60%以上であればよいが、通常80%以上、好ましくは85%以上、更に好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、更に特に好ましくは99%以上であることが望ましい。

## 【0165】

上記(Cc)のポリペプチドの具体例としては、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。配列番号13に記載のアミノ酸配列と配列番号14に記載のアミノ酸配列との同一性は、99.6%であり、配列番号13に記載のアミノ酸配列と配列番号15に記載のアミノ酸配列との同一性は、90.9%である(Blast2)。従って、本発明の好適な一実施形態において、(Cc)ポリペプチドは、配列番号14に記載のアミノ酸配列に対して、好ましくは90.9%以上、より好ましくは99.6%以上の同一性を有する。

## 【0166】

上記(Cb)及び(Cc)のポリペプチドにおいて、「テトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性」は、次のようにして確認することができる。即ち、下記組成の基質溶液中に、確認対象となるポリペプチドを0.001 mg/mLとなるように添加し、37℃で2時間インキュベートし、その後、溶液中にエクオールの有無を確認する。インキュベート後の溶液にエクオールの存在が確認された場合、そのポリペプチドは「テトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性」を有していると判定される。

## 【0167】

基質溶液の組成

- 0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)
- 1 mM PMSF(フェニルメチルスルフォニルフルオリド)
- 2 mM dithiothreitol
- 5 mM Sodium hydrosulfite
- 40 µM テトラヒドロダイゼイン

## 【0168】

酵素特性

E3ポリペプチドは、テトラヒドロダイゼインを基質としてエクオールを合成する酵素活性を有する。よって、E3ポリペプチドは、E3酵素とも称される。E3酵素の至適温度は約23～37℃であり、至適pHは4.5である。E3酵素は、テトラヒドロダイゼインを基質としてエクオールを合成するだけでなく、その逆反応、即ち、エクオールを原料としてテトラヒドロダイゼインを合成することも可能である。

## 【0169】

E3ポリペプチドは、E1ペプチドやE2ペプチドと同様に、配列番号16、17、又は18に記載のヌクレオチド配列情報に基づき、遺伝子工学的的手法によって得ることができる。また、配列番号13、14、又は15に記載のアミノ酸配列情報に基づいて、化学合成

10

20

30

40

50

法によって得ることもできる。さらに、E3ポリペプチド産生能を有する微生物から単離精製することによって得ることができる。これらの手法は、前記A-1.セクションの記載に従って行うことができる。

【0170】

E3ポリペプチド産生能を有する微生物は、所望量のテトラヒドロダイゼインを含有する培地で培養してもよい。この場合でも、E3ポリペプチド産生能を有する微生物からE3ポリペプチドを産生させることができる。

【0171】

また、E3ポリペプチドは、単量体として存在しても良いが、エクオール合成能を有する限り、2量体又はそれ以上の多量体として存在してもよい。また、E3ポリペプチドは、安定性を向上させる目的等で、必要に応じて、ポリエチレングリコール又は糖鎖を付加修飾されたものであってもよい。

10

【0172】

E3ポリペプチドは、テトラヒドロダイゼインを基質として、エクオールに変換する触媒的役割を演じることができる。エクオールは生体内において、種々の生理作用を発揮するものと考えられており、その意味において、エクオールを提供できるE3ポリペプチドは重要であると言える。このように、本発明は、前記(Ca)～(Cc)のポリペプチドを含むエクオール合成酵素を提供する。

【0173】

C-2. ポリヌクレオチド

20

本発明は、更に、テトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、該ポリヌクレオチドを「E3ポリヌクレオチド」と表記することもある）を提供する。具体的には、E3ポリヌクレオチドとして、以下の(Cd)～(Cf)のポリヌクレオチドを提供する：

(Cd) 配列番号16に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ce) 配列番号13に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Cf) 前記(Cd)又は(Ce)のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

30

【0174】

配列番号13に記載のアミノ配列は、配列番号16に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。配列番号14に記載のアミノ酸配列は、配列番号17に記載のヌクレオチド配列がコードしているアミノ酸配列に相当する。配列番号15に記載のアミノ酸配列は、配列番号18に記載のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列に相当する。

【0175】

上記(Cf)ポリヌクレオチドに関する「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、前記A-2.セクションに記載の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」と同義である。(Cf)のポリヌクレオチドの具体例としては、配列番号17に記載のヌクレオチド配列及び配列番号18に記載のヌクレオチド配列を挙げることができる。配列番号16に記載のヌクレオチド配列と配列番号17に記載のヌクレオチド配列との塩基配列の同一性は、99.8%であり、配列番号16に記載のヌクレオチド配列と配列番号18に記載のヌクレオチド配列との同一性は、85.2%である。従って、本発明の好適な一実施形態において、(Cf)のポリヌクレオチドは、配列番号16に記載のヌクレオチド配列に対して、85.2%以上の相当性を有し、より好ましくは99.8%以上の相当性を有する。

40

【0176】

また、上記(Cf)のポリヌクレオチドにおいて、「テトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性」は、上記(Cb)又は(Cc)のポリペプチドの場合と同様の方法で確

50

認される。

【0177】

E3ポリヌクレオチドは、配列番号16、17、又は18の配列情報に基づいて、化学的DNA合成法又は遺伝子工学的手法により製造・取得することが可能である。具体的手法としては、前記A-2.セクションに記載の方法を使用することができる。

【0178】

E3ポリヌクレオチドのcDNAの起源としては、E3ポリヌクレオチドを発現する微生物であれば特に制限されないが、具体的には、エクオール産生能を有する微生物、好ましくはエクオール産生能を有する乳酸菌、バクテロイデス属に属する菌及びストレプトコッカス属に属する菌、更に好ましくはエクオール産生能を有するラクトコッカス・ガルビエ、バクテロイデス・オパタス、及びストレプトコッカス・コンステラタス、特に好ましくはエクオール産生能を有する糞便由来のラクトコッカス・ガルビエ、特にエクオール産生能を有する糞便由来のラクトコッカス・ガルビエであるラクトコッカス20-92株(FERM BP-10036号; 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて寄託)、バクテロイデス・オパタスE-23-15株(FERM BP-6435号; 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて寄託)、ストレプトコッカス・コンステラタス A6G-225株(FERM BP-6437号; 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号)にて寄託)が例示される。

10

【0179】

通常遺伝子工学的手法を用いて、E3ポリヌクレオチドを発現させることにより、該ポリヌクレオチドの産物(即ち、上記ポリペプチド)を容易に大量に、安定して製造することができる。従来、エクオール産生菌については取り扱いが困難な嫌気性菌株しか見出されていないが、E3ポリヌクレオチドの単離に成功したことによって、従来のエクオール産生菌を使用せずとも、エクオールの工業的生産への道が開かれる。

20

【0180】

C-3. 発現ベクター

本発明の発現ベクターは、E3ポリヌクレオチドを含んでおり、且つ該E3ポリヌクレオチドを発現できるものであれば特に制限されず、E1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターと同様に、一般に宿主細胞との関係から適宜選択される。具体的な宿主細胞としては、前記A-3.セクションに記載のものを使用することが出来る。

30

【0181】

C-4. 組換え細胞

本発明は、上記E3ポリヌクレオチドを含む発現ベクターによって形質転換された組換え細胞(形質転換体)を提供する。組み換え細胞細胞に使用される宿主細胞としては、前記A-4.セクションに記載されるものを特に制限なくしよることができる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法については、上記A-4.セクションの記載に従って行うことが出来る。

【0182】

該組換え細胞は、エクオール変換酵素であるE3ポリペプチドを産生できるので、エクオール変換酵素の製造のために利用することができ、また細胞の状態のままエクオールの製造に利用することもできる。

40

【0183】

C-5. 組換え細胞を用いたポリペプチドの製造

E3ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を培養し、培養物からE3ポリペプチドを回収することにより、E3ポリペプチドを製造することができる。培養は、前記A-5.セクションの記載に従って行うことができる。

【0184】

C-6. E3ポリペプチドを用いたエクオールの製造

本発明は、E3ポリペプチドを用いたエクオールの製造方法を提供する。即ち、該製造方法では、E3ポリペプチドを、テトラヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒ

50

ドロダイゼインをエクオールに変換する。

【0185】

本製造方法に採用される反応は、適当な緩衝液中で行うことができる。具体的には、前記A-6、セクションに記載される緩衝液を使用することが出来る。

【0186】

本製造方法に採用される反応は、例えば、反応開始時に緩衝液（反応開始時の原料混合物）中で各成分を下記の濃度範囲を満たすように添加し、上記E3ポリペプチド、テトラヒドロダイゼイン等の原料、及びエクオール等の生成物に変質・不活性化されない温度条件で、0.5~10時間、好ましくは1~6時間、更に好ましくは2~4時間インキュベートすることにより実施される。このような温度条件であれば反応温度は限定されないが、例えば0以下に設定する際は、これらの反応温度で凍結しない緩衝液等が用いられる。反応温度は、好ましくは0~45、さらに好ましくは0~37が例示される。

10

【0187】

上記E3ポリペプチドが0.0001~1.0重量%、好ましくは0.001~0.1重量%、更に好ましくは0.001~0.01重量%；  
テトラヒドロダイゼインが0.0001~10.0重量%、好ましくは0.001~1.0重量%、更に好ましくは0.001~0.1重量%。

【0188】

また、本発明は、エクオールを合成するための混合原料として、(Ci)E3ポリペプチド、並びに(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有するエクオール合成原料組成物を提供する。該合成原料組成物を前述する条件でインキュベートすることにより、該合成原料組成物中のテトラヒドロダイゼインをエクオールに変換することができる。該合成原料組成物は、上記エクオールの製造において、反応開始時の原料混合物に相当するものであり、該合成原料組成物におけるE3ポリペプチドの配合濃度、テトラヒドロダイゼインの配合濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等についても、上記製造方法に採用される反応系（反応開始時の原料混合溶液）の場合と同様である。

20

【0189】

更に、本発明は、エクオールを合成するためのキットとして、(Ci)E3ポリペプチド、並びに(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有するエクオール合成用キットを提供する。該合成用キットには、前述する条件でテトラヒドロダイゼインからエクオールの合成を簡易に実施できるように、各成分が必要に応じて分けられて備えられていればよい。また、該合成用キットには、必要に応じて、使用する緩衝液が含まれていても良い。更に、該合成用キットは、エクオールの合成を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

30

【0190】

C-7. エクオール合成酵素組成物

本発明は、更に、E3ポリペプチドを含むエクオール合成酵素組成物を提供する。該酵素組成物は、E3ポリペプチドを用いたエクオールの製造方法において、エクオール合成酵素として好適に使用される。

【0191】

該酵素組成物は、粗精製の状態のE3ポリペプチドであってもよく、また粗精製又は精製されたE3ポリペプチドを適当な担体に配合したものであってもよい。該担体は、E3ポリペプチドの活性に悪影響を与えないものであり、適当量配合される。

40

【0192】

該酵素組成物において、E3ポリペプチドの配合割合については、上記エクオールの製造方法において、エクオール合成酵素として使用できる限り、特に制限されない。具体的には、該酵素組成物の総量当たり、E3ポリペプチドが0.001~20.0重量%、好ましくは0.005~5.0重量%、更に好ましくは0.01~1.0重量%が例示される。

【0193】

更に、該酵素組成物には、E3ポリペプチドの他に、該ポリペプチドの安定性を向上せし

50

めるため及び/又は保存性を担保するために、上記A - 7 . セクションに記載の各種の抗酸化剤や保存剤を添加することもできる。

【0194】

C - 8 . 上記組換え細胞を用いたエクオール<sup>®</sup>の製造方法

本発明は、E3ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を用いたエクオール<sup>®</sup>の製造方法を提供する。即ち、該製造方法では、上記組み換え細胞を、テトラヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒドロダイゼインをエクオール<sup>®</sup>に変換する。

【0195】

本製造方法に採用される反応は、上記組換え細胞が生存でき、且つテトラヒドロダイゼインをエクオール<sup>®</sup>に変換できる環境下で実施される。

【0196】

具体的には、上記組換え細胞が生育可能な培地中に、上記組換え細胞、及びテトラヒドロダイゼインを適量添加して培養を行うことにより実施される。

【0197】

本製造方法において、使用される培地は、組換え細胞の宿主細胞として採用した細胞の種類に応じて、慣用される各種のものを適宜選択利用される。

【0198】

また、該培地には、必要に応じてPMSF、EDTA等のプロテアーゼ阻害剤を適量添加してもよい。また、上記ポリペプチドが嫌気性菌由来であることを考慮すると、DTT、2ME、DET、Sodium hydrosulfite等の還元剤を適量添加してもよい。また、上記組換え細胞を利用する場合、NADPH及び/又はNADHの添加は、必須ではないが、必要に応じて、培地中にNADPH及び/又はNADHを添加しても良い。

【0199】

本製造方法は、具体的には、テトラヒドロダイゼインを0.001~1重量%、好ましくは0.01~0.5重量%、更に好ましくは0.01~0.1重量%を含む培地に、上記組換え細胞を接種し、生育可能温度条件下で7~30時間、好ましくは15~24時間、更に好ましくは17~20時間インキュベートすることにより実施される。ここで、生育可能温度条件は特に限定されず、前記C - 6 . セクションに記載の温度と同様の温度で実施することができる。

【0200】

また、本発明は、エクオール<sup>®</sup>を合成するための混合原料として、(Ciii)上記組換え細胞、及び(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有するエクオール<sup>®</sup>合成原料組成物を提供する。該合成原料組成物を前述する条件で培養することにより、該合成原料組成物中のテトラヒドロダイゼインをエクオール<sup>®</sup>に変換することができる。該合成原料組成物は、上記エクオール<sup>®</sup>の製造において、反応開始時の原料混合物に相当するものであり、該合成原料組成物における上記組換え細胞、及びテトラヒドロダイゼインの濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等についても、上記製造方法に採用される条件等と同様である。

【0201】

更に、本発明は、エクオール<sup>®</sup>を合成するためのキットとして、(Ciii)上記組換え細胞、及び(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有するエクオール<sup>®</sup>合成用キットを提供する。該合成用キットには、前述する条件でテトラヒドロダイゼインからエクオール<sup>®</sup>の合成を簡易に実施できるように、上記組換え細胞とテトラヒドロダイゼインが、必要に応じて分けられて備えられていればよい。また、該合成用キットには、必要に応じて、緩衝液や培地が含まれていても良い。更に、該合成用キットは、エクオール<sup>®</sup>の合成を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

【0202】

なお、該合成用キットに含まれる上記組み換え細胞は、公知の方法で保存されたものであってもよい。組換え細胞を保存する技術は公知であり、例えば、ジメチルホルムアミド等に組み換え細胞を入れて凍結乾燥機でアンブルが真空状態になるよう処理した後、4~25℃で保存する方法等を挙げることができる。この他にも、10%グリセロール加保存培地に菌体を懸濁し、これを専用アンブルに収め、液体窒素タンク(-150~-196

10

20

30

40

50

)で保管する液体窒素法を挙げられる。

【0203】

C - 9 . 上記ポリペプチドに結合性を有する抗体

本発明は、更に、E3ポリペプチドに結合性を有する抗体(IgG抗体)を提供する。

【0204】

モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、従来法に従って作製される。具体的には、前記A - 9 . セクションに記載の方法に従って作成することができる。

【0205】

C - 10 . 上記ポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法

更に、本発明は、上記抗体を用いてE3ポリペプチドを検出又は測定する免疫学的方法を提供する。具体的には、該免疫学的方法は、前記A - 10 . セクションに記載の方法に準じて行うことができる。

10

【0206】

本発明は、E3ポリペプチドを検出又は測定するためのキットとして、上記抗体を含有する免疫学的検出用キットを提供する。該検出用キットには、必要に応じて、E3ポリペプチドが標準品として含まれていてもよい。更に、該検出用キットには、前述する条件でE3ポリペプチドの検出を簡易に実施できるように、その他に使用される試薬等が、必要に応じて備えられていてもよい。また、該検出用キットは、E3ポリペプチドの検出を簡易に行うために、必要となる器具や操作マニュアルを含んでいても良い。

【0207】

C - 11 . 上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの検出又は測定方法

本発明は、E3ポリヌクレオチドを検出又は測定する方法を提供する。該方法は、具体的には、E3ポリヌクレオチドに結合するプローブを被験試料と接触させることにより実施され、前記A - 11 . セクションに記載の方法に準じて行うことができる。

20

【0208】

更に、本発明は、E3ポリヌクレオチドを検出又は測定するためのキットとして、上記プローブを含有するE3ポリヌクレオチド検出用キットを提供する。該検出用キットには、前述する条件でE3ポリヌクレオチドの検出を簡易に実施できるように、上記プローブ以外に使用される試薬等が、必要に応じて備えられていてもよい。また、該検出用キットは、E3ポリヌクレオチドを含有する細胞を同定するためのキットとして使用することもできる。また、該検出用キットとしては、精度の高い検出を可能にするという観点から、好ましくはPCRによる検出を行うためのキットが挙げられる。

30

【0209】

D . E1 ~ E3 酵素を使用したエクオール又はその中間体の製造方法

D - I - 1 . 第1工程及び第2工程を含む、テトラヒドロダイゼインの製造方法

本発明は、以下の、ダイゼインからジヒドロダイゼインを生成する第1工程、及びジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを生成する第2工程を含む、テトラヒドロダイゼインの製造方法(以下、該製造方法を「第1製造方法」と表記することもある)を提供する。

【0210】

40

(第1工程)ダイゼインに、以下の(Aa)~(Ac)のいずれかであるポリペプチドからなる酵素、及びNADPH及び/又はNADHを作用させることによりジヒドロダイゼインを生成する工程:

(Aa)配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド;

(Ab)配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド;

(Ac)配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

50

## 【0211】

(第2工程)ジヒドロダイゼインに、以下の(Ba)~(Bc)のいずれかであるポリペプチド(以下、該ポリペプチドを「E2ポリペプチド」と表記することもある)からなる酵素、並びにNADPH及び/又はNADHを作用させることによりテトラヒドロダイゼインを生成する工程:

(Ba)配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド;

(Bb)配列番号7に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド;

(Bc)配列番号7に記載のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

10

## 【0212】

本発明の第1製造方法では、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

## 【0213】

第1工程

第1工程では、E1ポリペプチドからなる酵素を、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。第1工程に採用される反応は、前記E1ポリペプチドからなる酵素、ダイゼイン及びNADPH及び/又はNADHを含有する溶液中で、前記E1ポリペプチドからなる酵素、ダイゼイン等の原料及びジヒドロダイゼイン等の生成物に変質・不活性化されない温度条件及び時間インキュベートすることにより実施される。具体的には、上記A-6.セクションに記載の条件に従って実施することができる。

20

## 【0214】

該第1工程と後述の第2工程とを同条件で実施する場合には、第1及び第2工程の両者を効率よく実施する観点から、採用される反応は、反応開始時の反応系(反応開始時の原料混合物)で各成分を下記の濃度範囲を満たすように原料混合物を調製し、これを15~45、好ましくは25~40、更に好ましくは30~38の温度条件で、0.5~10時間、好ましくは1~6時間、更に好ましくは2~4時間インキュベートすることにより実施される:

30

E1ポリペプチドからなる酵素が0.0001~1.0重量%、好ましくは0.001~0.1重量%、更に好ましくは0.001~0.01重量%;

ダイゼインが0.0001~10.0重量%、好ましくは0.001~1.0重量%、更に好ましくは0.001~0.1重量%;及び

NADPH/またはNADHが0.01~5重量%、好ましくは0.05~1重量%、更に好ましくは0.1~0.5重量%。

## 【0215】

第1工程において基質として使用されるダイゼインの由来は限定されない。例えば市販のダイゼインを使用してもよく、適宜生成又は合成したダイゼインを使用してもよい。

40

## 【0216】

また、例えば、第1工程においてジヒドロダイゼインを生成するための混合原料として、(Aii)E1ポリペプチドからなる酵素、(Aiii)NADPH及び/又はNADH、及び(Aiiii)ダイゼインを含有する、ジヒドロダイゼイン合成原料組成物を使用してもよい。該合成原料組成物を前述する条件でインキュベートすることにより、該合成原料組成物中のダイゼインをジヒドロダイゼインに変換することができる。前記合成原料組成物は、上記A-6.及びA-7.セクションにおいてより詳しく説明される。

## 【0217】

第2工程

第2工程では、E2ポリペプチドからなる酵素を、NADPH及び/又はNADHの存

50

在下で、ジヒドロダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。

【0218】

第2工程に採用される反応は、例えば、前記E2ポリペプチドからなる酵素、ジヒドロダイゼイン及びNADPH及び/又はNADHを含有する溶液中で、前記E2ポリペプチドからなる酵素、ジヒドロダイゼイン等の原料及びテトラヒドロダイゼイン等の生成物が変質・不活性化されない温度条件及び時間インキュベートすることにより実施される。具体的には、上記B-6.セクションに記載の条件に従って実施することができる。

【0219】

テトラヒドロダイゼインにはシス型及びトランス型が存在するが、前記反応温度や時間等の条件を変更することによりシス型とトランス型の生成をコントロールすることも可能である。例えば、反応温度0として、シス型及びトランス型が混在したテトラヒドロダイゼインを生成させることが可能であり、37としてトランス型を優先して生成させることが可能である。

10

【0220】

また、前述の第1工程と第2工程とを同条件で実施する場合には、第1及び第2工程の両者を効率よく実施する観点から、採用される反応は、前記「第1工程」に記載の、第1工程と第2工程とを同条件で実施する場合の条件で両者をインキュベートすることにより実施される。この場合、E2ポリペプチドからなる酵素、ジヒドロダイゼイン、並びにNADPH及び/またはNADHの濃度は以下のように設定できる：

20

E2ポリペプチドからなる酵素が0.0001~1.0重量%、好ましくは0.001~0.1重量%、更に好ましくは0.001~0.01重量%；  
ジヒドロダイゼインが0.0001~10.0重量%、好ましくは0.001~1.0重量%、更に好ましくは0.001~0.1重量%；及び  
NADPH及び/またはNADHが0.01~5重量%、好ましくは0.05~1重量%、更に好ましくは0.1~0.5重量%。

【0221】

ただし、第1工程と第2工程とを、E1ポリペプチドからなる酵素及びE2ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合には、E1ポリペプチドからなる酵素を使用したジヒドロダイゼインの生成反応を効率よく実施する観点から、NADPHが必須である。この場合、NADPHの濃度は、前記「第1工程」に記載の、第1工程と第2工程とを同条件で実施する場合の条件に基づき決定される。そして、NADPHと併用されるNADHの濃度は0.01~5重量%、好ましくは0.05~1重量%、更に好ましくは0.1~0.5重量%と設定される。

30

【0222】

第2工程においても、基質として使用されるジヒドロダイゼインの由来は限定されない。

【0223】

例えば、第1工程においてダイゼインから生成されたジヒドロダイゼインを、第2工程における基質として使用してもよい。この場合、該ジヒドロダイゼインとしては、第1工程において生じた、ジヒドロダイゼインを含有する溶液そのままであってもよく、粗精製されたものであってもよく、精製されたものであってもよい。

40

【0224】

また、例えば市販のジヒドロダイゼインを使用してもよく、適宜合成したジヒドロダイゼインを使用してもよい。

【0225】

また、第2工程においてテトラヒドロダイゼインを合成するための混合原料として、(Bi)E2ポリペプチドからなる酵素、(Bii)NADPH及び/又はNADH、並びに(Biii)ジヒドロダイゼインを含有するテトラヒドロダイゼイン合成原料組成物を使用してもよい。該合成原料組成物を前述する条件でインキュベートすることにより、該

50

合成原料組成物中のジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換することができる。前記構成原料組成物に関する説明は、上記 B - 6 . 及び A - 7 . セクションにおいてより詳しく説明される。

【 0 2 2 6 】

第 2 工程においては、第 1 工程においてダイゼインから生成されたジヒドロダイゼインが、第 2 工程における基質として好ましく使用され、市販のジヒドロダイゼイン、前記合成原料組成物、前記酵素組成物等が併用されてもよい。

【 0 2 2 7 】

E 1 ポリペプチド及び E 2 ポリペプチド

本発明の第 1 製造方法では、前記 A - 1 . に記載の E 1 ポリペプチドからなる酵素及び前記 B - 1 . に記載の E 2 ポリペプチドからなる酵素が使用される。

【 0 2 2 8 】

D - I - 2 . 第 1 製造方法により製造されたテトラヒドロダイゼインを含有する生成物

本発明は、第 1 工程及び第 2 工程を含むテトラヒドロダイゼインの製造方法（第 1 製造方法）により製造された、テトラヒドロダイゼインを含有する生成物を提供する。

【 0 2 2 9 】

前述の通り、本発明の第 1 製造方法では、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造することができる。

【 0 2 3 0 】

このことから、本発明の第 1 製造方法により製造されたテトラヒドロダイゼインを含有する生成物には、テトラヒドロダイゼインだけでなく、ジヒドロダイゼイン、さらにダイゼインが含有される場合もある。

【 0 2 3 1 】

また、本発明の生成物は、第 1 製造方法により得られる溶液そのままであってもよく、該溶液からテトラヒドロダイゼイン等が粗精製されたものであってもよく、さらに精製されたものであってもよい。

【 0 2 3 2 】

本発明の生成物は、飲食品、化粧品、医薬品等に配合することができ、また基質として使用することもできる。

【 0 2 3 3 】

D - I - 3 . 第 2 工程及び第 3 工程を含む、エクオールの製造方法

本発明は、以下の、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを生成する第 2 工程、及びテトラヒドロダイゼインからエクオールを生成する第 3 工程を含む、エクオールの製造方法（以下、該製造方法を「第 2 製造方法」と表記することもある）を提供する。

【 0 2 3 4 】

（第 2 工程）ジヒドロダイゼインに、以下の (Ba) ~ (Bc) のいずれかであるポリペプチド（以下、該ポリペプチドを「E 2 ポリペプチド」と表記することもある）からなる酵素、並びに N A D P H 及び / 又は N A D H を作用させることによりテトラヒドロダイゼインを生成する工程：

(Ba) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Bb) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び / 又は付加したアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド；

(Bc) 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列に対して 6 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つジヒドロダイゼインを基質としてテトラヒドロダイゼインを合成する活性を有するポリペプチド。

【 0 2 3 5 】

（第 3 工程）テトラヒドロダイゼインに、以下の (Ca) ~ (Cc) のいずれかであるポリペプチド（以下、該ポリペプチドを「E 3 ポリペプチド」と表記することもある）からなる酵素を作用させることによりエクオールを製造する工程、

10

20

30

40

50

(Ca) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(Cb) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド；

(Cc) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列に対して 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを合成する活性を有するポリペプチド。

#### 【0236】

本発明の第 2 製造方法では、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

#### 第 2 工程

本発明の第 2 製造方法に含有される第 2 工程は、前述の第 1 製造方法に含有される第 2 工程と同様に説明される。

#### 【0237】

なお、第 2 工程と後述の第 3 工程とを同条件で実施する場合には、第 2 及び第 3 工程の両者を効率よく実施する観点から、採用される反応は、反応開始時の反応系（反応開始時の原料混合物）で各成分を下記の濃度範囲を満たすように原料混合物を調製し、これを 15 ~ 45 °C、好ましくは 25 ~ 40 °C、更に好ましくは 30 ~ 38 °C の温度条件で、0.5 ~ 10 時間、好ましくは 1 ~ 6 時間、更に好ましくは 2 ~ 4 時間インキュベートすることにより実施される；

E 2 ポリペプチドからなる酵素が 0.0001 ~ 1.0 重量%、好ましくは 0.001 ~ 0.1 重量%、更に好ましくは 0.001 ~ 0.01 重量%；

ジヒドロダイゼインが 0.0001 ~ 10.0 重量%、好ましくは 0.001 ~ 1.0 重量%、更に好ましくは 0.001 ~ 0.1 重量%；及び

NADPH 及び/または NADH が 0.01 ~ 5 重量%、好ましくは 0.05 ~ 1 重量%、更に好ましくは 0.1 ~ 0.5 重量%。

#### 【0238】

#### 第 3 工程

第 3 工程では、E 3 ポリペプチドからなる酵素を、テトラヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒドロダイゼインをエクオールに変換する。

#### 【0239】

第 3 工程に採用される反応は、前記 E 3 ポリペプチドからなる酵素、テトラヒドロダイゼインを含有する溶液中で、前記 E 3 ポリペプチドからなる酵素、テトラヒドロダイゼイン等の原料及びエクオール等の生成物に変質・不活性化されない温度条件及び時間インキュベートすることにより実施される。具体的には、上記 A - 6 . セクションに記載の条件に従って該反応を行うことが出来る。

#### 【0240】

前述の第 2 工程と第 3 工程とを同条件で実施する場合には、第 2 及び第 3 工程の両者を効率よく実施する観点から、採用される反応は、前記「第 2 工程」に記載の、第 2 工程と第 3 工程とを同条件で実施する場合の条件で両者をインキュベートすることにより実施される。この場合、E 3 ポリペプチドからなる酵素、テトラヒドロダイゼイン、並びに NADPH 及び/又は NADH の濃度は以下のように設定できる；

E 3 ポリペプチドからなる酵素が 0.0001 ~ 1.0 重量%、好ましくは 0.001 ~ 0.1 重量%、更に好ましくは 0.001 ~ 0.01 重量%；

テトラヒドロダイゼインが 0.0001 ~ 10.0 重量%、好ましくは 0.001 ~ 1.0 重量%、更に好ましくは 0.001 ~ 0.1 重量%；及び

NADPH 及び/又は NADH が 0.01 ~ 5 重量%、好ましくは 0.05 ~ 1 重量%、更に好ましくは 0.1 ~ 0.5 重量%。

#### 【0241】

第 3 工程においても、基質として使用されるテトラヒドロダイゼインの由来は限定され

ない。

【0242】

例えば、第2工程においてジヒドロダイゼインから生成されたテトラヒドロダイゼインを、第3工程における基質として使用してもよい。この場合、該テトラヒドロダイゼインとしては、第2工程において生じた、テトラヒドロダイゼインを含有する溶液そのままであってもよく、粗精製されたものであってもよく、精製されたものであってもよい。

【0243】

また、例えば市販のテトラヒドロダイゼインを使用してもよく、適宜合成したテトラヒドロダイゼインを使用してもよい。

【0244】

また、第3工程においてエクオールを合成するための混合原料として、(Ci)E3ポリペプチドからなる酵素、及び(Cii)テトラヒドロダイゼインを含有するエクオール合成原料組成物を使用してもよい。該合成原料組成物を前述する条件でインキュベートすることにより、該合成原料組成物中のテトラヒドロダイゼインをエクオールに変換することができる。該合成原料組成物の説明は、前記C-6、及びC-7、セクションにおいてより詳しく説明される。

【0245】

第3工程においては、第2工程においてジヒドロダイゼインから生成されたテトラヒドロダイゼインが、第3工程における基質として好ましく使用され、市販のテトラヒドロダイゼイン、前記合成原料組成物、前記酵素組成物等が併用されてもよい。

【0246】

E2ポリペプチド及びE3ポリペプチド

本発明の第2製造方法では、前記B-1、セクションに記載のE2ポリペプチドからなる酵素及び前記C-1、セクションに記載のE3ポリペプチドからなる酵素が使用される。

【0247】

D-I-4、第2製造方法により製造されたエクオールを含有する生成物

本発明は、第2工程及び第3工程を含むエクオールの製造方法(第2製造方法)により製造された、エクオールを含有する生成物を提供する。

【0248】

前述の通り、本発明の第2製造方法では、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【0249】

このことから、本発明の第2製造方法により製造されたエクオールを含有する生成物には、エクオールだけでなく、テトラヒドロダイゼイン、さらにジヒドロダイゼインが含有される場合もある。

【0250】

また、本発明の生成物は、第2製造方法により得られる溶液そのままであってもよく、該溶液からエクオール等が粗精製されたものであってもよく、さらに精製されたものであってもよい。

【0251】

本発明の生成物は、飲食品、化粧品、医薬品等に配合することができ、また基質として使用することもできる。

【0252】

D-I-5、第1工程～第3工程を含む、エクオールの製造方法

本発明は、前記第1工程、第2工程及び第3工程を含む、エクオールの製造方法(以下、該製造方法を「第3製造方法」と表記することもある)を提供する。

【0253】

本発明の第3製造方法では、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0254】

第1工程

本発明の第3製造方法に含有される第1工程では、E1ポリペプチドからなる酵素を、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。本発明の第3製造方法に含有される第1工程は、前述の第1工程と同様に説明される。

【0255】

なお、第1工程及び第2工程を同条件で実施する場合、第1工程及び第3工程を同条件で実施する場合、又は第1工程～第3工程を同条件で実施する場合には、これらの工程を効率よく実施する観点から、採用される反応は、前記「第1工程」に記載の、第1工程及び第2工程等を同条件で実施する場合に基づく条件・各濃度でインキュベートすることにより実施される。

10

【0256】

第2工程

本発明の第3製造方法に含有される第2工程では、E2ポリペプチドからなる酵素を、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ジヒドロダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。第2工程は、前述の第2工程と同様に説明される。

【0257】

なお、前記第1工程及び第2工程を同条件で実施する場合、又は第1工程～第3工程とを同条件で実施する場合には、各工程を効率よく実施する観点から、採用される反応は、前記「第2工程」に記載の、第1工程及び第2工程等を同条件で実施する場合に基づく条件・各濃度でインキュベートすることにより実施される。

20

【0258】

また、第1工程及び第2工程をE1ポリペプチドからなる酵素及びE2ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合、又は第1工程～第3工程をE1ポリペプチドからなる酵素、E2ポリペプチドからなる酵素及びE3ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合も、前記「第2工程」等に記載の、E1ポリペプチドからなる酵素及びE2ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合の条件・各濃度でインキュベートすることにより実施される。

30

【0259】

また、第2工程及び第3工程を同条件で実施する場合には、各工程を効率よく実施する観点から、採用される反応は、前記「第2工程」に記載の、第2工程及び第3工程等を同条件で実施する場合に基づく条件・各濃度でインキュベートすることにより実施される。

【0260】

第3工程

本発明の第3製造方法に含有される第3工程では、E3ポリペプチドからなる酵素を、テトラヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒドロダイゼインをエクオールに変換する。第3工程は、前述の第3工程と同様に説明される。

40

【0261】

なお、前記第1工程及び第3工程を同条件で実施する場合、又は第1工程～第3工程を同条件で実施する場合には、各工程を効率よく実施する観点から、採用される反応は、前記「第1工程」に記載の、第1工程及び第2工程等を同条件で実施する場合の条件でインキュベートすることにより実施される。この場合、E3ポリペプチドからなる酵素、テトラヒドロダイゼイン、並びにNADPH及び/又はNADHの濃度は以下のように設定できる：

E3ポリペプチドからなる酵素が0.0001～1.0重量%、好ましくは0.001～0.1重量%、更に好ましくは0.001～0.01重量%；

テトラヒドロダイゼインが0.0001～10.0重量%、好ましくは0.001～1.0

50

0重量%、更に好ましくは0.001~0.1重量%；及び  
NADPH及び/又はNADHが0.01~5重量%、好ましくは0.05~1重量%、  
更に好ましくは0.1~0.5重量%。

【0262】

ただし、第1工程及び第3工程をE1ポリペプチドからなる酵素及びE3ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合、又は第1工程~第3工程をE1ポリペプチドからなる酵素、E2ポリペプチドからなる酵素及びE3ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合には、前述のように、E1ポリペプチドからなる酵素を使用したジヒドロダイゼインの生成反応を効率よく実施する観点から、NADPHが必須である。この場合、NADPHの濃度は、前記「第1工程」に記載の、第1工程及び第2工程等を同条件で実施する場合の条件に基づき決定される。そして、NADPHと併用されるNADHの濃度は、前記「第2工程」に記載の、E1ポリペプチドからなる酵素及びE2ポリペプチドからなる酵素の共存下で行う場合の条件、及び前記「第2工程」に記載の、第2工程及び第3工程等を同条件で実施する場合の条件に基づき決定される。

10

【0263】

E1~E3ポリペプチド

本発明の第3製造方法では、前記E1ポリペプチドからなる酵素、E2ポリペプチドからなる酵素及びE3ポリペプチドからなる酵素が使用される。E1~E3ポリペプチドは、前述と同様に説明される。

20

【0264】

D-I-6.第3製造方法により製造されたエクオールを含有する生成物

本発明は、第1工程~第3工程を含むエクオールの製造方法(第3製造方法)により製造された、エクオールを含有する生成物を提供する。

【0265】

前述の通り、本発明の第3製造方法では、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【0266】

このことから、本発明の第3製造方法により製造されたエクオールを含有する生成物には、エクオールだけでなく、テトラヒドロダイゼイン、ジヒドロダイゼイン、ダイゼインが含有される場合もある。

30

【0267】

また、本発明の生成物は、第3製造方法により得られる溶液そのままであってもよく、該溶液からエクオール等が粗精製されたものであってもよく、さらに精製されたものであってもよい。

【0268】

本発明の生成物は、飲食品、化粧品、医薬品等に配合することができ、また基質として使用することもできる。

【0269】

D-I-7.第4工程~第6工程の少なくとも2つの工程を含む、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造方法

本発明は、以下の、ダイゼインからジヒドロダイゼインを生成する第4工程、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを生成する第5工程、及びテトラヒドロダイゼインからエクオールを生成する第6工程のうち少なくとも2つの工程を含む、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造方法(以下、該製造方法を「第4製造方法」と表記することもある)を提供する。

40

【0270】

(第4工程)(Ad)~(Af)のいずれかであるポリヌクレオチド(以下、該ポリヌクレオチドを「E1ポリヌクレオチド」と表記することもある)を有する組換え細胞をダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインを生成させる工程：

50

(Ad) 配列番号 4 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ae) 配列番号 1 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Af) 前記 (Ad) 又は (Ae) のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つダイゼインを基質としジヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【 0 2 7 1 】

(第 5 工程) (Bd) ~ (Bf) のいずれかであるポリヌクレオチド (以下、該ポリヌクレオチドを「E 2 ポリヌクレオチド」と表記することもある) を有する組換え細胞をジヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒドロダイゼインを生成させる工程；

(Bd) 配列番号 10 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Be) 配列番号 7 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Bf) 前記 (Bd) 又は (Be) のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つジヒドロダイゼインを基質としテトラヒドロダイゼインを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【 0 2 7 2 】

(第 6 工程) (Cd) ~ (Cf) のいずれかであるポリヌクレオチド (以下、該ポリヌクレオチドを「E 3 ポリヌクレオチド」と表記することもある) を有する組換え細胞をテトラヒドロダイゼインに作用させることにより、エクオールを生成させる工程；

(Cd) 配列番号 16 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(Ce) 配列番号 13 に記載のアミノ配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(Cf) 前記 (Cd) 又は (Ce) のポリヌクレオチドの相補鎖に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つテトラヒドロダイゼインを基質としエクオールを生成する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【 0 2 7 3 】

本発明の第 4 製造方法では、第 4 ~ 6 工程の各種組み合わせに応じて、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び / 又はエクオール製造することができる。

【 0 2 7 4 】

本発明の第 4 製造方法は、前述の通り、第 4 工程、第 5 工程及び第 6 工程のうち少なくとも 2 つの工程を含む。

【 0 2 7 5 】

例えば、本発明の第 4 製造方法が第 4 工程及び第 5 工程の 2 工程を含み、第 6 工程を含まない場合、本発明の第 4 製造方法では、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造することができる。

【 0 2 7 6 】

また、例えば、本発明の第 4 製造方法が第 5 工程及び第 6 工程の 2 工程を含み、第 4 工程を含まない場合、本発明の第 4 製造方法では、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【 0 2 7 7 】

本発明の第 4 製造方法が第 4 ~ 6 工程の 3 工程を含む場合、本発明の第 4 製造方法では、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【 0 2 7 8 】

本発明の第 4 製造方法において使用される組換え細胞は、一つの細胞内に、(Ad) ~ (Af)、(Bd) ~ (Bf) 及び (Cd) ~ (Cf) からなる群より選択される 1 種のポリヌクレオチドを有していてもよく、該群より選択される 2 種以上のポリヌクレオチドを有していてもよい。

【 0 2 7 9 】

例えば、一つの細胞が、(Ad) ~ (Af) から選択される 1 種のポリヌクレオチドと (Bd) ~ (B

10

20

30

40

50

f)から選択される1種のポリヌクレオチドの2種を有している場合、この組換え細胞を用いることにより第4工程及び第5工程を1種類の組換え細胞により実施することができる。

【0280】

また、例えば、一つの細胞が、(Ad)～(Af)から選択される1種のポリヌクレオチドと(Bd)～(Bf)から選択される1種のポリヌクレオチドと(Cd)～(Cf)から選択される1種のポリヌクレオチドの3種を有している場合、この組換え細胞を用いることにより第4工程～第6工程を1種類の組換え細胞により実施することができる。

【0281】

また、本発明の第4製造方法では、例えば、前述のような、(Ad)～(Af)から選択される1種のポリヌクレオチドと(Bd)～(Bf)から選択される1種のポリヌクレオチドの合計2種を有している組換え細胞と、(Cd)～(Cf)から選択される1種のポリヌクレオチドを有している組換え細胞とを用いることによっても、第4工程～第6工程を実施することができる。

10

【0282】

同様に、例えば、本発明の第4製造方法では、(Ad)～(Af)から選択される1種のポリヌクレオチドと(Cd)～(Cf)から選択される1種のポリヌクレオチドの合計2種を有している組換え細胞と、(Bd)～(Bf)から選択される1種のポリヌクレオチドを有している組換え細胞とを用いることによっても、第4工程～第6工程を実施することができる。

【0283】

20

第4工程

第4工程では、前記A-2.セクションに記載のE1ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。

【0284】

第4工程に採用される反応は、上記第1工程と同様の条件で行うことができる。具体的には、ダイゼインを0.001～1重量%、好ましくは0.01～1重量%、更に好ましくは0.01～0.5重量%を含む培地に、前記組換え細胞を接種し、生育可能温度条件下で6～30時間、好ましくは7～24時間、更に好ましくは7～18時間インキュベートすることにより実施される。ここで、生育可能温度条件は特に限定されず、前記「第1工程」と同様の温度で実施することができる。

30

【0285】

第4工程で使用される組換え細胞

第4工程で使用される組換え細胞はE1ポリヌクレオチドを有し、E1ポリヌクレオチドを発現できる限り制限されない。具体的には、前記A-4.セクションに記載の組み換え細胞を使用することができる。

【0286】

E1ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いたE1ポリペプチドからなる酵素の製造

E1ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を培養し、細胞及び/又は培養物からE1ポリペプチドを回収することにより、E1ポリペプチドからなる酵素を製造することができる。具体的には、前記A-5.セクションに記載の条件に従って当該組換え細胞を培養することによってE1ポリペプチドを製造することができる。

40

【0287】

第5工程

第5工程では、前記B-2.セクションに記載のE2ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を、ジヒドロダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。

【0288】

第5工程に採用される反応は、上記第2工程と同様の条件で行うことができる。具体的

50

には、ジヒドロダイゼインを0.001~1重量%、好ましくは0.01~0.5重量%、更に好ましくは0.01~0.1重量%を含む培地に、前記組換え細胞を接種し、生育可能温度条件下で7~30時間、好ましくは15~24時間、更に好ましくは17~20時間インキュベートすることにより実施される。ここで、生育可能温度条件は特に限定されず、前記「第2工程」と同様の温度で実施することができる。

【0289】

第5工程で使用される組換え細胞

第5工程で使用される組換え細胞は前記B-2.セクションに記載のE2ポリヌクレオチドを有し、E2ポリヌクレオチドを発現できる限り制限されない。具体的には、前記B-4.セクションに記載の組み換え細胞を使用することが出来る。

10

【0290】

E2ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いたE2ポリペプチドからなる酵素の製造

E2ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を培養し、細胞及び/又は培養物からE2ポリペプチドを回収することにより、E2ポリペプチドからなる酵素を製造することができる。

【0291】

また、E2ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞の培養、培養に用いられる培地、E2ポリペプチドの分離・精製は、前記「E1ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いたE1ポリペプチドからなる酵素の製造」と同様にして実施できる。

20

【0292】

第6工程

第6工程では、前記C-2.セクションに記載のE3ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を、テトラヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒドロダイゼインをエクオールに変換する。

【0293】

第6工程に採用される反応は、上記第3工程と同様の条件で行うことが出来る。例えば、テトラヒドロダイゼインを0.001~1重量%、好ましくは0.01~0.5重量%、更に好ましくは0.01~0.1重量%を含む培地に、前記組換え細胞を接種し、生育可能温度条件下で7~30時間、好ましくは15~24時間、更に好ましくは17~20時間インキュベートすることにより実施される。ここで、生育可能温度条件は特に限定されず、前記「第3工程」と同様の温度で実施することができる。

30

【0294】

第6工程において基質として使用される、テトラヒドロダイゼインの由来は限定されない。

【0295】

例えば、第5工程においてジヒドロダイゼインから生成されたテトラヒドロダイゼインを、第6工程における基質として使用してもよい。この場合、該テトラヒドロダイゼインとしては、第5工程において生じた、テトラヒドロダイゼインを含有する溶液そのままであってもよく、粗精製されたものであってもよく、精製されたものであってもよい。

40

【0296】

また、例えば市販のテトラヒドロダイゼインを使用してもよく、適宜合成したテトラヒドロダイゼインを使用してもよい。

【0297】

また、例えば、第6工程においてエクオールを合成するための混合原料として、E3ポリヌクレオチドを有する組換え細胞、及びテトラヒドロダイゼインを含有するエクオール合成原料組成物を使用してもよい。該合成原料組成物を前述する条件で培養することにより、該合成原料組成物中のテトラヒドロダイゼインをエクオールに変換することができる。該合成原料組成物における前記組換え細胞及びテトラヒドロダイゼインの濃度、並びに該合成原料組成物に配合可能な他の成分等、また反応条件は、前述と同様に説明される。

50

## 【0298】

好ましくは、第5工程においてジヒドロダイゼインから生成されたテトラヒドロダイゼインを、第5工程における基質として使用され、市販のテトラヒドロダイゼインや前記合成原料組成物等が併用されてもよい。

## 【0299】

第6工程で使用される組換え細胞

第6工程で使用される組換え細胞は前記C-2.セクションに記載のE3ポリヌクレオチドを有し、E3ポリヌクレオチドを発現できる限り制限されない。具体的には、前記C-4.セクションに記載の組換え細胞を使用することが出来る。

## 【0300】

E3ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いたE3ポリペプチドからなる酵素の製造

E3ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞を培養し、細胞及び/又は培養物からE3ポリペプチドを回収することにより、E3ポリペプチドからなる酵素を製造することができる。

## 【0301】

また、E3ポリヌクレオチドが導入された組換え細胞の培養、培養に用いられる培地、E3ポリペプチドの分離・精製は、前記「E1ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いたE1ポリペプチドからなる酵素の製造」と同様にして実施できる。

## 【0302】

E1～E3ポリヌクレオチド

本発明の第4製造方法では、E1～E3ポリヌクレオチドの少なくとも1種が使用される。これらのポリヌクレオチドは、各々前記A-2.、B-2.及びC-2.セクションに説明されるものである。

## 【0303】

D-I-8.第4製造方法により製造された、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールを含有する生成物

本発明は、第4製造方法により製造された、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールを含有する生成物を提供する。

## 【0304】

前述の通り、本発明の第4製造方法では、第4～6工程の各種組み合わせにより、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールを製造することができる。

## 【0305】

このため、本発明の第4製造方法により製造された生成物には、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールが含有される。

## 【0306】

また、本発明の生成物は、第4製造方法により得られる溶液そのままであってもよく、該溶液からジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールが粗精製されたものであってもよく、さらに精製されたものであってもよい。

## 【0307】

本発明の生成物は、飲食品、化粧品、医薬品等に配合することができ、また基質として使用することもできる。

## 【0308】

D-II-1.第1反応槽～第3反応槽の少なくとも1つの反応槽を備える、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置

本発明は、以下の第1反応槽～第3反応槽の少なくとも1つの反応槽を備える、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置(以下、「第1製造装置」と表記することもある)を提供する。

(第1反応槽)(Aa)～(Ac)のいずれかであるポリペプチド(すなわち、E1ポリペプチド

10

20

30

40

50

）からなる酵素が固定されている反応手段（以下、これを「反応手段 1」と表記することもある）を有しており、該ポリペプチドを用いてダイゼインからジヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は該反応槽内のダイゼインと接触できるように配置されている；

（第 2 反応槽）(Ba) ~ (Bc)のいずれかであるポリペプチド（すなわち、E 2 ポリペプチド）からなる酵素が固定されている反応手段（以下、これを「反応手段 2」と表記することもある）を有しており、該ポリペプチドを用いてジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は該反応槽内のジヒドロダイゼインと接触できるように配置されている；

（第 3 反応槽）(Ca) ~ (Cc)のいずれかであるポリペプチド（すなわち、E 3 ポリペプチド）からなる酵素が固定されている反応手段（以下、これを「反応手段 3」と表記することもある）を有しており、該ポリペプチドを用いてテトラヒドロダイゼインからエクオールを製造するための反応槽、ここで該反応手段は該反応槽内のテトラヒドロダイゼインと接触できるように配置されている。

【0309】

本発明の第 1 製造装置では、第 1 反応槽 ~ 第 3 反応槽の各種組み合わせに応じて、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び / 又はエクオールを製造することができる。

【0310】

本発明の第 1 製造装置は、第 1 反応槽、第 2 反応槽及び第 3 反応槽のうち少なくとも 1 つの反応槽を備える。

【0311】

例えば、本発明の第 1 製造装置が第 1 反応槽を備えており、第 2 反応槽及び第 3 反応槽を備えていない場合、本発明の第 1 製造装置を使用することにより、ダイゼインからジヒドロダイゼインを製造することができる。

【0312】

例えば、本発明の第 1 製造装置が第 2 反応槽を備えており、第 1 反応槽及び第 3 反応槽を備えていない場合、本発明の第 1 製造装置を使用することにより、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造することができる。

【0313】

例えば、本発明の第 1 製造装置が第 3 反応槽を備えており、第 1 反応槽及び第 2 反応槽を備えていない場合、本発明の第 1 製造装置を使用することにより、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【0314】

また、例えば、本発明の第 1 製造装置が第 1 反応槽及び第 2 反応槽の 2 つの反応槽を備えており、第 3 反応槽を備えていない場合、本発明の第 1 製造装置を使用することにより、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造することができる。

【0315】

また、例えば、本発明の第 1 製造装置が第 2 反応槽及び第 3 反応槽の 2 つの反応槽を備えており、第 1 反応槽を備えていない場合、本発明の第 1 製造装置を使用することにより、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【0316】

また、例えば、本発明の第 1 製造装置が第 1 反応槽 ~ 第 3 反応槽の 3 つの反応槽を備えている場合、本発明の第 1 製造装置を使用することにより、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【0317】

また、本発明の第 1 製造装置では、反応手段 1 ~ 3 の少なくとも 2 つの手段が、一つの

10

20

30

40

50

反応槽に共に存在していてもよい。

【0318】

例えば、反応手段1及び2が一つの反応槽に共に存在している場合には、第1反応槽及び第2反応槽における各々の反応を一つの反応槽内で実施することができる。また、例えば、反応手段1～3が一つの反応槽に共に存在している場合には、第1反応槽～第3反応槽における各々の反応を一つの反応槽内で実施することができる。

【0319】

これらの反応手段は、反応槽において所望の効果を発揮できる限り、反応槽への配置手段は限定されない。

【0320】

また、本発明の第1製造装置では、該製造装置が反応手段1～3の少なくとも2つの手段を有し、かつ異なる複数の反応槽を有している場合には、これらの反応層は供給手段を介して接続されている。

【0321】

例えば、本発明の第1製造装置が第1反応槽及び第2反応槽を備え、第3反応槽を備えておらず、かつ第1反応槽及び第2反応槽が各々独立し、第1反応槽内には反応手段1が、第2反応槽内には反応手段2が配置されている場合、該第1反応槽及び第2反応槽は、第1反応槽において生成されたジヒドロダイゼインを含有する生成物を第2反応槽に供給するための供給手段を介して接続されている。

【0322】

また、例えば、本発明の第1製造装置が、反応手段1及び2を一つの反応槽に備え、反応手段3を別の反応槽に備えている場合、反応手段1及び2が配置された反応槽と反応手段3が配置された反応槽は、反応手段1及び2が配置された反応槽において生成された生成物を反応手段3が配置された反応槽に供給するための供給手段を介して接続されている。

【0323】

ここで、生成物は、得られた溶液の状態であってもよく、ジヒドロダイゼイン等が粗精製されたものであってもよく、さらに精製されたものであってもよい。

【0324】

反応槽

本発明の第1製造装置において使用される第1反応槽～第3反応槽の形状、大きさ、素材等は、前記反応手段を有することができ、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造が好適に実施される限り制限されない。

【0325】

反応手段

本発明の第1製造装置において使用される反応手段1～3は、各々の反応手段が有する前記ポリペプチドからなる酵素が固定されており、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造に好適に適用できる限り制限されない。

【0326】

各反応手段に固定される各ポリペプチドからなる酵素は、粗精製の状態であってもよく、精製されたものであってもよい。ポリペプチドからなる酵素の反応手段への固定化は、従来公知の技術に従い実施される。

【0327】

例えば、ポリペプチドからなる酵素が担体に固定されている場合、該担体は、各ポリペプチドからなる酵素が有する所望の活性の発揮を妨げない限り制限されない。例えば、該担体としては、前記ポリペプチドからなる酵素と共有結合により結合できるアミノ基、カルボキシル基、水酸基などの官能基を有するもの、また、前記ポリペプチドからなる酵素とリンカーを介して接続できるもの等が例示される。担体の形状も限定されない。このような担体、官能基、リンカー等は、ポリペプチドからなる酵素を担体に固定する従来公知の技術に従い適宜選択される。また、ポリペプチドからなる酵素の担体への固定化も、従

10

20

30

40

50

来公知の技術に従い実施される。

【0328】

供給手段

本発明の第1製造装置において使用される供給手段は、本発明の第1製造装置において使用され得る異なる反応槽を該供給手段を介して接続させることができ、本発明の第1製造装置においてジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールを製造できる限り制限されない。該供給手段は、従来公知の技術に従い適宜選択される。

【0329】

E1～E3ポリペプチド

本発明の第1製造装置において使用されるE1～E3ポリペプチドは、前述と同様に説明される。

10

【0330】

第1反応槽におけるジヒドロダイゼインの製造

第1反応槽では、反応手段1に固定されたE1ポリペプチドからなる酵素を、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ダイゼインに作用させることにより、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。E1ポリペプチドからなる酵素は、E1ポリペプチドからなる酵素の補酵素として作用するNADPH及び/又はNADHとともに、反応手段に固定されていても良い。第1反応槽における反応は、前述の「第1工程」に基づき実施される。

20

【0331】

第2反応槽におけるテトラヒドロダイゼインの製造

第2反応槽では、反応手段2に固定されたE2ポリペプチドからなる酵素を、NADPH及び/又はNADHの存在下で、ジヒドロダイゼインに作用させることにより、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。E2ポリペプチドからなる酵素は、E2ポリペプチドからなる酵素の補酵素として作用するNADPH及び/又はNADHとともに、反応手段に固定されていても良い。第2反応槽における反応は、前述の「第2工程」に基づき実施される。

【0332】

第3反応槽におけるエクオールの製造

第3反応槽では、反応手段3に固定されたE3ポリペプチドからなる酵素を、テトラヒドロダイゼインに作用させることにより、テトラヒドロダイゼインをエクオールに変換する。第3反応槽における反応は、前述の「第3工程」に基づき実施される。

30

【0333】

D-II-2. 第4反応槽～第6反応槽の少なくとも1つの反応槽を備える、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置

本発明は、以下の第4反応槽～第6反応槽の少なくとも1つの反応槽を備える、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置（以下、「第2製造装置」と表記することもある）を提供する。

（第4反応槽）(Ad)～(Af)のいずれかであるポリヌクレオチド（すなわち、E1ポリヌクレオチド）を有する組換え細胞が固定されている反応手段（「以下、これを反応手段4と表記することもある」）を有しており、該反応手段を用いてダイゼインからジヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のダイゼインと接触できるように配置されている；

40

（第5反応槽）(Bd)～(Bf)のいずれかであるポリヌクレオチド（すなわち、E2ポリヌクレオチド）を有する組換え細胞が固定されている反応手段（「以下、これを反応手段5と表記することもある」）を有しており、該反応手段を用いてジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のジヒドロダイゼインと接触できるように配置されている；

（第6反応槽）(Cd)～(Cf)のいずれかであるポリヌクレオチド（すなわち、E3ポリヌクレオチド）を有する組換え細胞が固定されている反応手段（「以下、これを反応手段6と

50

表記することもある」)を有しており、該反応手段を用いてテトラヒドロダイゼインからエクオールを製造するための反応槽、ここで該反応手段は反応槽内のテトラヒドロダイゼインと接触できるように配置されている。

【0334】

本発明の第2製造装置では、第4反応槽～第6反応槽の各種組み合わせに応じて、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールを製造することができる。

【0335】

本発明の第2製造装置は、第4反応槽、第5反応槽及び第6反応槽のうち少なくとも1つの反応槽を備える。

10

【0336】

例えば、本発明の第2製造装置が第4反応槽を備えており、第5反応槽及び第6反応槽を備えていない場合、本発明の第2製造装置を使用することにより、ダイゼインからジヒドロダイゼインを製造することができる。

【0337】

例えば、本発明の第2製造装置が第5反応槽を備えており、第4反応槽及び第6反応槽を備えていない場合、本発明の第2製造装置を使用することにより、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造することができる。

【0338】

例えば、本発明の第2製造装置が第6反応槽を備えており、第4反応槽及び第5反応槽を備えていない場合、本発明の第2製造装置を使用することにより、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

20

【0339】

また、例えば、本発明の第2製造装置が第4反応槽及び第5反応槽の2つの反応槽を備えており、第6反応槽を備えていない場合、本発明の第2製造装置を使用することにより、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを製造することができる。

【0340】

また、例えば、本発明の第2製造装置が第5反応槽及び第6反応槽の2つの反応槽を備えており、第4反応槽を備えていない場合、本発明の第2製造装置を使用することにより、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

30

【0341】

また、例えば、本発明の第2製造装置が第4反応槽～第6反応槽の3つの反応槽を備えている場合、本発明の第2製造装置を使用することにより、ダイゼインからジヒドロダイゼインを、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインを、テトラヒドロダイゼインからエクオールを製造することができる。

【0342】

また、本発明の第2製造装置では、反応手段4～6の少なくとも2つの手段が、一つの反応槽に共に存在していてもよい。

40

【0343】

例えば、反応手段4及び5が一つの反応槽に共に存在している場合には、第4反応槽及び第5反応槽における各々の反応を一つの反応槽内で実施することができる。また、例えば、反応手段4～6が一つの反応槽に共に存在している場合には、前記第4反応槽～第6反応槽における各々の反応を一つの反応槽内で実施することができる。

【0344】

これらの反応手段は、反応槽において所望の効果を発揮できる限り、反応槽への配置手段は限定されない。

【0345】

また、本発明の第2製造装置では、該製造装置が反応手段4～6の少なくとも2つの手

50

段を有し、かつ異なる複数の反応槽を有している場合には、該反応は前記異なる反応槽と供給手段を介して接続されている。

【0346】

例えば、本発明の第2製造装置が第4反応槽及び第5反応槽を備え、第6反応槽を備えておらず、かつ第4反応槽及び第5反応槽が各々独立し、第4反応槽内には反応手段4が、第5反応槽内には反応手段5が配置されている場合、該第4反応槽及び第5反応槽は、第4反応槽において生成されたジヒドロダイゼインを含有する生成物を第5反応槽に供給するための供給手段を介して接続されている。

【0347】

また、例えば、本発明の第2製造装置が、反応手段4及び5を一つの反応槽に備え、反応手段6を別の反応槽に備えている場合、反応手段4及び5が配置された反応槽と反応手段6が配置された反応槽は、反応手段4及び5が配置された反応槽において生成された生成物を反応手段6が配置された反応槽に供給するための供給手段を介して接続されている。

10

【0348】

ここで、生成物は、得られた溶液の状態であってもよく、ジヒドロダイゼイン等が粗精製されたものであってもよく、さらに精製されたものであってもよい。

【0349】

#### 反応槽

本発明の第2製造装置において使用される第4反応槽～第6反応槽の形状、大きさ、素材等は、前記反応手段を有することができ、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造が好適に実施される限り制限されない。

20

【0350】

#### 反応手段

本発明の第2製造装置において使用される反応手段4～6は、各々の反応手段が有する前記組換え細胞が固定されており、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造に好適に適用できる限り制限されない。

【0351】

組換え細胞の反応手段への固定化は、各組換え細胞が有する所望の効果の発揮を妨げない限り制限されず、従来公知の技術に従い実施される。また、組み換え細胞は、反応手段において細胞が培養できる、又は培養されている状態にあってもよい。ここで適用される組換え細胞の培養条件は、前述の「第4工程」、「第5工程」及び「第6工程」等の記載に基づき各々設定される。

30

【0352】

#### 供給手段

本発明の第2製造装置において使用される供給手段は、本発明の第2製造装置において使用され得る異なる反応槽を該供給手段を介して接続させることができ、本発明の第2製造装置においてジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールを製造できる限り制限されない。該供給手段は、従来公知の技術に従い適宜選択される。

【0353】

#### 組換え細胞

本発明の第2製造装置において使用される組換え細胞は、前述の「第4工程で使用される組換え細胞」、「第5工程で使用される組換え細胞」及び「第6工程で使用される組換え細胞」等の記載と同様に説明される。

40

【0354】

#### E1～E3ポリヌクレオチド

本発明の第2製造装置において使用されるE1～E3ポリヌクレオチドは、前述と同様に説明される。

【0355】

#### 第4反応槽におけるジヒドロダイゼインの製造

50

第4反応槽では、反応手段4に固定された、E1ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いて、ダイゼインをジヒドロダイゼインに変換する。第4反応槽における反応は、前述の「第4工程」等の記載に基づき実施される。

【0356】

第5反応槽におけるテトラヒドロダイゼインの製造

第5反応槽では、反応手段5に固定された、E2ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いて、ジヒドロダイゼインをテトラヒドロダイゼインに変換する。第5反応槽における反応は、前述の「第5工程」等の記載に基づき実施される。

【0357】

第6反応槽におけるエクオールの製造

第6反応槽では、反応手段6に固定された、E3ポリヌクレオチドを有する組換え細胞を用いて、テトラヒドロダイゼインをエクオールに変換する。第6反応槽における反応は、前述の「第6工程」等の記載に基づき実施される。

10

【0358】

D - I I - 3 . 第1反応槽～第3反応槽の少なくとも1つの反応槽、及び第4反応槽～第6反応槽の少なくとも1つの反応槽を備える、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置

本発明は、前述の第1反応槽～第3反応槽の少なくとも1つの反応槽、及び第4反応槽～第6反応槽の少なくとも1つの反応槽を備える、ジヒドロダイゼイン、テトラヒドロダイゼイン及び/又はエクオールの製造装置（以下、「第3製造装置」と表記することもある）を提供する。

20

【0359】

第3製造装置における各反応槽、各反応手段の組み合わせは、前述の第1及び第2製造装置と同様に説明される。また、第3製造装置において使用される反応槽、反応手段、ポリヌクレオチド、組換え細胞、及び各反応槽における反応も、前述の第1及び第2製造装置と同様に説明される。

【実施例】

【0360】

実施例 A

参考例 A 1

ラクトコッカス20-92株(FERM BP-10036号)を、ダイゼイン含有増殖用液体培地（ダイゼインを10  $\mu$ g / mLとなる量で変法GAMブイヨン培地（日水製薬株式会社）に添加したものに接種し、嫌氣的条件下（BBL Gas Pack systemsを使用）、37  $^{\circ}$ Cで7から18時間適宜培養した。培養後、遠心分離により集菌して冷凍保存し、以下の実施例に使用した。

30

【0361】

実施例 A 1 菌体破砕物の遠心上清中におけるジヒドロダイゼイン生合成活性の存在の確認、及びNADPH依存性の確認

保存してある凍結菌体（67mL分、2本）を融解後8,000rpm、4  $^{\circ}$ C、10分間遠心分離し、沈渣を以下の試験に供した。沈渣を、1 mM PMSF(和光純薬工業株式会社)及び2mM DTT(和光純薬工業株式会社)、5 mM Sodium hydrosulfite(和光純薬工業株式会社)を含有する0.1 M リン酸カリウム溶液2mLに懸濁させた。懸濁液をあらかじめ0.1 mm zirconia/silica beads (BioSpec Products, Inc.)を入れておいた2mL容スクリーキャップ付チューブ(株式会社アシスト製)2本に移し、FastPrep(登録商標) FP100A(Thermo ELECTRON CORPORATION)にて菌体を破砕し(6500rpm 10秒 氷冷を8回)、菌体破砕液を得た。得られた菌体破砕液を約10,000rpm、4  $^{\circ}$ Cにて10分間遠心して遠心上清を得、遠心上清を1 mM PMSF及び2mM DTT、5 mM Sodium hydrosulfiteを含有する0.1 M リン酸カリウム溶液で4.5mLに希釈し、これを酵素源とした。

40

【0362】

下記組成の酵素反応液を調製し、37  $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。インキュベート後、得られた酵素反応生成物に3mLの酢酸エチルを添加して抽出処理を行った後、乾固して

50

、HPLC分析に供した。HPLC分析の標準溶液はダイゼイン（フナコシ株式会社）、エクオール（フナコシ株式会社）、ジヒドロダイゼイン（トレンドリサーチケミカル社）の混合溶液（各2 $\mu$ g/mL）を用いた。

酵素反応液組成

菌体破砕液(酵素源)	250 $\mu$ l
滅菌水、NADH(100 mM)あるいは NADPH(100 mM)	5 $\mu$ l
ダイゼイン (1 mg / ml)	10 $\mu$ l
<u>0.1Mリン酸カリウム緩衝液 pH7/1mM DTT/5mM Sodiumhydrosulfite</u>	<u>735 <math>\mu</math>l</u>
計	1000 $\mu$ l

10

### 【0363】

結果を図1に示す。この結果から、菌体破砕物の遠心上清にはジヒドロダイゼイン生合成活性が存在することが確認された。また、ダイゼインからジヒドロダイゼインへの変換反応は、補酵素NADPHに依存性を示すことが確認された。

### 【0364】

#### 実施例A2 ジヒドロダイゼイン合成酵素の精製

培養ボトル当たり67 mlの変法GAMブイヨン培地（日水製薬株式会社）にて18時間培養したラクトコッカス20-92株菌体9本を遠心後、2 mM DTT（1, 4-Dithiothreitol、Merck）、5 mM Sodium hydrosulfite（和光純薬工業株式会社）及びプロテアーゼインヒビター（コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテルEDTA-free、Roche Diagnostics）を含有する0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7に懸濁させた。懸濁液を0.1 mm zirconia/silica beads（BioSpec Products, Inc.）を入れた2ml容スクリーキャップ付チューブ（株式会社アシスト製）3本に移し、FastPrep（登録商標）FP100A（Thermo ELECTRON CORPORATION）にて菌体を破砕し（6500rpm、20秒を4回）、破砕液を遠心して上清を得た。また、培養ボトル当たり200mlの同液体培地にて18時間培養したラクトコッカス20-92株菌体8本を同様に菌体破砕後遠心し8本分の上清を得た。

20

### 【0365】

精製には1 mM PMSF（phenylmethylsulfonyl fluoride、Sigma Aldrich）、2 mM DTT及び5 mM Sodium hydrosulfiteを含有する0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7（以下、「Buffer A」と表記する）を用いた。得られた菌体の破砕上清を等量の2 M 硫酸を含むBuffer Aと混合し、Butyl Sepharose 4 Fast Flow（ゲルは1本当たり約0.3 ml、GEヘルスケア）を詰め、1 M 硫酸を含むBuffer Aにて平衡化したマイクロバイオスピナラム（11本、バイオ・ラッド ラボラトリーズ）に供した。1 M 硫酸を含むBuffer Aにて洗浄後、0.75 mlの0.5 M 硫酸を含むBuffer Aを2回流した後、Buffer Aを0.75 ml、次いで0.5 ml加えてジヒドロダイゼイン合成活性を有する画分を溶出した。前記Buffer Aを0.75 mlを加えて得られた溶出液を溶出液I、前記0.5 ml加えてを加えて得られた溶出液を溶出液IIとする。

30

### 【0366】

溶出液I 0.75 mlには0.3 ml、溶出液II 0.5 mlには0.2 mlの3.4 M硫酸を含むBuffer Aをそれぞれ加えた後に、これらを混合し、これを1 M硫酸を含む溶離液で平衡化したTSKgel Ether-5PWカラム（東ソー）を用いたHPLCに供した。混合液0.5 mlを2~9回カラムに注入後、流速0.1 ml/分で1 M 硫酸を含む溶離液（溶離液B）で洗浄し、その後、溶離液Bと溶離液Aの混合比率を変えることにより、15分間で直線的に0 M硫酸（溶離液A）にするプログラムを実行した。酵素活性は約0.6 M~0.35 M硫酸の溶出画分に認められ、合計で約3.5 mlの溶出液を得た。HPLCの条件を以下に示す。蛋白質の吸収として、280 nmの吸収を測定した。

40

カラム：TSKgel Ether-5PW

流速：サンプルアプライ時0.05~0.1 ml/分、溶出時 0.1 ml/分

溶離液A：0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7/2mM DTT/2.5 mM Sodium hydrosulfite/1% 2-プロパノール

50

溶離液B: 1M 硫酸を含む溶離液A

【0367】

酵素活性が認められた溶出画分の溶出液をBuffer Aで希釈し、これをBuffer Aで平衡化した2'5' ADP Sepharose 4B (ゲルは約0.3 ml、GEヘルスケア)を詰めたマイクロバイオスピカラムに供した。Buffer Aによるカラム洗浄後、20 mM NADPHを含むpH 7.5のBuffer A組成液0.7 ml、次いで0.6 mlにてジヒドロダイゼイン合成活性を有する画分を溶出した。

【0368】

得られた溶出液をpH 7.5の溶離液Cで平衡化したMono Qカラム (GEヘルスケア)を用いたHPLCに供した。流速0.1 ml/分で溶離液Cをカラムに送液し、洗浄後、溶離液Cと溶離液Dの混合比率を変えることにより、32.5分間で直線的に0.65 M NaClにするプログラムを実行した。HPLCの条件を以下に示す。蛋白質の吸収として、280 nmの吸収を測定した。

カラム: Mono Q PC 1.6/5

溶離液C: 0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7.5/3 mM DTT/2.5 mM Sodium hydrosulfite/1% 2-プロパノール

溶離液D: 1M NaClを含む溶離液C

酵素活性は0.4~0.46 M NaCl画分 (フラクション No. 28~30)に認められた。

【0369】

新しく実施したMono Q HPLCの結果と酵素活性を図2に示す。また、図3に還元条件下でのフラクションNo. 27~31のSDS-PAGEの結果を示す。この結果、ジヒドロダイゼイン合成活性のあるフラクションに、還元条件下で70kDaのバンドが認められた。

【0370】

#### 実施例 A 3 N末端アミノ酸配列の決定

70 µlのMono Q HPLCで得たジヒドロダイゼイン合成活性のあるフラクション、No. 29に、30 µlの0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA)を加えて100 µlとした。

【0371】

10 µlのメタノールにてProSorbカートリッジ (アプライドバイオシステムズジャパン)のPVDF膜を湿らせ、続いて先に混合した液を添加した。ProSorbフィルター (アプライドバイオシステムズジャパン)を用いて吸水後、膜を乾燥させ、メンブレン用パンチ (アプライドバイオシステムズジャパン)を用いて、膜を切り取った。該膜を20%メタノール水で5回洗浄し、乾燥させた。この膜をプロテインシーケンサ (アプライドバイオシステムズ、Procise 494cLC)にてN末端アミノ酸配列分析を行い、次に示す22残基の連続したアミノ酸配列を得た。

Met Lys Asn Lys Phe Tyr Pro Lys Thr Phe Glu Arg Gly Tyr Ile Gly Asn Leu Glu Val  
Glu Asn (配列番号19)

【0372】

#### 実施例 A 4 内部アミノ酸配列の決定

ジヒドロダイゼイン合成活性を示す酵素タンパク質を消化酵素で断片化しペプチドとした。ペプチドのN末端アミノ酸配列分析を行って、内部アミノ酸配列情報を得た。

【0373】

#### (1) 試料の調製

培養ボトル当たり200 mlの変法GAMブイヨン培地 (日水製薬株式会社)にて18時間培養したラクトコッカス2092株菌体3本を遠心後、2 mM DTT (1, 4-Dithiothreitol, Merck)、5 mM Sodium hydrosulfite (和光純薬工業株式会社)及びプロテアーゼインヒビター (コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテルEDTA-free, Roche Diagnostics)を含有する0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7に懸濁させた。懸濁液を0.1 mm zirconia/silica beads (BioSpec Products, Inc.)を入れた2ml容スクリーキャップ付チューブ (アシスト)3本に移し、FastPrep (登録商標) FP100A (Thermo ELECTRON CORPORATION)にて菌体を破碎し(6500rpm、20秒を4回)、破碎液を遠心して上清を得た。

【0374】

10

20

30

40

50

以後の操作には1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride、Sigma Aldrich)、2 mM DTT及び5 mM Sodium hydrosulfiteを含有する0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7 (以下、「Buffer A」と表記する)を用いた。菌体の破碎上清を等量の2 M 硫酸を含むBuffer Aと混合し、Butyl Sepharose 4 Fast Flow (ゲルは1本当たり約0.3 ml、GEヘルスケア)を詰め、1 M 硫酸を含むBuffer Aにて平衡化したマイクロバイオスピカラム (3本、バイオ・ラッド ラボラトリーズ) に供した。1 M 硫酸を含むBuffer Aにて洗浄後、0.75 mlの0.5 M 硫酸を含むBuffer Aを2回流した後、0.75 mlのBuffer A を2回加えてジヒドロダイゼイン合成活性を有する画分を溶出した。

#### 【 0 3 7 5 】

2'5' ADP Sepharose 4Bを詰めたマイクロバイオスピカラム1本をBuffer Aで平衡化し、先に溶出した溶液1.5 mlを添加した。0.75 mlのBuffer Aで5回洗浄後、20 mM NADPHを含むBuffer A 0.75 ml、次いで0.45 mlにて溶出した。溶出液を混合し、微量用遠心濃縮チューブ (NANOSEP 10K OMEGA、Pall Life Sciences) にて5 µlまで脱塩濃縮した。

10

#### 【 0 3 7 6 】

濃縮液と2-メルカプトエタノールを含む2倍濃度のSDS-PAGE用サンプルバッファを用いて回収した液を混合し、90 °で7 分間加熱処理した後、Laemmli法に従いSDS-PAGEを行った。電気泳動のゲル板はスーパーセップ HG 10-20 % (和光純薬工業株式会社)を用いた。Colloidal Blue (Invitrogen) 染色し、ミリQ水にて脱色後、約70 kDaに泳動されたバンドを切り出した。コントロールとしてタンパク質を泳動していない部分より同等の分子量位置及び大きさのゲル片を切り出し、以後同様に処理した。尚、別途同様な操作で菌体を処理し、SDS-PAGE後PVDF膜に転写した同位置のバンドを用いてN末端アミノ酸配列分析を行い、Mono Q HPLCフラクションNo.29で得た配列と一致することを確認した。

20

#### 【 0 3 7 7 】

##### ( 2 ) 還元カルボキサミドメチル化と酵素消化

切り出したゲル片は細断し、50 %アセトニトリル水溶液を用いて脱色した後アセトニトリルで脱水し、遠心濃縮機 (SpeedVac A160、Savant) にて乾燥させた。55 mM のDTTを含む100 mM炭酸水素アンモニウム水溶液を加え、56 °で1時間還元した。DTT溶液を除き、100 mMのヨードアセトアミドを含む100 mM炭酸水素アンモニウム水溶液を加え、遮光下、室温で30 分間ゆるく振とうしてカルボキサミドメチル化処理を行った。反応試薬を除去後、50 %アセトニトリル水溶液、アセトニトリル、100 mM炭酸水素アンモニウム水溶液、及びアセトニトリルの順に洗浄し、ゲルを遠心濃縮機にて乾燥した。2 µgのAchromobacter protease I (和光純薬工業株式会社) を含む0.02 % Tween 20入り20 mMトリス塩酸緩衝液 pH 9を加え、37 °で7 時間消化した。遠心上清を別チューブに移し、ゲルに60 % アセトニトリル- 0.1 % TFA水溶液を加えて30 °で20 分間加温後、10 分間ボルテックスする操作を3回行って断片化したペプチドを抽出した。集めた上清液はUltrafree-MC (0.22 µm、Amicon) を用いてろ過した後、遠心濃縮した。

30

#### 【 0 3 7 8 】

##### ( 3 ) ペプチドマッピング

逆相HPLCを行い、酵素消化後のペプチドを分離した。

カラム: µRPC C2/C18 SC2.1/10 (GEヘルスケアバイオサイエンス)

流速: 0.1 ml/分

溶離液E: 0.05 % TFA

溶離液F: 90 % アセトニトリル/0.04 % TFA

溶出プログラム: 0 分 5 %F

3 分 5 %F

43 分 65 %F

48 分 100 %F

68 分 100 %F

フラクション: 30 µl

検出: 215 nm

40

50

なお、例えば上記「0分5%B」は、溶出0時間時には溶離液Eが95%、溶離液Fが5%含有された溶離液を使用したことを示す。

【0379】

(4) 内部アミノ酸配列分析

コントロールのクロマトグラムとの比較により、ジヒドロダイゼイン合成活性を示す酵素タンパク質由来のペプチドピークを選び、プロテインシーケンサ(アプライドバイオシステムズ、Procise 492HT)にてN末端アミノ酸配列分析を行った。逆相HPLCで分離開始後、20.6分から溶出し始めたピークのアミノ酸配列(以下、Peptide 1とする)は次の通りであった。

PheAspGluProValTyrProGlnAlaGlu(配列番号20)

10

22.1分から溶出し始めたピークのアミノ酸配列(以下、Peptide 2とする)は次の通りであった。

AlaSerArgMetValMetAspAlaValHisGluGlyTyrIleAlaGly(配列番号21)

26.6分から溶出し始めたピークは、非特異的に切断されたペプチドであったが、次に示すように当該酵素タンパク質のN末端から13残基目のグリシンをN末とするペプチドであった(以下のアミノ酸配列を、Peptide 3とする)。

GlyTyrIleGlyAsnLeuGluValGluAsnArgAlaIleArgMetProMet(配列番号22)

図4に、実施例A4においてペプチドマッピングを行った結果及び各ピークに対応するペプチドのアミノ酸配列を示す。

ピーク1(20.6分)

20

ピーク2(22.1分)

ピーク3(26.6分)

【0380】

実施例A5 精製ポリペプチドのN末端及び部分アミノ酸配列からのジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の増幅

上記実施例A3及びA4で得られたN末端及び部分アミノ酸配列を基にDegenerative-プライマーを設計、作製し、ラクトコッカス20-92株のゲノムDNAを鋳型にDegenerative-PCRを行うことによりジヒドロダイゼイン合成酵素をコードする遺伝子の増幅を試みた。

【0381】

(1) ラクトコッカス20-92株からのゲノムDNAの精製

30

変法GAMブイヨン培地(日水製薬株式会社) 40mLで嫌気培養したラクトコッカス20-92株を5000rpm、4、10分間で遠心し、培地をデカンテーションで除去し、菌体を集めた。集めた菌体は直ちにQIAGEN Genomic DNA Buffer Set(キアゲン)のB1溶液1.1mL(200µg/mL RNaseを含有)に懸濁し、更に300µLのLysozyme溶液(100mg/mL)、500µLのQIAGEN Proteinase K solution(キアゲン)を加えて、37、16時間インキュベーションした。次いで、B2溶液4mL加え、数回転倒混和した後、50、3時間インキュベーションした。

【0382】

次いで、5000rpm、4、10分間遠心し、その上清をQBT溶液で平衡化したQIAGEN Genomic-tip 500/G(キアゲン)カラムに通し、ゲノムDNAをカラムに吸着させた。30mLのQC溶液で2回カラムを洗浄後、15mLのQFでカラムからゲノムDNAを溶出させ、10.5mLのイソプロパノールを加えて塩析させた。糸状に析出したゲノムDNAのみを1.5mL容マイクロチューブに採り、75%エタノールで洗浄し、風乾した後、250µLのTE溶液(0.4µg/µL)で溶解した。こうして得られたゲノムDNA溶液は濃度を測定後、TE溶液で40ng/µLに調製し、PCRの鋳型として使用した。

40

【0383】

(2) Degenerative-プライマーの設計、作製

Degenerative-プライマーの設計では縮退数を小さくするため、5'側の配列はラクトコッカス ガルピエのコードンユーセージ情報(Codon Usage Database <http://www.kazusa.or.jp/codon/>)に基づき、各アミノ酸において最も出現頻度が高いコードンを採用した。

50

3'側は混合塩基を利用することにより、ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子とのミスマッチが起こらないように工夫した。

【0384】

実施例A3で決定したN末端配列：MKNKFYPKTFERGYIGNLEVENを基に以下のDegenerative-プライマーを設計、作製し、Degenerative-PCRに使用した。

E1-N-terminal-31：TGAAGAATAANTTNTAYCCNAARACNTTYGA（配列番号23）

（ただし、配列番号23において、位置11及び14の「N」はイノシンを示し、位置20及び26の「N」はアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを示す。）

E1-N-terminal-37：TGAAGAATAANTTNTAYCCNAARACNTTYGARRNGG（配列番号24）

（ただし、配列番号24において、位置11、14、20及び26の「N」はイノシンを示し、位置35の「N」はアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを示す。）

E1-N-terminal-F32：ATGAAGAATAAGTTTTAYCCNAARACNTTYGA（配列番号25）

（ただし、配列番号25において、位置21及び27の「N」はアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを示す。）

【0385】

また、実施例A4で決定した内部配列Peptide2：ASRMVMDAVHEGYIAGを基に以下のDegenerative-プライマーを設計、作製し、Degenerative-PCRに使用した。

E1-internal-RP1：CCTGCAATATAACCTTCATGTACNGCRTCCATNACCAT（配列番号26）

（ただし、配列番号26において、位置24及び33の「N」はアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを示す。）

【0386】

尚、本実施例でプライマーとして使用したオリゴDNAは全てシグマ アルドリッチ ジャパンで作製した。

【0387】

（3）Degenerative-PCRによるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の増幅

上記のDegenerative-プライマーを用いてDegenerative-PCRによるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の増幅を試みた。

Degenerative-PCRに用いたDegenerative-プライマーの組み合わせを以下に示す。

[1] E1-N-terminal-31とE1-internal-RP1

[2] E1-N-terminal-37とE1-internal-RP1

[3] E1-N-terminal-F32とE1-internal-RP1

Degenerative-PCRによるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の増幅はEx-Taq DNA polymerase（タカラバイオ株式会社）を使用し、増幅プログラム：

95 2min、（95 45sec、38 54 30sec、72 2min）×50cycles、72 3minで行った。Degenerative-プライマーのゲノムDNAへのミスマッチを考慮し、アニーリングの温度は38 から4 刻みに54 までの5段階で行った。PCR反応終了後、PCR産物に1/10量の10×Dyeを加え、6μLを0.8%のアガロースゲルで電気泳動した。本実施例におけるアガロース電気泳動ではエチジウムブロミドによる染色で行い、分子量マーカーには / Styl（株式会社ニッポンジーン）、100bp ladder（東洋紡績株式会社）を使用した。

【0388】

Degenerative-PCR産物の電気泳動の結果を図5に示す。本実施例内（3）で示した[3]のDegenerative-プライマーの組み合わせ（E1-N-terminal-F32とE1-internal-RP1）でいずれのアニーリング温度においても約1.9kbのDNA断片の増幅を確認した。中でも最も増幅されたのはアニーリング温度54 であった。

【0389】

（4）増幅したDNA断片の塩基配列の決定

増幅した約1.9kbのDNA断片（アニーリング温度54 ）をアガロースゲルから切り出し、Gel-Extraction kit（キアゲン）を用いて精製した。精製したDNA断片はpT7-Blue Cloning Vector（Novagen）に挿入し、塩基配列を決定した。

【0390】

10

20

30

40

50

得られたDNA塩基配列はDNAシーケンス-アセンブルソフトウェアSEQUENCHER (Gene Codes Inc、USA)を使用して解析を行った。その結果、実施例 A 4 で決定したPeptide 1 及び3のアミノ酸配列に相当する塩基配列が存在していた。

【 0 3 9 1 】

実施例 A 6 ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の全塩基配列の決定

実施例 A 5 で得られた1.9kbのジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の5'端及び3'端の配列を決定し、全塩基配列の決定をおこなうため、ラクトコカッス20-92株のゲノムDNAライブラリーを鋳型にcDNA末端配列の急速増幅(5'-、3'-RACE(rapid amplification of cDNA ends))を行った。

【 0 3 9 2 】

( 1 ) ゲノムDNAライブラリーの作製

実施例 A 5 で精製したラクトコカッス20-92株のゲノムDNAを制限酵素 ( BamHI , EcoRI , HindIII , KpnI , PstI , SacI , SalI , Sau3AI , XhoI ) ( いずれもタカラバイオ株式会社 ) により37、16時間消化することで断片化し、フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて精製した。精製したゲノムDNA断片はあらかじめ相当する制限酵素で切断処理し、Shrimp Alkaline Phosphatase ( タカラバイオ株式会社 ) 処理により脱リン酸化しておいたpUC19クローニングベクターへTaKaRa Ligation kit var.2.1(タカラバイオ株式会社)を用いてライゲーションし、ゲノムDNAライブラリーを作製した。

【 0 3 9 3 】

( 2 ) cDNA末端配列の急速増幅(5'-RACE、3'-RACE)

ゲノムDNAライブラリー(ライゲーション反応液)を滅菌水で20倍希釈し、1μLを鋳型に使用して、cDNA末端配列の急速増幅(5'-RACE、3'-RACE)によるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の5'端及び3'端の配列の増幅を試みた。

【 0 3 9 4 】

( 2 - 1 ) 使用プライマー

5'-RACE、3'-RACEにそれぞれ用いたプライマーの組み合わせを以下に示す。

【 0 3 9 5 】

( 2 - 1 - 1 ) 5'-RACE

First-PCR : E1-RACE-N-P1とpUC19-FP-1、E1-RACE-N-P1とpUC19-RP-1

Nested-PCR : E1-RACE-N-P2とpUC19-FP-2、E1-RACE-N-P2とpUC19-RP-2

【 0 3 9 6 】

( 2 - 1 - 2 ) 3'-RACE

First-PCR : E1-RACE-RP2-1とpUC19-FP-1、E1-RACE-RP2-1とpUC19-RP-1

Nested-PCR : E1-RACE-RP2-2とpUC19-FP-2、E1-RACE-RP2-2とpUC19-RP-2

【 0 3 9 7 】

( 2 - 1 - 3 ) 使用プライマーの配列

5'-RACE、3'-RACEにそれぞれ用いたプライマーの配列を以下に示す。

ベクター側プライマー :

pUC19-FP-1: ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG ( 配列番号 2 7 )

pUC19-RP-1: AGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGC ( 配列番号 2 8 )

pUC19-FP-2: ATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG ( 配列番号 2 9 )

pUC19-RP-2: CCAAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG ( 配列番号 3 0 )

ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子側プライマー

E1-RACE-N-P1: ATGCGGATCGCTCGGTTCTCGACCTCTAGGTTAC ( 配列番号 3 1 )

E1-RACE-RP2-1: ATCGAGGAGAAGTGCAGGACGTCAGGGTCATC ( 配列番号 3 2 )

E1-RACE-N-P2: TTCTCGACCTCTAGGTTACCGATGTAGCCGC ( 配列番号 3 3 )

E1-RACE-RP2-2: ACGTCAGGGTCATCGGCATCGGCGACTGCAAG ( 配列番号 3 4 )

【 0 3 9 8 】

尚、本実施例でプライマーとして使用したオリゴDNAは全てシグマ アルドリッチ ジャパンで作製した。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 9 9 】

( 2 - 2 ) 5' - RACE及び3' - RACEによるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の5'端及び3'端の配列の増幅

5' - RACE、3' - RACEにはEx-Taq DNA polymerase (タカラバイオ株式会社) を使用し、First-PCR及びNested-PCRを同増幅プログラム:

95 2min、(95 45sec、60 30sec、72 1min) × 30cycles、72 3minで行った。First-PCRでは鋳型に調製方法を上記記載したゲノムDNA希釈液1 µL (40ng) を使用し、Nested-PCRには0.5 µLのFirst-PCR産物を使用した。

## 【 0 4 0 0 】

Nested-PCR反応終了後、PCR産物に1/10量の10 × dayを加え、5 µLを0.8%のアガロースゲルで電気泳動し、5' - RACEでは約1.2kb (SacI)、約1.0 kb(Sau3AI)、3' - RACEでは約0.6kb(SacI)、0.3kb (KpnI) のDNA断片の増幅を確認した。

10

## 【 0 4 0 1 】

本実施例におけるアガロース電気泳動ではエチジウムブロミド (株式会社ニッポンジーン) による染色で行い、分子量マーカには λStyl (株式会社ニッポンジーン)、100bp ladder (東洋紡績株式会社) を使用した。

## 【 0 4 0 2 】

増幅したDNA断片をアガロースゲルから切り出し、Gel-Extraction kit (キアゲン) を用いて精製した。精製したDNA断片は増幅に使用したプライマーを使用したダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。その結果、5' - RACEでは上記の約1.2kb (SacI)、約1.0 kb(Sau3AI)、3' - RACEでは約0.6kb(SacI)のDNA断片がジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の配列であった。

20

## 【 0 4 0 3 】

( 3 ) ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の全塩基配列決定

実施例 A 5 で示したDegenerative-PCR及び本実施例内 ( 2 ) に示したcDNA末端配列の急速増幅により得られたDNA塩基配列をDNAシーケンス-アセンブルソフトウェアSEQUENCHER (Gene Codes Inc、USA) を使用してアセンブル解析を行った。その結果、3548bpのジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子周辺のゲノム構造を決定し、ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子は1935ヌクレオチド、644アミノ酸からなるポリペプチドであることが判明した。

30

## 【 0 4 0 4 】

塩基配列から決定された全アミノ酸配列とアミノ酸シーケンスから判明した部分アミノ酸配列の照合を行った結果、アミノ酸シーケンスから判明した部分アミノ酸配列の全てが塩基配列から決定された全アミノ酸配列に帰属できた。

## 【 0 4 0 5 】

( 4 ) コーディング領域の塩基配列の確認

本実施例内 ( 3 ) で得られた配列にはPCRでの増幅の際、DNAポリメラーゼの塩基取り込みエラーによるクローン間で塩基の異なる箇所が多数見られた。そのため、First strand cDNAを鋳型にして、High-FidelityDNA - PolymeraseであるEasy-A(R) High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) を使用したPCRにより、ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子のコーディング領域を含んだ領域 (2368bp) を増幅させた。使用した増幅プライマーを以下に示す。

40

E1-conf-NP : TGCCGGTGCAATGGCTGACATCATGTTCAACCTG (配列番号 35)

E1-conf-CP : TCCTCCATCGTTCCCTCCAATCAGTAAGACACGCG (配列番号 36)

得られたDNA断片はGel-Extraction kit (キアゲン) を用いて精製し、ダイレクトシーケンスにより、配列の確認、最終決定を行った。

## 【 0 4 0 6 】

実施例 A 7 増殖培養液中へのダイゼインの添加によるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の発現誘導

実施例 A 1 で示したようにラクトコッカス20-92株の増殖用培養液に基質であるダイゼ

50

インを添加した場合、培養された菌体はジヒドロダイゼイン合成活性を有する。このことから増殖培養液中へのダイゼインの添加により、ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の転写が誘導され、更にタンパク質へと翻訳されることが推測されるため、ダイゼインを添加した培地及び添加していない培地でそれぞれ培養したラクトコッカス 20 - 92 株菌体由来の cDNA を作製し、RT-PCR を行うことで増殖培養液中へのダイゼインの添加によりジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の発現が誘導されるか否かについて検討した。

【0407】

(1) ラクトコッカス 20 - 92 株からの全RNAの抽出、精製

ラクトコッカス 20 - 92 株からの全RNAの抽出、精製は以下の方法で行った。

【0408】

4 で密封保存しておいたラクトコッカス 20 - 92 株をダイゼイン (フナコシ株式会社) 10mg/L を含むもしくは含まない変法 GAM ブイヨン培地で 37 °C、8 時間嫌気培養を行った後、培養液 25 mL を 50 mL 容のチューブに移し、3500rpm、4 °C、10 分間遠心し、培地をデカンテーションで除き、集菌した。集めた菌体はすばやく液体窒素で凍結させ、次いで TRIzol 溶液 (Invitrogen) 1 mL を用いてマニュアルに従い、全RNAを抽出、精製した。精製した全RNAは DNase I (Invitrogen) 処理を行うことにより、混入しているゲノムDNAを除去し、first-strand cDNA の合成に使用した。

【0409】

(2) 全RNAからのfirst-strand cDNAの合成

DNase I 処理を施した全RNA 2 µg から SuperScript (登録商標) First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて first-strand cDNA (逆転写物) を合成した。DNA 合成のための伸長プライマーには付属のランダムヘキサマーミックスを用いてマニュアルに従い first-strand cDNA の合成を行った。また、first-strand cDNA の合成に用いた DNase I 処理済みの全RNAへのゲノムDNAの混入が無いことを確認するため、逆転写を行わない反応も併せて行った。RT-PCR の鑄型には最終反応液を使用した。

【0410】

上記で調製した最終反応液は以下の4種類である。

1. ダイゼイン添加培地で培養した菌体由来全RNAの逆転写物 (DZN(+))RT(+)
2. ダイゼイン無添加培地で培養した菌体由来全RNAの逆転写物 (DZN( )RT(+))
3. ダイゼイン添加培地で培養した菌体由来全RNAの無逆転写物 (DZN(+))RT( )
4. ダイゼイン無添加培地で培養した菌体由来全RNA無逆転写物 (DZN( )RT( ))

【0411】

(3) RT-PCRによるジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の発現の確認

本実施例内 (2) で示した4種類の最終反応物を鑄型にして RT-PCR を行うことにより、ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子を増幅し、発現量を比較した。コントロール遺伝子として 16S - リボソーム RNA 配列を採用し、併せて RT-PCR を行った。

【0412】

RT-PCR の増幅条件及び、それぞれの遺伝子増幅に使用したプライマー配列を以下に示す。

RT-PCR には Ex-Taq DNA polymerase (タカラバイオ株式会社) を使用し、増幅プログラム

95 °C 2min、(95 °C 30sec、56 °C 20sec、72 °C 30sec) × 30cycles、72 °C 2min で行った。鑄型には本実施例内 (2) の最終反応液 1 µL を使用した。

【0413】

本実施例の RT-PCR に使用したプライマー配列及び増幅する DNA 断片のサイズを以下に示す。

ジヒドロダイゼイン合成酵素 : 239bp

E1-FP : CTACATCGGTAACCTAGAGGTCG (配列番号 37)

E1-RP : CCGTGCTGCTTGATGGTCTTTGC (配列番号 38)

16S - リボソーム RNA 配列 : 326bp

10

20

30

40

50

Gar-16S-Ribo-FP : TCGGTAGATATATGGAGGAAC (配列番号 39)

Gar-16S-Ribo-RP : CTTATCTCTAAGGATAGCACG (配列番号 40)

【0414】

尚、16S-Ribozoom RNA配列の増幅に用いたプライマーは米国生物学情報センター (National Center of Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) が提供している塩基配列データベース (GenBank) 内の *Lactococcus garvieae* strain FLG12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Accession No. AF352163-66) の配列を基に作製した。

【0415】

PCR産物に1/10量の10×dayを加え、5μLを1.5%のアガロースゲルで電気泳動し、それぞれの遺伝子の増幅を観察した。

10

【0416】

本実施例におけるアガロース電気泳動ではエチジウムブロミド (株式会社ニッポンジーン) による染色で行い、分子量マーカーには /Styl (株式会社ニッポンジーン)、100bp ladder (東洋紡績株式会社) を使用した。

【0417】

結果を図6に示す。

【0418】

ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子のRT-PCRによる増幅結果から明らかのように、鋳型にダイゼイン添加培地で培養した菌体由来の逆転写物を使用した場合にのみ、前記遺伝子が効率良く発現されたことが観察された。コントロールとして増幅させた16S-Ribozoom RNA配列は培地中へのダイゼインの添加の有無に関係なく、同等の発現が観察された。また、無逆転写物ではジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子及び16S-Ribozoom RNA配列双方とも前記遺伝子が増幅されなかったことから first-strand cDNA の合成に用いた DNase I 処理済みの全RNAへのゲノムDNAの混入が無いことが確認された。以上のことから、培地へのダイゼインの添加により、ジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子の mRNA の発現が誘導されることが示された。

20

【0419】

実施例 A 8 大腸菌を用いた組換えE1ポリペプチドの発現及びそのジヒドロダイゼイン合成活性の確認

30

大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムである pET システムを用いて E1 ポリペプチドを発現させ、そのジヒドロダイゼイン合成活性を確認した。

【0420】

(1) E1ポリペプチド発現ベクターの作製

E1ポリペプチド発現ベクター (pET21-E1-His) を作製する目的で PCR により、E1ヌクレオチドのオープン・リーディング・フレーム領域の DNA を増幅した。

【0421】

実施例 A 6 で決定した E1ヌクレオチド配列を基に下記の増幅プライマーを作製した。

exp.E1 pet F Nde : AGCTCATATGAAGAACAAGTTCTATCCGAA (配列番号 : 41)

exp. E1 pet His : AATCGAATTCCTACAGGTTGCAGCCAGCGATGT (配列番号 : 42)

40

上記増幅プライマー : exp.E1 pet F Nde、exp.E1 pet His には pET21a (Novagen) へ挿入するため、それぞれ制限酵素 NdeI 切断部位、EcoRI 切断部位配列を含ませている。

【0422】

上記プライマーを各 5pmol、dNTP 5nmol each、実施例 A 5 で精製したラクトコッカス 20-92 株のゲノム DNA 40ng、KOD-plus DNA polymerase 用 10× 緩衝液 (東洋紡績株式会社) 2.5μL、KOD-Plus DNA polymerase 0.3 ユニット (東洋紡績株式会社) を含む 25μL の反応液を用い、増幅プログラム : 95 3分、(94 30秒、60 30秒、68 2分) × 30 cycles、68 7分 で GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ) を用いて行った。PCR 反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、予想される大きさのバンドが検出できた。PCR 産物全量を QIAGEN PCR Purification kit (キアゲン) にて回

50

収した。

【0423】

回収したDNA断片を制限酵素NdeI及びEcoRIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分を取り出し、Qiagen Gel Extraction kit (キアゲン)により精製、回収した。得られたDNA断片はNdeI及びEcoRIで消化したpET21aとDNA Ligation Kit ver.2.1 (タカラバイオ株式会社)を用いて、16℃、終夜ライゲーションした後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109株 (タカラバイオ株式会社)を形質転換した。

【0424】

形質転換体をアンピシリン (50 µg/mL) を含むLB培地アガー (GIBCO)プレート上で37℃、終夜生育させ、コロニーを得た。得られたシングルコロニーはアンピシリン (50 µg/mL) を含むLB培地 (GIBCO) 3 mLで終夜培養した後、プラスミド自動抽出機PI-100 (KURABO)を用いてプラスミドDNAを抽出した。

【0425】

プラスミドに挿入したDNAの塩基配列をダイターミネーター法によりシーケンスを行い、目的どおり正しくE1ヌクレオチドが挿入されていることを確認し、pET21-E1-Hisを得た。本実施例におけるDNAシーケンスはDNAシーケンサーABI3700 (アプライド・バイオシステムズ)を用いて行った。

【0426】

(2) 大腸菌内での組換え体の作製ならびにE1ポリペプチドの発現および確認

組換えE1ポリペプチドを発現するプラスミドpET21-E1-His とpET21a(ネガティブコントロール)を用いて、大腸菌BL21 (DE3)株 (Novagen)を形質転換した。形質転換体はアンピシリン (50 µg/mL) を含むLB培地アガープレート上で37℃、終夜生育させ、シングルコロニーを得た。

【0427】

上記の大腸菌BL21 (DE3) 形質転換体それぞれをアンピシリン50 µg/mLを含む3mLの液体LB培地で終夜37℃において培養を行った。その培養液0.5mLを同濃度のアンピシリンを含む液体LB培地50mLに加え、3時間 (OD630nmが約0.4になるまで) 前培養し、終濃度が1mMになるようにIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) (和光純薬工業株式会社)を加え、さらに37℃で4時間培養を行った。

【0428】

培養終了後、菌体をAvanti HP25 (beckman coulter)で遠心分離 (6000rpm 4℃ 15分)により集菌した。以降の操作は氷上で行った。遠心上清 (培地)を除いた後、1mM PMSF、2mM DTT、5mM Sodium hydrosulfiteを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0 (KPB-PDH)1mLに懸濁し、あらかじめ0.7mL容のジルコニア-シリカビーズ (BioSpec Products, Inc.)及びKPB-PDH 400 µLを入れておいた2mL容アシストチューブへ入れ、FastPrep(R) (Thermo ELECTRON CORPORATION)を用いて6500rpm、20秒間処理-3分間氷冷を2回繰り返すことで、菌体を破碎し、菌体破碎液を得た。

【0429】

大腸菌内での組換えE1ポリペプチドの発現確認はSDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動 (SDS-PAGE)で行った。

【0430】

上記菌体破碎液10 µLに5×サンプル緩衝液 (125mM Tris-HCl (pH6.5)/25% グリセロール/5% SDS/5% 2-メルカプトエタノール/BPB 0.5%)を2.5 µL加え、98℃ 5分間加熱変性後、氷冷し、うち5 µLをSDS-PAGEで泳動した。SDS-PAGEには市販のゲル板 (SuperSep™5-20% (和光純薬工業株式会社))を使用し、染色はクイックCBB (和光純薬工業株式会社)で行った。分子量マーカーにはPrestained XL-Ladder Broad range (株式会社アプロサイエンス)を使用した。

【0431】

SDS-PAGEの結果を図7に示す。pET21-E1-His形質転換体由来の菌体破碎液で分子量約70 kDaの組換えE1ポリペプチドが確認された。

## 【0432】

## (3) 組換え体から得られたE1ポリペプチドのジヒドロダイゼイン合成活性の確認

本実施例内(2)で得た菌体破砕液を酵素源として、ダイゼインからジヒドロダイゼインへの変換活性を測定し、発現させた組換えE1ポリペプチドにその活性を確認した。

## 【0433】

本実施例でのダイゼインからジヒドロダイゼインへの変換活性の測定は以下の方法で行った。

## 【0434】

下記組成の酵素反応液を調製し、37℃で2時間インキュベートした。

酵素反応液組成

10

菌体破砕液(酵素源)	100 $\mu$ l
NADH(100 mM)	20 $\mu$ l
NADPH(100 mM)	20 $\mu$ l
ダイゼイン (2 mg / ml)	5 $\mu$ l
<u>KPB-PDH</u>	<u>855 <math>\mu</math>l</u>
	計 1000 $\mu$ l

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチルを添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層(溶離液)で溶解した。溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のダイゼイン及びジヒドロダイゼインの含量を測定した。

20

## 【0435】

HPLC分析の結果を図8に示す。組換えE1ポリペプチドを発現するプラスミドpET21-E1-Hisの形質転換体由来の菌破砕液では酵素反応液に加えたダイゼイン(基質)がジヒドロダイゼインへと変換されることが観察された。ネガティブコントロールであるpET21a形質転換体では酵素反応液中にジヒドロダイゼインは検出されなかった。

## 【0436】

以上のことから組換えE1ポリペプチドがダイゼインからのジヒドロダイゼイン合成活性を有することが示された。

30

## 【0437】

## (実施例B)

参考例B1 シス-テトラヒドロダイゼイン及びトランス-テトラヒドロダイゼインの合成

シス-テトラヒドロダイゼイン及びトランス-テトラヒドロダイゼインを、以下のフローに従って製造した。なお、以下、化合物の表記に関して、下記の略記を使用する。

化合物1(ダイゼイン): 4',7-ジヒドロキシイソフラボン

化合物2: 4',7-ジアセトキシイソフラボン

化合物3: 4',7-ジアセトキシイソフラバン-4-オン

化合物4: シス-4',7-ジアセトキシイソフラバン-4-オール

40

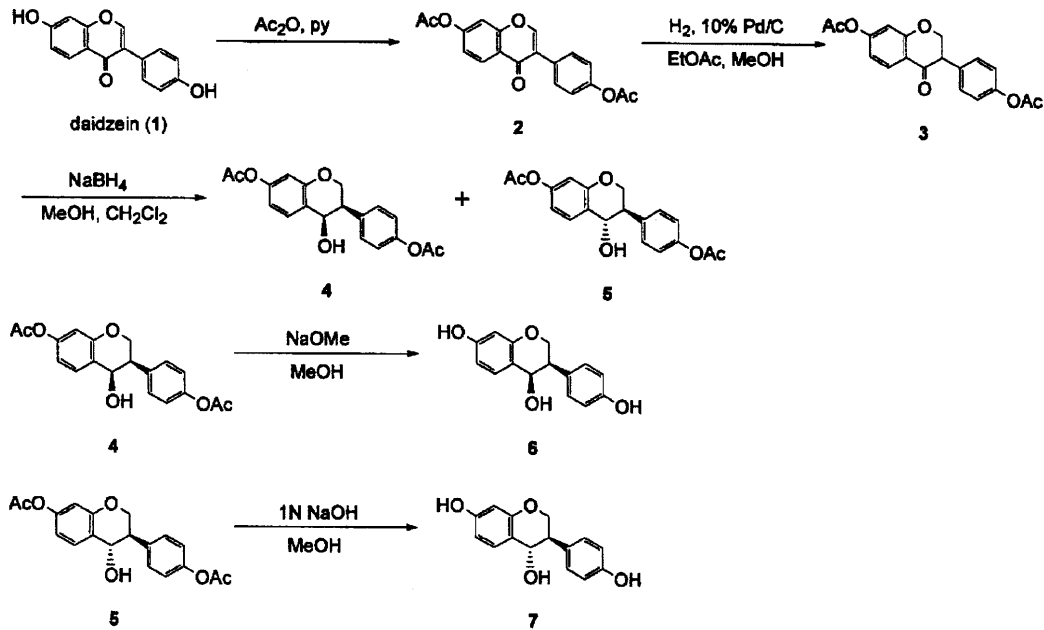
化合物5: トランス-4',7-ジアセトキシイソフラバン-4-オール

化合物6: シス-テトラヒドロダイゼイン

化合物7: トランス-テトラヒドロダイゼイン

## 【0438】

## 【化1】



10

## 【0439】

## 化合物2の合成

ダイゼイン（化合物1） 500 mg（1.97 mmol）のピリジン（5 mL）溶液に無水酢酸0.76 mL（8.0 mmol）を加え、60 °Cで2時間撹拌した。反応液に少量のメタノールを加えた後に、3N塩酸中に注いだ。水で希釈した後に析出した固体を濾取し、これを水洗した。得られた固体を室温にて風乾して白色粉末状の化合物2 609 mg（1.80 mmol、91%収率）を得た。

化合物2：<sup>1</sup>H NMR（250 MHz, CDCl<sub>3</sub>）（ppm）：2.33（3H, s）, 2.37（3H, s）, 7.13-7.22（3H, m）, 7.32（1H, d, J = 2.3 Hz）, 7.54-7.63（2H, m）, 8.01（1H, s）, 8.33（1H, d, J = 8.8 Hz）。

## 【0440】

## 化合物3の合成

化合物2 400 mg（1.18 mmol）及び10%パラジウム-炭素（含水晶、約50 wt%）150 mgのメタノール（6 mL）-酢酸エチル（6 mL）懸濁液を水素雰囲気下、室温で2時間撹拌した。反応液をセライト濾過し、残渣を酢酸エチルで洗浄した。濾液を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル：ジクロロメタン/酢酸エチル=100/0 - 19/1）で精製して、白色粉末状の化合物3 312 mg（0.917 mmol、78%収率）を得た。

化合物3：<sup>1</sup>H NMR（250 MHz, CDCl<sub>3</sub>）（ppm）：2.29（3H, s）, 2.32（3H, s）, 3.93-4.04（1H, m）, 4.60-4.75（2H, m）, 6.76-6.84（2H, m）, 7.04-7.13（2H, m）, 7.27-7.35（2H, m）, 7.93-8.01（1H, m）。

## 【0441】

## 化合物4及び化合物5の合成

化合物3 100 mg（0.294 mmol）のメタノール（1 mL）-ジクロロメタン（1 mL）溶液に0 °Cで水素化ホウ素ナトリウム11 mg（0.29 mmol）を加え、0 °Cで30分撹拌した。反応液に1N塩酸2 mL、水50 mLを順に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル：ジクロロメタン/酢酸エチル=19/1 - 3/1）で精製した。得られたジアステレオマー混合物を中圧カラムクロマトグラフィー（山善製ウルトラパックSI-40B：n-ヘキサン/酢酸エチル=3/2）で精製して、無色針状の化合物4 44 mg（0.13 mmol、44%収率）及び無色針状の化合物5 26 mg（75 μmol、26%収率）を得た。化合物4：<sup>1</sup>H NMR（250 MHz, CDCl<sub>3</sub>）（ppm）：1.80（1H, d, J = 4.0 Hz）

50

, 2.30 (3H, s), 2.31 (3H, s), 3.32 (1H, td,  $J = 3.5, 11.5$  Hz), 4.32 (1H, ddd,  $J = 1.3, 3.5, 10.5$  Hz), 4.59 (1H, dd,  $J = 10.5, 11.5$  Hz), 4.76-4.83 (1H, m), 6.64-6.73 (2H, m), 7.06-7.14 (2H, m), 7.27-7.35 (3H, m).

化合物5:  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (ppm): 2.02 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz), 2.29 (3H, s), 2.30 (3H, s), 3.11-3.24 (1H, m), 4.26 (1H, dd,  $J = 9.0, 11.3$  Hz), 4.37 (1H, dd,  $J = 3.8, 11.3$  Hz), 4.92 (1H, dd,  $J = 5.5, 7.8$  Hz), 6.62 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz), 6.72 (1H, dd,  $J = 2.3, 8.5$  Hz), 7.04-7.12 (2H, m), 7.21-7.30 (2H, m), 7.47 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz).

【0442】

#### 化合物6の合成

化合物4 116 mg (0.339 mmol) のメタノール (4 mL) 溶液にナトリウムメトキシド 55 mg (1.0 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応液にイオン交換樹脂 (ダウエックス50×8W、アンモニウムフォーム) を加えて中和した後に、樹脂を濾去した。濾液を濃縮して得られた固体をメタノールで洗浄して、白色粉末状の化合物6 62 mg (0.24 mmol、71%収率) を得た。

化合物6:  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) (ppm): 3.03 (1H, td,  $J = 3.3, 12.0$  Hz), 4.00-4.15 (1H, m), 4.31-4.51 (2H, m, including 4.39, dd,  $J = 10.3, 12.0$  Hz), 4.96 (1H, d,  $J = 5.8$  Hz), 6.18 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz), 6.32 (1H, dd,  $J = 2.3, 8.3$  Hz), 6.69 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.00 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.09 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 9.19 (1H, br s), 9.31 (1H, br s).

【0443】

#### 化合物7の合成

化合物5 84 mg (0.25 mmol) のメタノール (2 mL) 懸濁液に1N水酸化ナトリウム0.73 mL (0.73 mmol) を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して白色粉末状の化合物7 64 mg (0.25 mmol、定量的収率) を得た。

化合物7:  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) (ppm): 2.82-2.96 (1H, m), 4.04-4.22 (2H, m), 4.60 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz), 5.18 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz), 6.14 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz), 6.34 (1H, dd,  $J = 2.3, 8.5$  Hz), 6.67 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.04 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.16 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 9.21 (1H, s), 9.28 (1H, s).

【0444】

#### 参考例 B 2

ラクトコッカス 20 - 92 株 (FERM BP-10036号) を、ダイゼイン含有増殖用液体培地に接種し、嫌氣的条件下、37 °C で7から24時間培養した。培養後、遠心分離により集菌して冷凍保存し、以下の実施例に使用した。

【0445】

#### 実施例 B 1 テトラヒドロダイゼイン生成の確認

以下の試験を行い、テトラヒドロダイゼインがエクオール生合成の中間代謝物であることを確認した。

【0446】

#### (1) 菌破砕物の調製

-80 °C で保存したラクトコッカス 20 - 92 株菌体をすばやく融解、タッピングで懸濁し、8000rpm×5min、4 °C で遠心分離 VC 960 (タイテック株式会社 (製)) した。上清を取り除いた後に、0.1Mリン酸カリウム緩衝液 / 1mM PMSF (PhenylMethaneSulfonyl Fluoride) / 2mM DTT(dithiothreitol) / 5mM Sodium hydrosulfite (pH7.0) を加え、菌懸濁液を得た。次いで、予め、ジルコニア シリカビーズ [0.1mm 1 lb (和研薬株式会社 (製))] を約 0.8mL 容に入れておいた 2 mL チューブに菌懸濁液を入れ、更に 0.1Mリン酸カリウム緩衝液 / 1mM PMSF / 2mM DTT / 5mM Sodium hydrosulfite (pH7.0) を加え、チューブをほぼ一杯にした。次いで、チューブの蓋をして、氷冷しながら FastPrep™ FP100A (Thermo ELECTRON

10

20

30

40

50

CORPORATION(製)を用いて6500rpm×20秒-氷冷の操作を合計4回繰り返して、破碎処理を行った。斯くして得られた菌破碎物を酵素源として酵素反応を行った。

【0447】

(2)酵素反応

上記(1)の菌破碎物を0.1ml含む下記組成の酵素反応液1mlを調製し、37℃で2時間インキュベートした。インキュベート後、得られた酵素反応生成物に3mlの酢酸エチルを添加して抽出処理を行った後、乾固して、HPLC分析に供した。

【0448】

酵素反応液組成

0.1Mリン酸カリウム緩衝液 / 1mM PMSF / 2mM DTT / 5mM Sodium hydrosulfite (pH7.0) 10  
 2 mM NADPH  
 2 mM NADH  
 10 µg / mL ジヒドロダイゼイン又はテトラヒドロダイゼイン

【0449】

(3)酵素反応によるジヒドロダイゼインからのテトラヒドロダイゼインの生成

基質にジヒドロダイゼインを用いて、菌破碎物を酵素源にして得られた酵素反応生成物のHPLC分析の結果を図9に示す。また、上記参考例1で合成したテトラヒドロダイゼインのHPLC分析を図9に併せて示す。この結果から、基質にジヒドロダイゼインを用いて、菌破碎物を酵素源にして得られた酵素反応生成物には、トランス-テトラヒドロダイゼインの保持時間に一致する保持時間を有する中間体の存在が認められ、トランス-テトラヒドロダイゼインが生成していることが明らかとなった。 20

【0450】

(4)酵素反応によるテトラヒドロダイゼインからのエクオールの生成

基質にシス-テトラヒドロダイゼイン又はトランス-テトラヒドロダイゼインを用いて、菌破碎物を酵素源にして得られた酵素反応生成物のHPLC分析の結果を図10に示す。図10から明らかなように、いずれの化合物からもエクオールが生成され、テトラヒドロダイゼインはシス型及びトランス型を問わず、エクオール生合成過程において基質として利用されることが判明した。

【0451】

実施例 B 2 菌体破碎物の遠心上清中におけるテトラヒドロダイゼイン生合成活性の存在の確認、及びNADH又はNADPH依存性の確認 30

保存してある凍結菌体を融解後5000×G、4℃、15分間遠心分離し、沈渣を以下の試験に供した。沈渣(湿重量2.7g)を、1mM PMSF及び5mM Sodium hydrosulfiteを含有する0.1Mリン酸一カリウム溶液10mlに懸濁させ、37℃で5分間予温した後、Lysozymeを湿重量1g当たり100mg/wet weightとなるよう加え、37℃にて1.5時間反応させた。次いで、得られた反応液に、等量の0.1Mリン酸二カリウム溶液を加えた後、更にジルコニアシリカビーズ3ml量を加えVortex Mixerにて激しく攪拌し、更に超音波処理機(Branson Sonifier Cell Disruptor 200)にて菌体破碎した(5min処理2min休憩のサイクルを3回)。得られた菌体破碎液を約10,000×Gにて15分間遠心して遠心上清を得、これを酵素源とした。

【0452】 40

下記組成の酵素反応液を調製し、37℃で2時間インキュベートした。インキュベート後、得られた酵素反応生成物に5mlの酢酸エチルを添加して抽出処理を行った後、乾固して、HPLC分析に供した。

【0453】

酵素反応液組成

菌体破碎液遠心上清(酵素源)	250 $\mu$ l
NADH(100 mM)あるいは NADPH(100 mM)	20 $\mu$ l
ジヒドロダイゼイン (1 mg/ml)	10 $\mu$ l
<u>0.1M リン酸カリウム緩衝液 pH7/1mM DTT/5mM Sodiumhydrosulfite</u>	<u>720 <math>\mu</math>l</u>
	計 1000 $\mu$ l

## 【0454】

結果を図11に示す。この結果から、菌体破碎物の遠心上清にはテトラヒドロダイゼイン生合成活性が存在することが確認された。また、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインへの変換反応は、補酵素NADH又はNADPHに依存性を示すが、NADPHの方がはるかにその依存性が高いことが確認された。

10

## 【0455】

実施例 B 3 テトラヒドロダイゼイン合成酵素の精製

培養ボトル当たり67 mlのダイゼイン含有増殖用液体培地にて20時間培養したラクトコッカス20 92株菌体10本分を遠心後1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 及び4 mM DTT (Dithiothreitol) を含有する0.02 M リン酸カリウム緩衝液pH 7 (以下、「Buffer A」と表記する)に懸濁させ、フレンチプレス(SLM INSTRUMENTS INC)にて菌体を破碎し(1800 psiにて6回)、破碎液を遠心して上清液を得た。また、培養ボトル当たり200mlの液体培地にて18時間培養したラクトコッカス20 92株菌体5本分を同様にフレンチプレスに供して菌体破碎後遠心上清を得た。前者及び後者の遠心上清を、それぞれ38 ml及び47mlを混合し、その混合液の82 mlを、予めBuffer Aにて平衡化しておいたRed-Sepharose(約7 ml)に供した。次いで、150 mlのBuffer AにてRed-Sepharoseを洗浄した後、10 mMのNADPHを含むBuffer Aにて溶出した(20 ml/フラクション)。各フラクションを酵素源として用いて、実施例 B 2 に示す酵素反応条件(補酵素としてNADPHを使用)と同条件でテトラヒドロダイゼイン生合成活性について測定し、活性画分としてフラクションNo.1~5を得た。

20

## 【0456】

テトラヒドロダイゼイン生合成活性を有するフラクションNo.1~5をAmicon Ultra Centrifugal UFC801024 (MW Cut : 10,000)を用いて限外ろ過濃縮し、濃縮液約2.1 mlを得た。濃縮液は3分割しそれぞれ等量の3M硫酸を含むBuffer Aと混合した後、TSKgel Phenyl-5PW(東ソー株式会社)を用いたHPLCに供した。HPLCの条件を以下に示す。蛋白質の吸収として、280 nmの吸収を測定した。

30

## 【0457】

Column: TSKgel Phenyl-5PW

流速: 1 ml / min

フラクション: 2 ml/2 min/フラクション

溶離液 A: 0.02 M リン酸カリウム緩衝液pH 7/1mM DTT / 2.5 mM Sodiumhydrosulfite / 0.5% isoPrOH

溶離液 B: 1M 硫酸を含む溶離液A

40

溶出プログラム: 時間(min) (溶離液B) / (溶離液A + 溶離液B)

0	1
5	1
25	0
45	0

## 【0458】

このHPLCの結果、テトラヒドロダイゼイン合成活性を有するフラクションは、15番目以降(フラクションNo.15以降、保持時間 30分以降)に広範囲に認められたが、HPLCのフラクションNo.19~22を混合し、限外ろ過濃縮[Amicon Ultra Centrifugal UFC801024 (MW Cut : 10,000)]した。得られた濃縮液約130  $\mu$ lのうちの100  $\mu$ lを以下の条件下でTSKgel

50

G2000SWXL (東ソー株式会社) を用いたゲルろ過HPLCに供した。

【 0 4 5 9 】

Column: TSKgel G2000SWXL

流速: 0.6 ml/min

フラクション: 1.2 ml/2 min/フラクション

溶離液: 0.05 Mリン酸カリウム緩衝液pH 7/1mM DTT/2.5 mM Sodium hydrosulfite/1% isoPrOH/0.3M NaCl

【 0 4 6 0 】

ゲルろ過HPLCの結果を図 1 2 に示す。また、図 1 3 に還元条件下での各フラクションの SDS-PAGEの結果を示す。この結果、テトラヒドロダイゼイン合成活性を示す主フラクションであるフラクションNo.7に、還元条件下で28kDa及び32kDaのバンドが認められた。

10

【 0 4 6 1 】

実施例 B 4 テトラヒドロダイゼイン合成酵素のアミノ酸配列解析

上記実施例 3 で得られたテトラヒドロダイゼイン合成活性を有するフラクション (フラクションNo.7) をサンプルとしてMS分析を行った。具体的には、サンプルをSDS-PAGEにて分離し、バンドを切り出した。切り出したバンドをゲル内還元アルキル化し、トリプシンでゲル内消化した。次いで、トリプシン消化ペプチドを回収・精製し、LC-MSにて分析した。LC-MS分析により取得されたデータについてMS分析支援ソフトウェアであるPEAKS™ (インフォコム株式会社) を用いたde novo シーケンシングを行うことにより、ペプチドのアミノ酸配列を計算・推定した。詳細な方法等については、以下の通りである。

20

【 0 4 6 2 】

(1) 実験材料

本試験では、SuperSep HG 10/20% (和光純薬工業株式会社)、Flamingo gel staining kit (Bio-Rad)、TCEP (Tris[2-carboxyethyl]phosphine) (Pierce)、分子量マーカー (株式会社アプロサイエンス)、DTT (Calbiochem)、ヨードアセトアミド (和光純薬工業株式会社)、アセトニトリル (関東化学株式会社)、トリプシン (Promega)、TFA (Pierce)、Ammonium Bicarbonate (Sigma)、アンモニア水 (メルク株式会社)、ギ酸 (関東化学株式会社)、Empore Cation-SR Disk (住友スリーエム株式会社)、MonoCap濃縮カラム (GLサイエンス株式会社)、MonoCap for Nano Flow 0.1X150mm (GLサイエンス株式会社)、FortisTip (エーエムアール株式会社)、SpeedVac Concentrator (SAVANT)、HTS-PALオートサンプラー (CTC-Analytics)、Chorus220 (CTC-Analytics)、QSTAR Pulsar i (アプライドバイオシステムズ)、PEAKS™ソフトウェア (インフォコム株式会社) を使用した。

30

【 0 4 6 3 】

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

上記実施例 B 3 で得られた、テトラヒドロダイゼイン合成活性を有するフラクション (フラクションNo.7) 20 µl に100mM TCEPを 1 µl 加え、70 °Cにて10分還元処理を行った。サンプルをSuperSep HGに全量アプライし、定法に従いSDS-PAGEを行った。泳動後にFlamingo Gel staining kit (Bio-Rad) にて染色した (図 1 4 参照)。染色後に確認されたバンドLG1及びLG2をそれぞれ切り出し1mm角程度に裁断した。切り出したゲルを100mM Ammonium Bicarbonate溶液にて洗浄後、アセトニトリルで脱水し、SpeedVac Concentratorにて乾燥固化した。

40

【 0 4 6 4 】

(3) ゲル内トリプシン消化

乾燥したゲル片にDTT溶液 (1.54mg/ml in 100mM Ammonium Bicarbonate) を加え55 °Cにて45分間インキュベートし、還元処理を実施した。DTT溶液を捨て、ヨードアセトアミド溶液 (10.1mg/ml in 100mM Ammonium Bicarbonate) を加えて室温遮光条件下で30分間インキュベーションした。溶液を捨て、ゲル片を50%アセトニトリル溶液、100%アセトニトリル溶液、100mM Ammonium Bicarbonate溶液、100%アセトニトリル溶液で順次洗浄し、SpeedVac Concentratorにて乾燥固化した。乾燥したゲル片にトリプシン溶液 (12.5 µg/ml

50

in 50mM Ammonium Bicarbonate) を少量加え、氷上にて45分間浸透させた。浸透後に余分なトリプシン溶液を取り除き、ゲル片が浸る程度の50mM Ammonium Bicarbonate溶液を加え37℃にて16時間反応させた。

【0465】

(4) 質量分析によるアミノ酸配列解析

トリプシン消化ペプチドを回収し、Empore Cation-SR Diskをピペットチップに詰めた簡易カラムで前処理精製した。トリプシン消化ペプチドの回収は、0.1%TFA/90%アセトニトリル溶液にて洗浄回収した。簡易カラムの操作は、平衡化0.1%TFA/2%アセトニトリル溶液、サンプル吸着、カラム洗浄0.1%TFA/90%アセトニトリル溶液、サンプル溶出5%アンモニア/30%アセトニトリル溶液の順に行い、溶出させた消化ペプチドをSpeedVac Concentratorにて乾燥濃縮した。消化ペプチド溶液にTFAを加えpH3付近になるよう調整し、オートサンプラーHTS-PALにセットした。HTS-PALにセットしたサンプルを、LC-MS用インジェクターバルブにあるサンプル濃縮カラムにロードし、オンカラム洗浄を行った。濃縮カラムのサンプルを、nanoHPLC-Chorus220により分析カラムにて分離し、分析カラムにセットしたFortisTipにおいてイオン化し、QSTAR Pulsar iにて分析した。LC-MS分析条件は、次の通りである。

10

【0466】

LC部Chorus220 ; A溶媒 : 0.1%ギ酸 / 2%アセトニトリル、B溶媒 : 0.1%ギ酸 / 90%アセトニトリル、Flow rate=300nl/min, Gradient 5%A-65%B/20min, MS ; NanoESI Positive mode, Information dependent acquisition mode;(m/z=400 to 1400, Over25counts, Charge state=2 to 4) 4experiments/1cycle Experiment1;(TOF-MS, m/z=400 to 1400, Accumulation time=1sec), Experiment2to4;(Positive Product Ion, m/z=100 to 1400, Accumulation time=2sec)

20

【0467】

バンドLG1, LG2 (図14参照) それぞれについてLC-MSにて取得したデータをPEAKS™ソフトウェアにて、de novo シーケンシングを行うことにより、消化ペプチドのアミノ酸配列を推定した。

【0468】

実施例 B 5 ジヒドロダイゼイン合成 (E1) 酵素遺伝子の周辺ゲノムDNA配列の解析

(1) Inverse-PCR用ゲノムDNAライブラリーの作製

30

実施例 A 5 で精製したラクトコッカス 20 - 9 2 株 (FERM BP-10036号) のゲノムDNAを以下に示す制限酵素 (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SalI, Sau3AI, XhoI) (いずれもタカラバイオ株式会社) により37℃、16時間消化することで断片化し、フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて精製した。精製したゲノムDNA断片はTaKaRa Ligation kit var.2.1(タカラバイオ株式会社) を用いてセルフ-ライゲーションした。各ライゲーション溶液を滅菌水で10倍希釈することにより、Inverse-PCR用ゲノムDNAライブラリーを作製した。

【0469】

(2) Inverse-PCR

上記(1)に記載したInverse-PCR用ゲノムDNAライブラリー1μL (40ng相当) を鑄型に使用して、Inverse-PCRにより、E1ポリヌクレオチド周辺上流及び下流域のゲノムDNAの増幅を試みた。上流側領域増加のInverse-PCRにはPstI、XhoIで処理したものを、下流側領域増加のInverse-PCRにはHindIII、PstI、SacI、XhoIで処理したものをそれぞれ鑄型DNAとして使用した。Inverse-PCRにはTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社) を使用した。First-PCRは1×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free)、プライマー各0.5nM、dNTP 各0.5mM、MgCl<sub>2</sub>2.5mM、TaKaRa LA Taq 0.2U を含む20μLの反応液を用いて、ゲノムDNAライブラリー希釈液1μL (40ng) を鑄型に使用し、以下の増幅プログラム : 98℃ 1min、(95℃ 10sec、62℃ 10sec、68℃ 10min) ×35cycles、68℃ 15minで行った。更に、続いてNested-PCRをFirst-PCR産物0.5μLを鑄型に1×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free)、プライマー各0.5nM、dNTP 各0.5mM、MgCl<sub>2</sub>2.5mM、TaKaRa LA Taq 0.3U を含む30μLの反応液を用いて、以下の増幅

40

50

プログラム：98 1min、(95 10sec、62 10sec、68 10min) × 30cycles、68 15minで行った。

【0470】

(2-1) 使用プライマー

Inverse-PCRに用いたプライマーの組み合わせを以下に示す。

【0471】

(2-1-1) 上流側

First-PCR：RACE-N-P3-1とE1-Bub-N-P1

Nested-PCR：RACE-N-P3-2とE1-Bub-N-P2

【0472】

(2-1-2) 下流側

First-PCR：RACE-C-P3-1とE1-Bub-C-P1

Nested-PCR：RACE-C-P3-2とE1-Bub-C-P2

【0473】

(2-2) 使用プライマーの配列

上流側及び下流側のInverse-PCRそれぞれに用いたプライマーの配列を以下に示す。

上流側の増幅プライマー配列

RACE-N-P3-1: ATGGAGATAGTGCCGCTGGCAAGGCAACGGCAC (配列番号：43)

RACE-N-P3-2: TCAACGAAGACTCGATTTGAGCGAGAGGCGAGG (配列番号：44)

E1-Bub-N-P1: ACGGTGGAACCGGCATCGTGTTCATGGACAAC (配列番号：45)

E1-Bub-N-P2: GCGTGACCCAGTTCACCATGTCCGACTGTC (配列番号：46)

下流側の増幅プライマー配列

RACE-C-P3-1: GACATCCCGTTTCGAGCGCAGGATCACCCATGAG (配列番号：47)

RACE-C-P3-2: AGGATCACCCATGAGCGCATCGCTATCATGGAC (配列番号：48)

E1-Bub-C-P1: CATCGCTCTTGACAGTCGTTGTCCAGGAAGTCC (配列番号：49)

E1-Bub-C-P2: TTGTCCAGGAAGTCCATCGCGTACACGACGGAG (配列番号：50)

【0474】

尚、本実施例で増幅プライマーとして使用したオリゴDNAは全てシグマ・アルドリッチ・ジャパンにて合成した。

【0475】

(3) Inverse-PCRより増幅したジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子周辺ゲノムDNA断片の精製及び塩基配列決定

本実施例(2)で実施したNested-PCR産物に1/10量の10 × dayを加え、5 μLを0.8%のアガロースゲルで電気泳動し、上流側領域で0.5kb (PstI)、3.5kb (XhoI)のDNA断片の増幅を、下流側領域で1kb (HindIII)、1kb (SacI)、2.5kb (XhoI)のDNA断片の増幅を確認した。本実施例におけるアガロース電気泳動ではエチジウムブロミド(株式会社ニッポンジーン)による染色を行い、分子量マーカーには /Styl(株式会社ニッポンジーン)、10 Obp ladder(東洋紡株式会社)を使用した。増幅したDNA断片をアガロースゲルから切り出し、QIAGEN Gel-Extraction kit(キアゲン)を用いて精製した。精製したDNA断片は増幅に使用したプライマーを使用したダイレクトシーケンス、及びウォーキング法により、その塩基配列を決定した。

【0476】

(4) ゲノム配列の解析及びORF(Open Reading Frame)の予測

本実施例(3)で得られたDNA配列をシーケンス・アセンブルソフトウェアSEQUENCHER(Gene Codes Inc、USA)を使用してアセンブル解析を行い、さらにORFの予測を行った。その結果、E1酵素遺伝子を含めた周辺ゲノム領域6685bpの配列を決定した。解析結果から得られたジヒドロダイゼイン合成酵素遺伝子周辺のゲノム構造の略図を図15に示す。ORF予測の結果、E1酵素遺伝子の上流に3つ(うち一つはN末端未同定)、下流に1つのORFを見出した。見出したORFはジヒドロダイゼイン合成酵素から上流に向かってUpstream(US)1、US2、US3、下流に向かってDownstream(DS)1とした。

10

20

30

40

50

## 【 0 4 7 7 】

実施例 B 6 LC-MS分析による消化ペプチド配列とゲノム配列との照合

上記実施例 B 4 において得られた推定アミノ酸配列を上記実施例 B 5 で決定したジヒドロダイゼイン合成 (E1) 酵素遺伝子の周辺ゲノムDNA配列データと照合した。その結果、主にLG2より得られたいくつかの配列がORF-US2ヌクレオチド配列から推定されるポリペプチドの配列に一致した。以上のことからORF-US2ポリペプチドがテトラヒドロダイゼイン合成酵素である可能性が示唆された。以下にORF-US2ポリペプチドと一致した消化ペプチド配列を示す。また、図 1 6 - 1、1 6 - 2、1 6 - 3 にLC-MSにて取得したデータを示す。

## 【 0 4 7 8 】

10

## 【表 1】

m/z	z	Mass	Peptide	Score (%)
629.348	2	1256.682	TPGVAASVADEXK (配列番号51)	100.0
452.256	2	902.497	MPGAPVFGK (配列番号52)	99.8
487.847	2	973.680	KXXXTGTTK (配列番号53)	99.8
654.670	3	1960.988	VTQEXXCAHGAFVCGSGR (配列番号54)	99.6
644.348	2	1286.681	WXSPEESVGQR (配列番号55)	96.8
449.795	2	897.576	AQEVKVPK (配列番号56)	74.9

## 【 0 4 7 9 】

上記においてm/zは質量電荷比、zは電荷数、Massはペプチドの質量、Peptideは推定アミノ酸配列を記載した。ScoreはPEAKSソフトウェア上で算出される配列計算の確からしさをスコア値 (100%が最上値) で表している。尚、イソロイシン (I) とロイシン (L) は分子量が同じであり、区別不可であるため、前記ORF-US2ポリペプチドと一致した消化ペプチド配列においては双方共Xと表示している。

20

## 【 0 4 8 0 】

実施例 B 7 無細胞系タンパク質合成システムを用いたORF-US2ポリペプチドの合成及びそのテトラヒドロダイゼイン合成活性の確認

ORF-US2ポリペプチドを無細胞系タンパク質合成システム (PURESYSTEM Classic II mini (ポストゲノム研究所)) を用いて合成し、そのテトラヒドロダイゼイン合成活性を確認した。

30

## 【 0 4 8 1 】

( 1 ) 鋳型DNAの作製

2段階PCRにより、無細胞系タンパク質合成に用いたORF-US2ポリヌクレオチド鋳型DNAを作製した。

## 【 0 4 8 2 】

( 1 - 1 ) 使用プライマー

ORF-US2用鋳型DNA作製のためのPCRに使用したプライマーを以下に示す。E2-inviroTS-FP1 : ACTTTAAGAAGGAGATATACCAATGGCACAGGAAGTCAAAGTCC (配列番号 : 5 7 )

E2-inviroTS-RP : CTAGACCTCGATCTCGCCCTGCATGCCG (配列番号 : 5 8 )

Universal-Primer : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA (配列番号 : 5 9 )

40

E2-inviroTS-FP1及びE2-inviroTS-RPは実施例 B 5 で決定したORF-US2ヌクレオチド配列を基にシグマ アルドリッチ ジャパンにて合成した。また、Universal-PrimerはPURESYSTEM Classic II mini (ポストゲノム研究所) に付属されていたものを使用した。

## 【 0 4 8 3 】

( 1 - 2 ) 2 段階PCRによる鋳型DNAの作製

ORF-US2ポリペプチドの合成に用いた鋳型DNAはマニュアルに従い、2段階PCRで作製した。本実施例でのPCRにはDNA-ポリメラーゼにEasy-A (登録商標) High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (ストラタジーン)、PCR装置はGeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ) を用いた。

50

## 【0484】

1段階目PCRはラクトコッカス20-92株のゲノムDNAを鋳型に本実施例(1-1)に上記したプライマー：E2-inviroTS-FP1とE2-inviroTS-RPでORF-US2ヌクレオチドを増幅した。得られたPCR産物(ORF-US2ヌクレオチド)を鋳型にUniversal-PrimerとE2-inviroTS-RPで2段階目のPCRを行った。PCR産物300 $\mu$ L(50 $\mu$ L $\times$ 6本)はPCR-Purification kit(キアゲン)で精製し、鋳型DNA(ORF-US2ポリペプチド合成用鋳型DNA)としてORF-US2ポリペプチドの合成に用いた。1段階目及び2段階目のPCRは以下の条件で行った。

## 【0485】

1段階目：増幅プライマー各10pmol、dNTP各2.5pmol、ラクトコッカス20-92株由来ゲノムDNA 40ng、Easy-A用緩衝液(ストラタジーン)、Easy-A(登録商標)High-Fidelity PCR Cloning Enzyme 2U(ストラタジーン)を含む50 $\mu$ Lの反応液を用い、以下の増幅プログラム：95 2min(95 45sec、58 20sec、72 1min) $\times$ 30cycles、72 3minで行った。

10

## 【0486】

2段階目：増幅プライマー各10pmol、dNTP各2.5pmol、1段階目のPCR反応液0.5 $\mu$ L、Easy-A用緩衝液、Easy-A(登録商標)High-Fidelity PCR Cloning Enzyme 2Uを含む50 $\mu$ Lの反応液を用い、以下の増幅プログラム：95 2min(95 45sec、45 20sec、72 1min) $\times$ 5cycles、(95 45sec、60 20sec、72 1min) $\times$ 25cycles 72 3minで行った。

## 【0487】

(2) ORF-US2ポリペプチドの無細胞系タンパク質合成及びそのテトラヒドロダイゼイン合成活性の確認

20

-80 $^{\circ}$ C保存しておいたPURESYSTEM Classic II miniのA液25 $\mu$ LとB液10 $\mu$ Lを氷上で融解後、混合し、そこへ2段階PCRで作製したORF-US2ポリペプチド合成用鋳型DNA(開始コドンの5'側上流にT7プロモーター配列及びリボソーム結合配列を有する)を0.6 $\mu$ g(60ng/ $\mu$ Lを10 $\mu$ L)に加え、さらに滅菌水を加えて計50 $\mu$ Lにして37 $^{\circ}$ C、90分間インキュベーションすることで目的のポリペプチドを合成した。このシステムを用いたタンパク質合成のポジティブコントロールにはPURESYSTEM Classic II miniに付属のジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)合成用鋳型DNAを0.5 $\mu$ g(0.2 $\mu$ g/ $\mu$ Lを2 $\mu$ L)用いた。ネガティブコントロールには鋳型となるDNAは添加せず、滅菌水のみを使用した。活性測定は前記反応液40 $\mu$ Lを以下の組成の酵素反応用バッファーに加え、37 $^{\circ}$ C、6時間インキュベーションし、反応終了後、酵素反応液を3mLの酢酸エチルで抽出、乾固し、泳動バッファーで溶解してHPLC分析により、酵素反応液中のテトラヒドロダイゼインを測定した。

30

## 【0488】

酵素反応用バッファー組成

- 0.1Mリン酸カリウム緩衝液 / 1mM PMSF / 2mM DTT / 5mM Sodium hydrosulfite (pH7.0)
- 2 mM NADPH
- 2 mM NADH
- 10 $\mu$ g/mL ジヒドロダイゼイン

なお、前記ヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)合成用鋳型DNAを用いた場合には、当該DNAを基にしてタンパク質が良好に発現されたが、鋳型となるDNAを添加しない場合には、タンパク質は発現されなかった。このことから、当該実験は適切に行われているものと判断される。

40

## 【0489】

結果を図17に示す。ORF-US2ポリペプチドを発現させた反応液では反応6時後のサンプルで約6.7分の位置にテトラヒドロダイゼインのピークが見られた。しかしながら、タンパク質合成なし(NC)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ発現(DHFR)反応液ではテトラヒドロダイゼインのピークは認められなかった。また、ORF-US2ポリペプチドを発現させた反応液ではテトラヒドロダイゼインの生合成に伴うジヒドロダイゼイン(基質)の減少が見られたがタンパク質合成なし(NC)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ発現(DHFR)反応液ではそのジヒドロダイゼインの減少は認められなかった。以上のことからORF-US2ポリペプチドがジ

50

ヒドロダイゼインからのテトラヒドロダイゼイン生合活性を有することが示された。すなわち、ORF-US2ポリペプチドは、前記E2ポリペプチドに相当するといえる。

【0490】

実施例 B 8 大腸菌を用いた組換えORF-US2ポリペプチドの発現及びそのテトラヒドロダイゼイン合成活性の確認

大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムであるpETシステムを用いてORF-US2ポリペプチドを発現させ、そのテトラヒドロダイゼイン合成活性を確認した。

【0491】

(1) ORF-US2ポリペプチド発現ベクターの作製

ORF-US2ポリペプチド発現ベクター (pET21-US2) を作製する目的でPCRにより、ORF-US2ポリペプチドのオープン・リーディング・フレーム領域のDNAを増幅した。 10

実施例 B 5 で決定したORF-US2ポリペプチド配列を基に下記の増幅プライマーを作製した。

exp.US2 pet F Nde : TATACATATGGCACAGGAAGTCAAAGTC (配列番号 : 60)

exp. US2 pet : AATCGAATTCCTAGACCTCGATCTCGCCCTGC (配列番号 : 61)

【0492】

上記増幅プライマー : exp.US2 pet F Nde、exp.US2 petにはpET21a (Novagen)へ挿入するため、それぞれ制限酵素NdeI切断部位、EcoRI切断部位配列を含ませている。

【0493】

上記プライマーを各5pmol、dNTP 5nmol each、ラクトコッカス20-92株のゲノムDNA 40ng、KOD-plus DNA polymerase用10×緩衝液 (東洋紡) 2.5µL、KOD-Plus DNA polymerase 0.3ユニット (東洋紡) を含む25µLの反応液を用い、増幅プログラム : 95 3分、(94 30秒、60 30秒、68 1分) × 30cycles、68 7分でGeneAmpPCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ) を用いてPCR反応を行った。PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、予想される大きさのバンドが検出できた。PCR産物全量をQIAGEN PCR Purification kit (キアゲン) にて回収した。 20

【0494】

回収したDNA断片を制限酵素NdeI及びEcoRIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分を取り出し、Qiagen Gel Extraction kit (キアゲン) により精製、回収した。得られたDNA断片はNdeI及びEcoRIで消化したpET21aとDNA Ligation Kit version 2.1 (タカラバイオ) を用いて、16℃、終夜ライゲーションした後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109株 (タカラバイオ) を形質転換した。 30

【0495】

形質転換体はアンピシリン (50µg/mL) を含むLB培地アガー (GIBCO) プレート上で37℃、終夜生育させ、コロニーを得た。得られたシングルコロニーはアンピシリン (50µg/mL) を含むLB培地 (GIBCO) 3mLで終夜培養した後、プラスミド自動抽出機PI-100 (KURABO) を用いてプラスミドDNAを抽出した。

【0496】

プラスミドに挿入したDNAの塩基配列をダイターミネーター法によりシーケンスを行い、目的どおり正しくORF-US2ポリヌクレオチドが挿入されていることを確認した。本実施例におけるDNAシーケンスはDNAシーケンサーABI3700 (アプライド・バイオシステムズ) を用いて行った。 40

【0497】

(2) 大腸菌内での組換えORF-US2ポリペプチドの発現および確認

組換えORF-US2ポリペプチドを発現するプラスミドpET21-US2 とpET21a (ネガティブコントロール) を用いて、大腸菌BL21 (DE3) 株 (Novagen) を形質転換した。形質転換体はアンピシリン (50µg/mL) を含むLB培地アガープレート上で37℃、終夜生育させ、シングルコロニーを得た。

【0498】

上記の大腸菌BL21 (DE3) 形質転換体それぞれをアンピシリン50µg/mLを含む3mLの液 50

体LB培地で終夜37 °Cにおいて培養を行った。その培養液0.5mLを同濃度のアンピシリンを含む液体LB培地50mLに加え、3時間(OD630nmが約0.4になるまで)前培養し、終濃度が1mMになるようにIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)(和光純薬工業株式会社)を加え、さらに37 °Cで4時間培養を行った。

【0499】

培養終了後、菌体をAvanti HP25(Beckman Coulter)で遠心分離(6000rpm 4 °C 15分)により集菌した。以降の操作は氷上で行った。遠心上清(培地)を除いた後、1mM PMSF、2mM DTT、5mM Sodium hydrosulfiteを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0(KPB-PDH)1mLに懸濁し、あらかじめ0.7mL容のジルコニア-シリカビーズ(BioSpec Products, Inc.)及びKPB-PDH 400 µLを入れておいた2mL容アシストチューブへ入れ、FastPrep(R)(Thermo ELECTRON CORPORATION)を用いて6500rpm、20秒間処理-3分間氷冷を2回繰り返すことで、菌体を破砕し、菌体破砕液を得た。

【0500】

大腸菌内での組換えORF-US2ポリペプチドの発現確認はSDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動(SDS-PAGE)で行った。

【0501】

上記菌体破砕液20 µLに5×サンプル緩衝液(125mM Tris-HCl(pH6.5)/25%グリセロール/5% SDS/5% 2-メルカプトエタノール/BPB 0.5%)を5 µL加え、98 °C 5分間加熱変性後、氷冷し、うち10 µLをSDS-PAGEで泳動した。SDS-PAGEには市販のゲル板(SuperSep™ 5-20% (和光純薬工業株式会社))を使用し、染色はクイックCBB(和光純薬工業株式会社)で行った。分子量マーカーにはPrestained XL-Ladder Broad range(株式会社アプロサイエンス)を使用した。

【0502】

SDS-PAGEの結果を図18に示す。pET21-US2形質転換体由来の菌体破砕液で分子量約29kDaの組換えポリペプチドが確認された。

【0503】

(3) 組換えORF-US2ポリペプチドのジヒドロダイゼイン合成活性の確認

本実施例内(2)で得た菌体破砕液を酵素源として、ジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインへの変換活性を測定し、発現させた組換えORF-US2ポリペプチドにその活性を確認した。

【0504】

本実施例でのジヒドロダイゼインからテトラヒドロダイゼインへの変換活性の測定は以下の方法で行った。

【0505】

下記組成の酵素反応液を調製し、0 °Cで2時間インキュベートした。

酵素反応液組成

菌体破砕液(酵素源)	100 µl
NADH(100 mM)	20 µl
NADPH(100 mM)	20 µl
ジヒドロダイゼイン (2 mg / ml)	5 µl
KPB-PDH	855 µl
計	1000 µl

【0506】

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチルを添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層(溶離液)で溶解した。溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のジヒドロダイゼイン及びシス-、トランス-テトラヒドロダイゼインの含量を測定した。

【0507】

HPLC分析の結果を図19に示す。組換えORF-US2ポリペプチドを発現するプラスミドpET21-US2の形質転換体由来の菌破砕液では酵素反応液に加えたジヒドロダイゼイン(基質)

がシス-テトラヒドロダイゼイン (c - THD) 及びトランス-テトラヒドロダイゼイン (t - THD) へと変換されることが観察された。ネガティブコントロールであるpET21a形質転換体では酵素反応液中にテトラヒドロダイゼインは検出されなかった。

【0508】

以上のことから組換えORF-US2ポリペプチドがジヒドロダイゼインからのテトラヒドロダイゼイン合成活性を有することが示された。すなわち、組換えORF-US2ポリペプチドは前記E2ポリペプチドに相当するといえる。

【0509】

#### 実施例 C

##### 実施例 C 1 菌体のテトラヒドロダイゼインからのエクオール生合成活性の確認

ラクトコッカス20-92株 (FERM BP-10036号) を、テトラヒドロダイゼイン含有増殖用液体培地 (シス-もしくはトランス-テトラヒドロダイゼイン (自社で有機合成: 参考例 B 1 参照) を  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  となる量に加えた変法GAMブイヨン培地 (日水製薬株式会社)) に接種し、嫌氣的条件下 (BBL Gas Pack systemsを使用) 37 °C で18時間培養した。培養終了後、直ちに培養液 1 mL を蓋付ガラス製遠沈管に分取し、3 mL の酢酸エチルを添加して抽出処理を行った後、乾固し、HPLC分析を行った。HPLC分析の標準溶液にはダイゼイン (フナコシ株式会社)、エクオール (フナコシ株式会社)、ジヒドロダイゼイン (トレンドリサーチケミカル社) シス-テトラヒドロダイゼイン、トランス-テトラヒドロダイゼイン (共に自社で化学合成) の混合溶液 (各  $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) を用いた。

【0510】

結果を図 20 に示す。図 20 から明らかなようにラクトコッカス20-92株はシス-及びトランス-テトラヒドロダイゼイン双方からエクオールを生合成する活性を有することが確認された (図 20 中、下)。尚、図中ではダイゼインはDZN、ジヒドロダイゼインはDD、シス-テトラヒドロダイゼインはc-THD、トランス-テトラヒドロダイゼインはt-THD、エクオールはEQLの略語で示している。

【0511】

##### 実施例 C 2 大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムを用いたエクオール合成酵素の探索及びその同定

大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムであるpETシステム (Novagen) を用いて、実施例 B 5 において決定したジヒドロダイゼイン合成 (E1) 酵素遺伝子周辺ゲノムDNA配列上に同定した3つのORFポリヌクレオチド (ORF-US3, US1, DS1) に対応するポリペプチドを大腸菌内でそれぞれ発現させ、そのテトラヒドロダイゼインからのエクオールへの変換を触媒する活性を調べることにより、エクオール合成 (E3) 酵素の探索を行った。

【0512】

##### (1) ORFポリペプチド発現ベクターの作製

各ORFポリペプチド (ORF-US3, US1, DS1) の発現ベクターを作製する目的でPCRにより、それぞれのオープン・リーディング・フレーム領域のポリヌクレオチドを増幅し、pET21 a ベクター (Novagen) に挿入した。

【0513】

##### (1-1) 増幅プライマー

実施例 B 5 で決定したジヒドロダイゼイン合成酵素 (E1) 周辺ゲノム配列を基に下記の増幅プライマーを作製した。

##### ORF-US3ポリペプチド

exp.US3 F : TATACATATGGCAGAATTCGATGTTGAG (配列番号: 62)

exp.US3 R : CCGCAAGCTTCTACATAGTGAGATCGCGTGG (配列番号: 63)

##### ORF-US1ポリペプチド

exp.US1 F : TATACATATGTTCAAGGGTCCACAGGGC (配列番号: 64)

exp.US1 R : GCTCGAATTCTTAGTGCTGCTGTGCCTTTTTCAG (配列番号: 65)

##### ORF-DS1ポリペプチド

50

exp.DS1 F : ATATACATATGCAGGATATGGACTTCATGG (配列番号 : 66)

exp.DS1 R : GCTCGAATTCTCATAGTGACATCAGCGCTCCC (配列番号 : 67)

【0514】

上記増幅プライマー : exp.US3 F、exp.US1 F、exp.DS1 FにはpET21a (Novagen)へ挿入するため、制限酵素NdeI切断部位配列を、exp.US3 RにはHindIII切断部位配列を、exp.US1 R、exp.DS1 RにはEcoRI切断部位配列を含ませている。

【0515】

(1-2) 各ORFポリヌクレオチドの増幅

上記した増幅プライマーを各5pmol、dNTP 5nmol each、実施例A5において精製したラクトコッカス20-92株のゲノムDNA 40ng、KOD-plus DNA polymerase用10x緩衝液(東洋紡績株式会社)2.5μL、KOD-Plus DNA polymerase 0.3ユニット(東洋紡績株式会社)を含む25μLの反応液を用い、増幅プログラム:95 3分、(94 30秒、60 30秒、68 2分)×30cycles、68 7分でGeneAmpPCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ)を用いてPCRを行った。PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動した結果、それぞれに予想される大きさのバンドが検出できた。PCR産物全量をQIAGEN PCR Purification kit(キアゲン)にて回収した。

【0516】

(1-3) ORFポリペプチド発現ベクターの作製

(1-2)で回収したORF-US3ポリヌクレオチド断片を制限酵素NdeI及びHindIIIで、ORF-US1及びORF-DS1ポリヌクレオチド断片をNdeI及びEcoRIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分を取り出し、Qiagen Gel Extraction kit(キアゲン)により精製、回収した。得られたポリヌクレオチド断片はDNA Ligation Kit ver.2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて、NdeI及びHindIIIもしくはEcoRIで消化したpET21aと16、終夜でライゲーションした後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109株(タカラバイオ株式会社)を定法で形質転換した。斯くして得た形質転換体を、アンピシリン(50μg/mL)を含むLB培地アガー(GIBCO)プレート上で37、終夜生育させ、コロニーを形成させた。得られたシングルコロニーを、アンピシリン(50μg/mL)を含むLB培地(GIBCO)3mLで終夜培養した後、プラスミド自動抽出機PI-100(KURABO)を用いてプラスミドDNAを抽出した。

【0517】

プラスミドに挿入したDNAの塩基配列をダイターミネーター法によりシーケンスを行い、目的どおり正しく各ポリヌクレオチドが挿入されていることを確認し、pET-US3、pET-US1、pET-DS1を得た。本実施例におけるDNAシーケンスはDNAシーケンサーABI3700(アプライド・バイオシステムズ)を用いて行った。

【0518】

(2) 大腸菌内で各組換えポリペプチドの発現

(2-1) 大腸菌BL21形質転換体の作製

組換えORFポリペプチドを発現するプラスミドpET-US3、pET-US1、pET-DS1とpET21a(ネガティブコントロール)を用いて、大腸菌BL21(DE3)株(Novagen)を定法で形質転換した。形質転換体はアンピシリン(50μg/mL)を含むLB培地アガープレート上で37、終夜生育させ、シングルコロニーを得た。

【0519】

(2-2) 組換えポリペプチドの発現誘導

上記の大腸菌BL21(DE3)形質転換体それぞれをアンピシリン(50μg/mL)を含む3mLの液体LB培地で終夜37において培養を行った。その培養液0.5mLを同濃度のアンピシリンを含む液体LB培地50mLに加え、3時間(OD630nmが約0.4-0.7になるまで)前培養し、終濃度が1mMになるようにIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)(和光純薬工業株式会社)を加え、さらに37で4時間培養し、大腸菌内での組換えポリペプチドの発現誘導を行った。

【0520】

10

20

30

40

50

( 2 - 3 ) 菌体破砕液の調製

上記(2-2)での発現誘導終了後、菌体をAvanti HP25(Beckman Coulter)で遠心分離(600 rpm 4 15分)により集菌した。以降の操作は氷上で行った。遠心上静(培地)を除いた後、1mM PMSF、2mM DTT、5mM Sodium hydrosulfiteを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH 7.0(以後KPB-PDHと略す)1mLに懸濁し、あらかじめ0.7mL容のジルコニア-シリカビーズ(BioSpec Products, Inc.)及びKPB-PDH 400 µLを入れておいた2mL容アシストチューブへ入れ、FastPrep(R)(Thermo ELECTRON CORPORATION)を用いて6500rpm、20秒間処理-3分間氷冷を2回繰り返すことで、菌体を破砕し、菌体破砕液を得た。

## 【 0 5 2 1 】

( 2 - 4 ) SDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動 ( SDS-PAGE ) による組換えポリペプチドの発現確認

大腸菌内での各組換えORFポリペプチドの発現確認はSDS-PAGEで行った。(2-3)に記した菌体破砕液20 µLに5×サンプル緩衝液(125mM Tris-HCl (pH6.5)/ 25% グリセロール/5% SDS/5% 2-メルカプトエタノール/BPB 0.5%)を5 µL加え、98 5分間加熱変性後、氷冷し、うち4 µLをSDS-PAGEで泳動した。SDS PAGEには市販のゲル板(SuperSep™5-20%(和光純薬工業株式会社))を使用し、染色はクイックCBB(和光純薬工業株式会社)で行った。分子量マーカにはPrestained XL-Ladder Broad range(株式会社アプロサイエンス)を使用した。SDS-PAGEの結果を図2-1に示す。pET-US3、pET-DS1形質転換体由来の菌体破砕液それぞれにおいて分子量約52kDa、50kDaの組換えORF-US3及びORF-DS1ポリペプチドの発現が確認された。pET-US1形質転換体由来の菌体破砕液では組換えORF-US1ポリペプチドの発現は確認できなかった。

## 【 0 5 2 2 】

実施例 C 3 組換えORFポリペプチドのエクオール合成活性の測定

実施例 C 2 で得た各形質転換体菌破砕液を酵素源として、テトラヒドロダイゼインからエクオールへの変換活性を測定した。本実施例でのテトラヒドロダイゼインからエクオールへの変換活性の測定は以下の方法で行った。

## 【 0 5 2 3 】

下記組成の酵素反応液を調製し、37 °C で1時間インキュベートした。

酵素反応液組成

菌体破砕液(酵素源)	100 µl
NADH(100 mM)	20 µl
NADPH(100 mM)	20 µl
シス-テトラヒドロダイゼイン (2 mg / ml)	5 µl
トランス-テトラヒドロダイゼイン (2 mg / ml)	5 µl
<b>KPB-PDH</b>	<b>850 µl</b>
	計 1000 µl

## 【 0 5 2 4 】

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチルを添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層(溶離液)で溶解した。溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のジヒドロダイゼイン、シス-テトラヒドロダイゼイン、トランス-テトラヒドロダイゼイン、エクオールの含量を測定した。HPLC分析での標準溶液にはダイゼイン(フナコシ株式会社)、エクオール(フナコシ株式会社)、ジヒドロダイゼイン(トレンドリサーチケミカル社)シス-テトラヒドロダイゼイン、トランス-テトラヒドロダイゼイン(共に自社で化学合成)の混合溶液(各2 µg / mL)を用いた。

## 【 0 5 2 5 】

HPLC分析の結果、組換えORF-US3ポリペプチドを発現するプラスミドpET-US3の形質転換体由来の菌破砕液では酵素反応液に加えたテトラヒドロダイゼインはエクオールに変換されることが観察された(図2-2)。またエクオール生合成経路においてテトラヒドロダイ

10

20

30

40

50

ゼインの前駆物質であるジヒドロダイゼインへの変換活性も併せ持つことが確認された(図22)。pET-US1、pET-DS1形質転換体及びネガティブコントロールであるpET21a形質転換体では酵素反応液中にテトラヒドロダイゼイン以外は検出されなかった。尚、図中ではダイゼインはDZN、ジヒドロダイゼインはDD、シス-テトラヒドロダイゼインはc-THD、トランス-テトラヒドロダイゼインはt-THD、エクオールはEQLの略語で示している。

#### 【0526】

以上のことからORF-US3ポリペプチドがテトラヒドロダイゼインからのエクオール生合活性を有することが示された。すなわち、ORF-US3ポリペプチドは、前記E3ポリペプチドに相当するといえる。

#### 【0527】

#### 実施例 D

#### 実施例 D 1 大腸菌を用いた組換えHis-タグ付きエクオール産生関連酵素の発現及び精製

大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムであるpET システム (Novagen) を用いて、His-タグ付きエクオール産生関連酵素[ジヒドロダイゼイン合成酵素(E1), テトラヒドロダイゼイン合成酵素(E2), エクオール合成酵素(E3)]を発現させ、His-タグ付きタンパク質精製用(Ni)カラムを用いてアフィニティー精製を行った。

#### 【0528】

##### (1) His-タグ付き酵素発現ベクターの作製

各酵素(E1, E2, E3)の発現ベクターを作製する目的でPCRにより、それぞれのオープン・リーディング・フレーム領域のポリヌクレオチドを増幅し、pET21aベクター(Novagen)に挿入した。

#### 【0529】

##### (1-1) 増幅プライマー

実施例 B 5 で決定したジヒドロダイゼイン合成酵素(E1)周辺ゲノム配列を基に下記の増幅プライマーを作製した。

##### His-タグ付きE1酵素

exp.E1 pet F Nde : AGCTCATATGAAGAACAAGTTCTATCCGAA (配列番号 : 41)

exp.E1 pet His : AATCGAATTCGTACAGGTTGCAGCCAGCGATGT (配列番号 : 42)

##### His-タグ付きE2酵素

exp.US2 pet F Nde : TATACATATGGCACAGGAAGTCAAAGTC (配列番号 : 60)

exp.E2 pet His : AATCGAATTCGAGACCTCGATCTCGCCCTGC (配列番号 : 68)

##### His-タグ付きE3酵素

exp.US3 F : TATACATATGGCAGAATTCGATGTTGAG (配列番号 : 62)

exp.E3 R His : CCGCAAGCTTGTACATAGTGGAGATCGCGTGG (配列番号 : 69)

上記増幅プライマー : exp.E1 pet F Nde、exp.US2 pet F、exp.US3 FにはpET21a (Novagen)へ挿入するため、制限酵素NdeI切断部位配列を、exp.E1 pet His、exp.E2 pet HisにはEcoRI切断部位配列をexp.E3 R HisにはHindIII切断部位配列を含ませている。

#### 【0530】

##### (1-2) 各His-タグ付き酵素ポリヌクレオチドの増幅

上記した増幅プライマーを各5pmolとdNTPを各5nmolと実施例 A 5において精製したラクトコッカス20-92株(FERM BP-10036号)のゲノムDNA 40ng、KOD-plus DNA polymerase用10×緩衝液(東洋紡績株式会社)2.5µL、KOD-Plus DNA polymerase 0.3ユニット(東洋紡績株式会社)を含む25µLの反応液を用い、増幅プログラム : 95 3分、(94 30秒、60 30秒、68 2分)×30cycles、68 7分でGeneAmpPCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ)を用いてPCRを行った。PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動した結果、それぞれに予想される大きさのバンドが検出できた。PCR産物全量をQIAGEN PCR Purification kit(キアゲン)にて回収した。

#### 【0531】

##### (1-3) His-タグ付き酵素ポリペプチド発現ベクターの作製

(1-2)で回収した各His-タグ付き酵素ポリヌクレオチド断片を制限酵素NdeI及びEcoRIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分の部分を切り出し、Qiagen Gel Extraction kit (キアゲン)により精製、回収した。得られたポリヌクレオチド断片はDNA Ligation Kit ver.2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて、NdeI及びEcoRIで消化したpET21aと16、終夜でライゲーションした後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109株(タカラバイオ株式会社)を定法で形質転換した。斯くして得た形質転換体を、アンピシリン(50 µg/mL)を含むLB培地アガー(GIBCO)プレート上で37、終夜生育させ、コロニーを形成させた。得られたシングルコロニーを、アンピシリン(50 µg/mL)を含むLB培地(GIBCO)3 mLで終夜培養した後、プラスミド自動抽出機PI-100(KURABO)を用いてプラスミドDNAを抽出した。

10

## 【0532】

プラスミドに挿入したDNAの塩基配列をダイターミネーター法によりシーケンスを行い、目的どおり正しく各ポリヌクレオチドが挿入されていることを確認し、pET-E1-His、pET-E2-His、pET-E3-Hisを得た。本実施例におけるDNAシーケンスはDNAシーケンサーABI3700(アプライド・バイオシステムズ)を用いて行った。

## 【0533】

(2)大腸菌内での各組換えHis-タグ付き酵素ポリペプチドの発現及びアフィニティー精製

(2-1)大腸菌BL21形質転換体の作製

His-タグ付き酵素ポリペプチドを発現するプラスミドpET-E1-His、pET-E2-His、pET-E3-Hisを用いて、大腸菌BL21(DE3)株(Novagen)を定法で形質転換した。形質転換体はアンピシリン(50 µg/mL)を含むLB培地アガープレート上で37、終夜生育させ、シングルコロニーを得た。

20

## 【0534】

(2-2)組換えHis-タグ付きE1及びE2酵素ポリペプチドの精製

(2-2-1)大腸菌培養及び組換えHis-タグ付きE1及びE2酵素ポリペプチドの発現誘導

上記pET-E1-His又はpET-E2-Hisによる大腸菌BL21(DE3)形質転換体それぞれをアンピシリン(50 µg/mL)を含む10mLの液体LB培地で終夜37において培養を行った。その培養液7.5mLを同濃度のアンピシリンを含む液体LB培地150mLに加え、37で2時間(OD600nmが約0.5になるまで)前培養し、終濃度が0.5mMになるようにIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)(和光純薬工業株式会社)を加え、さらに弱い振とう条件下で30、4時間培養し、大腸菌内での組換えHis-タグ付きE1及びE2酵素ポリペプチドの発現誘導を行った。

30

## 【0535】

(2-2-2)菌ライゼートの調製

上記(2-2)での発現誘導終了後、菌体をAvanti HP25(Beckman Coulter)で遠心分離(600rpm 4 10分)により集菌し、組換えHis-タグ付きE1及びE2酵素ポリペプチド発現大腸菌をそれぞれ湿重量にして0.66g及び0.73gを得た。得た菌体はBugbuster protein Extraction solution(Novagen)が菌体湿重量1gあたり15mLになるように加え、ピペットで穏やかに懸濁し、更にLysozyme(SIGMA)を2000units/mL、Benzonase(Novagen)を25units(1 µL)/mLになるように加えた。その後、ローテーター(RT-50:タイテック)を用いて30分間室温でゆっくり攪拌し、菌ライゼートAを得た。更に菌ライゼートAをAvanti HP25(Beckman Coulter)で遠心分離(8000rpm 4 15分)により、その上清である菌ライゼートBを得た。

40

## 【0536】

(2-2-3)組換えHisタグ付きE1及びE2酵素ポリペプチドのアフィニティー精製

His-タグ付きタンパク質精製用カラムにはHis GraviTrap(GEヘルスケアバイオサイエンス)を用い、取り扱い説明書に記載されている手順に従い、一部変更した方法でHis-タグ付きE1及びE2酵素ポリペプチドのアフィニティー精製を行った。即ち、His GraviTrapを

50

氷冷した10mLの結合バッファーで平衡化した後、(2-2-2)で調製した菌ライゼートBを全量注ぎ込み、自然落下にて目的のHis-タグ付きE1或いはE2酵素をHis GraviTrapに吸着させた。その後、His GraviTrapを氷冷した10mLの洗浄バッファーで2回洗浄した後、氷冷しておいた3mLの溶出バッファーで目的のHis-タグ付きE1及びE2酵素をHis GraviTrapより溶出した。溶出液にDTT[dithiothreitol] (和光純薬工業株式会社)を終濃度が3mMになるように加えた後、300µLずつマイクロチューブに小分けした。それらの一部を用いて、それぞれの溶出液のE1酵素活性及びE2酵素活性を確認し、溶出液は酵素実験に使用するまで4で保存した。

#### 【0537】

本精製で使用した結合バッファー、洗浄バッファー、溶出バッファーの組成は以下の通りである。

結合バッファー：20mM Tris-HCl、20mM Imidazole(和光純薬工業株式会社)、0.5M NaCl (和光純薬工業株式会社)、1mM DTT[dithiothreitol](和光純薬工業株式会社)、1 mM PMSF[phenylmethylsulfonyl fluoride] (和光純薬工業株式会社)

洗浄バッファー：20mM Tris-HCl、60mM Imidazole、0.5M NaCl、1mM DTT[dithiothreitol]、1 mM PMSF[phenylmethylsulfonyl fluoride]

溶出バッファー：20mM Tris-HCl 500mM Imidazole、0.5M NaCl、1mM DTT[dithiothreitol]、1 mM PMSF[phenylmethylsulfonyl fluoride]

#### 【0538】

##### (2-3) 組換えHis-タグ付きE3酵素ポリペプチドの精製

##### (2-3-1) 大腸菌培養及び組換えHis-タグ付きE3酵素ポリペプチドの発現誘導

上記(2-1)に記載のpET-E3-Hisによる大腸菌BL21 (DE3) 形質転換体をアンピシリン (50 µg/mL) を含む50mLの液体LB培地で終夜37において培養を行った。その培養液20mLを同濃度のアンピシリンを含む液体LB培地1Lに加え、37で3時間(OD660nmが約0.4になるまで)前培養した。終濃度が0.5mMになるようにIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) (和光純薬工業株式会社)を加え、37で4時間振とう培養し、大腸菌内の組換えHis-タグ付きE3酵素ポリペプチドの発現誘導を行った。発現誘導を行った大腸菌をAvanti HP25(Beckman Coulter)で遠心分離(6000rpm 4分)をして集菌した。菌体を1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 2 mM DTT (和光純薬工業株式会社) 5mM Sodiumhydrosulfite (和光純薬工業株式会社)を含有する0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7.0 (以後バッファーAとする)を25 ml加えて懸濁し、遠心分離(6000rpm 4分)後そのままの状態での-80に保存した。

#### 【0539】

##### (2-3-2) 菌ライゼートの調製

上記(2-3-1)で保存した菌体を融解後、遠心(10,000xg 15 min)し、新しいバッファーAを25 ml加えて懸濁させた。その懸濁液をFastPrep(R) (Thermo ELECTRON CORPORATION)を用いて6500rpm、20秒間処理-3分間氷冷を3回繰り返すことで、菌体を破碎した。得られた菌体破碎液を遠心(10000 X g, 15 min)し、その上清を分離し、菌ライゼートを得た。

#### 【0540】

##### (2-3-3) 組換えHisタグ付きE3酵素ポリペプチドのアフィニティー精製

上記(2-3-3)で得た菌ライゼート4 mLを以下に示す精製条件によりHis-タグ融合タンパク質精製用カラムであるHisTrap HP (GEヘルスケアバイオサイエンス)に供して、組換えHisタグ付きE3酵素の精製を行った。蛋白質の測定は280 nmの吸収によった。またフラクションコレクターによる分画は素通り画分の280nmにおける吸収がベースラインに低下した後開始した。

#### 【0541】

流速： 1 ml / min

フラクション： 2 ml/2 min/フラクション

溶離液 A: 0.1 M リン酸カリウム緩衝液pH 7/0.5 M NaCl /1 % isoPrOH

溶離液 B: 0.5 M Imidazoleを含む溶離液A

10

20

30

40

50

溶出プログラム： 時間(min)	( 溶離液B ) / ( 溶離液A + 溶離液B )
0	0.05
5	0.05
25	0.5
30	1
35	1
37	0.05

## 【 0 5 4 2 】

この結果、E3合成活性はフラクションNo.7~9に認められた。複数の精製によって得られた活性フラクションをプールした後、更に8%となるようにグリセリンを加えて-28 に保存し、用事融解して実験に供した。

10

## 【 0 5 4 3 】

実施例 D 2 組換えHis-タグ付きE1及びE2酵素を用いたダイゼインからのテトラヒドロダイゼイン合成

上記実施例 D 1 の(2-2-3)にて得た組換えHis-タグ付きE1 酵素及びE2酵素を酵素源として、下記組成の酵素反応液を調製し、37 で2時間反応させることでダイゼインからテトラヒドロダイゼインの合成を行った。また、同時に酵素源として組換えHis-タグ付きE1、E2酵素それぞれを単独で用いた反応も行った。

酵素反応液組成

組換え His-タグ付き E1 酵素	20 $\mu$ l	20
組換え His-タグ付き E2 酵素	20 $\mu$ l	
NADH(100 mM)	20 $\mu$ l	
NADPH(100 mM)	20 $\mu$ l	
ダイゼイン (2 mg/ml)	5 $\mu$ l	
0.1M リン酸カリウム緩衝液 pH7/1mM PMSF/2mM DTT/5mM Sodiumhydrosulfite	915 $\mu$ l	
	計 1000 $\mu$ l	

20

## 【 0 5 4 4 】

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチル(和光純薬)を添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層(溶離液)で溶解した。溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のシス-及びトランス-テトラヒドロダイゼインを測定した。

30

HPLC分析の標準溶液はダイゼイン(フナコシ)、エクオール(フナコシ)、ジヒドロダイゼイン(トレンドリサーチケミカル社)シス-テトラヒドロダイゼイン(参考例 B 1)、トランス-テトラヒドロダイゼイン(参考例 B 1)の混合溶液(各2  $\mu$ g/mL)を用いた。HPLC分析の結果を図 2 3 に示す。酵素源に組換えHis-タグ付きE1酵素及びE2酵素の混合を使用した場合、その生成物にシス-及びトランス-テトラヒドロダイゼインを確認した。しかしながら、酵素源に組換えHis-タグ付きE1酵素もしくは組換えHis-タグ付きE2酵素単独で使用した場合には、その生成物にシス-及びトランス-テトラヒドロダイゼインは確認できなかった。

## 【 0 5 4 5 】

実施例 D 3 組換えHis-タグ付きE2及びE3酵素を用いたジヒドロダイゼインからのエクオール合成

40

上記実施例 D 1 の(2-2-3)及び(2-3-3)にて得た組換えHis-タグ付きE2及びE3酵素を酵素源として、下記組成の酵素反応液を調製し、37 で2時間反応させることでジヒドロダイゼインからエクオールの合成を行った。また、同時に酵素源として組換えHis-タグ付きE2酵素及びE3酵素それぞれを単独で用いた反応も行った。

酵素反応液組成

組換え His-タグ付き E2 酵素	20 $\mu$ l
組換え His-タグ付き E3 酵素	20 $\mu$ l
NADH(100 mM)	20 $\mu$ l
NADPH(100 mM)	20 $\mu$ l
ジヒドロダイゼイン (2 mg/ml)	5 $\mu$ l
<u>0.1M リン酸カリウム緩衝液 pH7/1mM PMSF/2mM DTT/5mM Sodiumhydrosulfite</u>	<u>915 <math>\mu</math>l</u>
計	1000 $\mu$ l

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチル(和光純薬)を添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層(溶離液)で溶解した。溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のエクオールを測定した。

10

HPLC分析の結果を図24に示す。酵素源に組換えHis-タグ付きE2、E3酵素混合を使用した場合、その生成物にエクオールを確認した。しかしながら、酵素源に組換えHis-タグ付きE2酵素もしくは組換えHis-タグ付きE3酵素を単独で使用した場合には、その生成物にエクオールは確認できなかった。

## 【0546】

#### 実施例 D 4 組換えHis-タグ付きE1酵素、E2酵素及びE3酵素を用いたダイゼインからのエクオール合成

上記実施例 D 1 の(2-2-3)及び(2-3-3)にて得た組換えHis-タグ付きE1酵素、E2酵素及びE3酵素を酵素源として、下記組成の酵素反応液を調製し、37℃で2時間反応させることでダイゼインからエクオールの合成を行った。また、同時に酵素源として組換えHis-タグ付きE1酵素、E2酵素、及びE3酵素をそれぞれ単独で用いた反応も行った。

20

#### 酵素反応液組成

組換え His-タグ付き E1 酵素	20 $\mu$ l
組換え His-タグ付き E2 酵素	20 $\mu$ l
組換え His-タグ付き E3 酵素	20 $\mu$ l
NADH(100 mM)	20 $\mu$ l
NADPH(100 mM)	20 $\mu$ l
ダイゼイン (2 mg/ml)	5 $\mu$ l
<u>0.1M リン酸カリウム緩衝液 pH7/1mM PMSF/2mM DTT/5mM Sodiumhydrosulfite</u>	<u>895 <math>\mu</math>l</u>
計	1000 $\mu$ l

30

## 【0547】

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチル(和光純薬)を添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層(溶離液)で溶解した。溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のエクオールを測定した。

HPLC分析の結果を図25に示す。酵素源にそれぞれの組換えHis-タグ付き酵素単独で使用的場合、その生成物にエクオールは確認できなかった。しかしながら、酵素源に組換えHis-タグ付きE1酵素、E2酵素及びE3酵素混合を使用した場合には、その生成物にエクオールが確認された。

## 【0548】

#### 実施例 E His-タグ付き組換えE1酵素のジヒドロダイゼン合成活性に対する金属イオンの影響

40

Ni-Sepharoseにて精製した大腸菌発現His-タグ付き組換えE1酵素(E1-His)を酵素源として、ダイゼインからジヒドロダイゼンへの変換活性に対する金属イオンの影響を検討した。各種金属(MnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O、Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O、CoSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O、NiSO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O)を蒸留水にて100mMとなるよう溶解し、実験に供した。活性の測定は下記組成の酵素反応液を調製し、37℃で1時間インキュベートして行った。

#### 酵素反応液組成

組換えHis-タグ付き E 1 酵素	20 $\mu$ l
NADH(100 mM)	10 $\mu$ l

50

NADPH(100 mM)	10 μl
ダイゼイン (1 mg / ml)	10 μl
金属イオン溶液	100 μl
0.2M KPB-DH	850 μl
	計 1000 μl

## 【 0 5 4 9 】

インキュベート後、得られた酵素反応液に3mLの酢酸エチルを添加して抽出処理を行い、乾固した後、移動層（溶離液）で溶解した後、溶解物をHPLC分析することにより、酵素反応液中のダイゼイン、ジヒドロダイゼインの含量を測定した。実験の結果、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>に活性促進作用のあることが認められた（図 2 6）。

10

## 【 配列表フリーテキスト 】

## 【 0 5 5 0 】

配列番号 2 3 はプライマー-E1-N-terminal-31の塩基配列を示す。  
 配列番号 2 4 はプライマー-E1-N-terminal-37の塩基配列を示す。  
 配列番号 2 5 はプライマー-E1-N-terminal-F32の塩基配列を示す。  
 配列番号 2 6 はプライマー-E1-internal-RP1の塩基配列を示す。  
 配列番号 2 7 はプライマー-pUC19-FP-1の塩基配列を示す。  
 配列番号 2 8 はプライマー-pUC19-RP-1の塩基配列を示す。  
 配列番号 2 9 はプライマー-pUC19-FP- 2 の塩基配列を示す。  
 配列番号 3 0 はプライマー-pUC19-RP- 2 の塩基配列を示す。  
 配列番号 3 1 はプライマー-E1-RACE-N-P1の塩基配列を示す。  
 配列番号 3 2 はプライマー-E1-RACE-RP2-1の塩基配列を示す。  
 配列番号 3 3 はプライマー-E1-RACE-N-P2の塩基配列を示す。  
 配列番号 3 4 はプライマー-E1-RACE-RP2-2の塩基配列を示す。  
 配列番号 3 5 はプライマー-E1-conf-NPの塩基配列を示す。  
 配列番号 3 6 はプライマー-E1-conf-CPの塩基配列を示す。  
 配列番号 3 7 はプライマー-E1-FPの塩基配列を示す。  
 配列番号 3 8 はプライマー-E1-RPの塩基配列を示す。  
 配列番号 3 9 はプライマー-Gar- 1 6 S-Ribo-FPの塩基配列を示す。  
 配列番号 4 0 はプライマー-Gar- 1 6 S-Ribo-RPの塩基配列を示す。  
 配列番号 4 1 はプライマー-exp.E1 pet F Ndeの塩基配列を示す。  
 配列番号 4 2 はプライマー-exp. E1 pet Hisの塩基配列を示す。  
 配列番号 4 3 はプライマー-RACE-N-P3-1の塩基配列を示す。  
 配列番号 4 4 はプライマー-RACE-N-P3-2の塩基配列を示す。  
 配列番号 4 5 はプライマー-E1-Bub-N-P1の塩基配列を示す。  
 配列番号 4 6 はプライマー-E1-Bub-N-P2の塩基配列を示す。  
 配列番号 4 7 はプライマー-RACE-C-P3-1の塩基配列を示す。  
 配列番号 4 8 はプライマー-RACE-C-P3-2の塩基配列を示す。  
 配列番号 4 9 はプライマー-E1-Bub-C-P1の塩基配列を示す。  
 配列番号 5 0 はプライマー-E1-Bub-C-P2の塩基配列を示す。  
 配列番号 5 7 はプライマー-E2-invitoTS-FPの塩基配列を示す。  
 配列番号 5 8 はプライマー-E2-invitoTS-RPの塩基配列を示す。  
 配列番号 5 9 はプライマー-Universal-Primerの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 0 はプライマー-exp.US2 pet F Ndeの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 1 はプライマー-exp. US2 petの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 2 はプライマー-exp.US3 Fの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 3 はプライマー-exp.US3 Rの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 4 はプライマー-exp.US1 Fの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 5 はプライマー-exp.US1 Rの塩基配列を示す。  
 配列番号 6 6 はプライマー-exp.DS1 Fの塩基配列を示す。

20

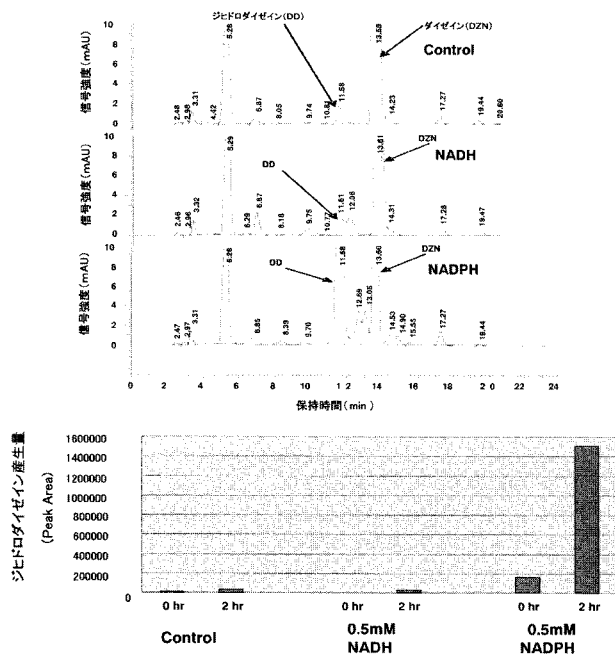
30

40

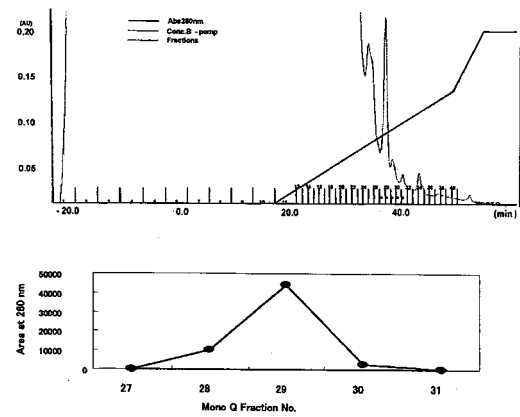
50

配列番号 6 7 はプライマー-exp.DS1 Rの塩基配列を示す。

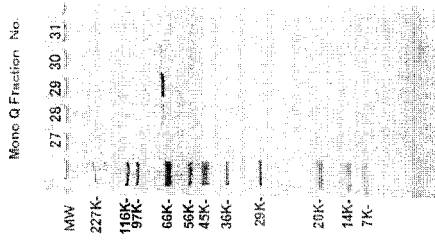
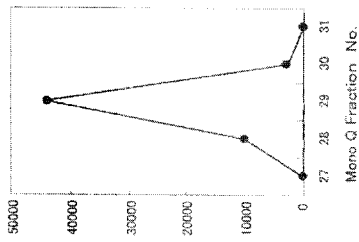
【 図 1 】



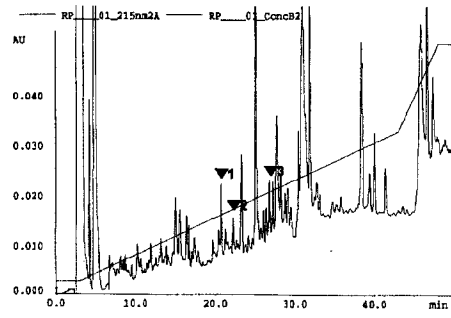
【 図 2 】



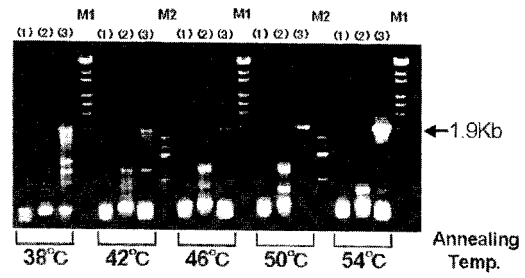
【 図 3 】



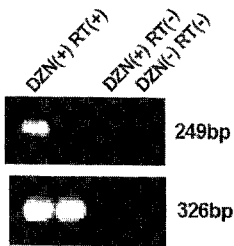
【 図 4 】



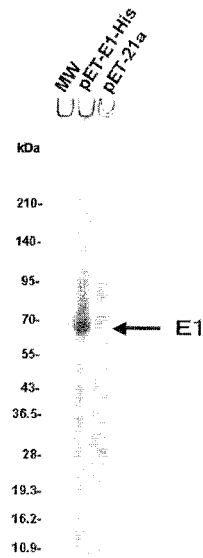
【 図 5 】



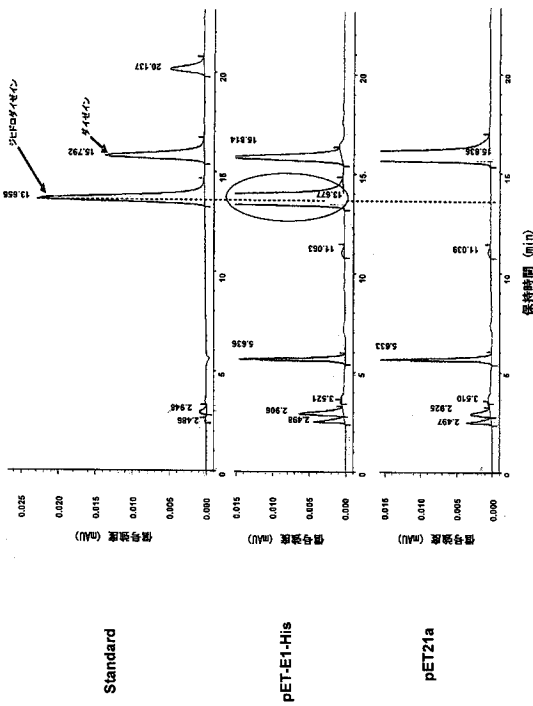
【 図 6 】



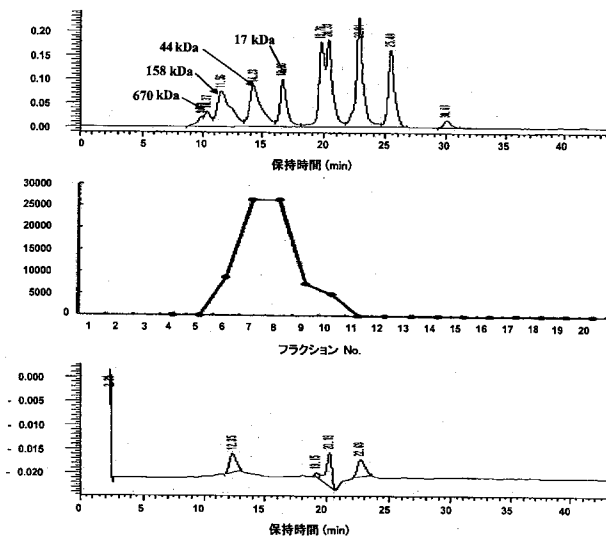
【 図 7 】



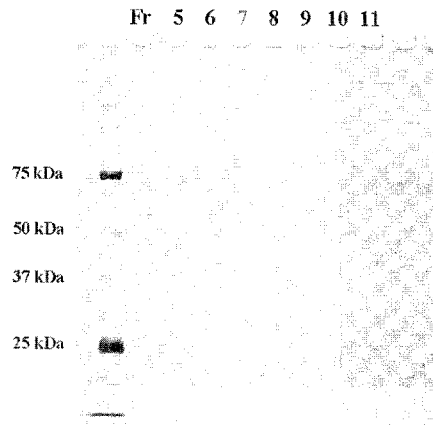
【 図 8 】



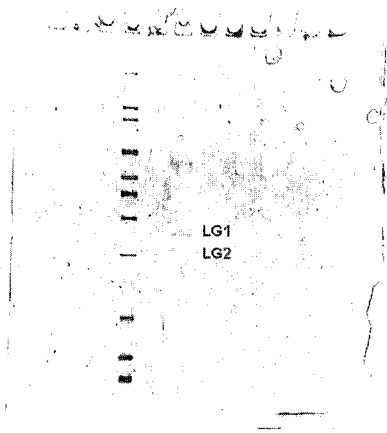
【 図 1 2 】



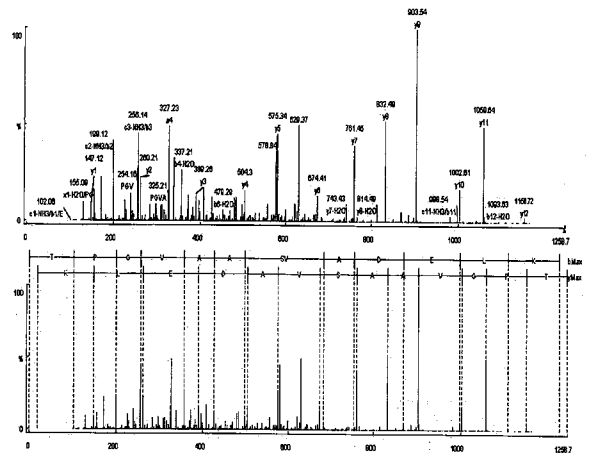
【 図 1 3 】



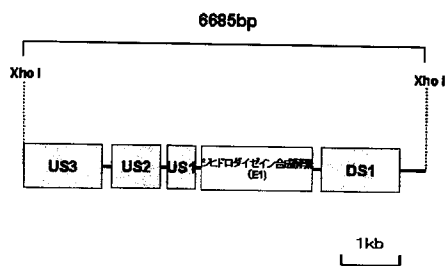
【 図 1 4 】



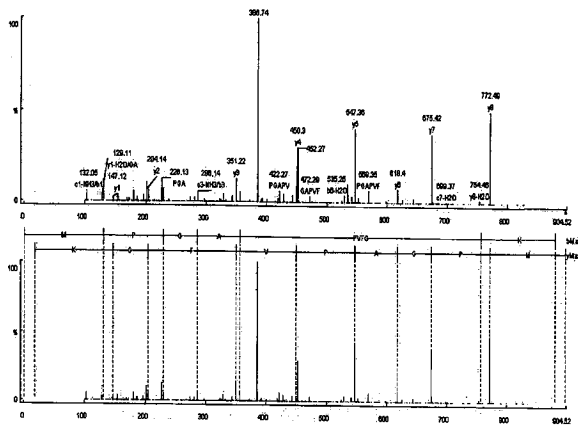
【 図 1 6 - 1 - a 】



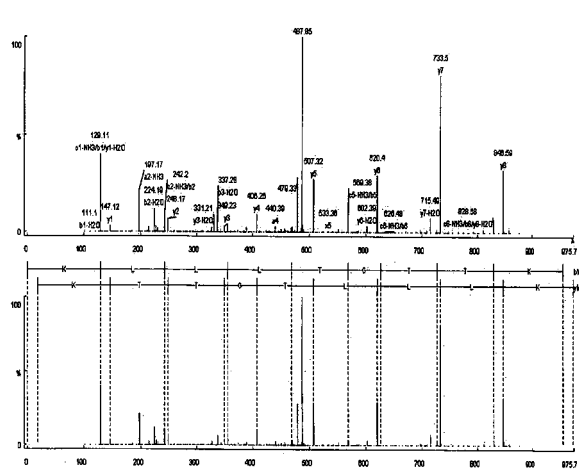
【 図 1 5 】



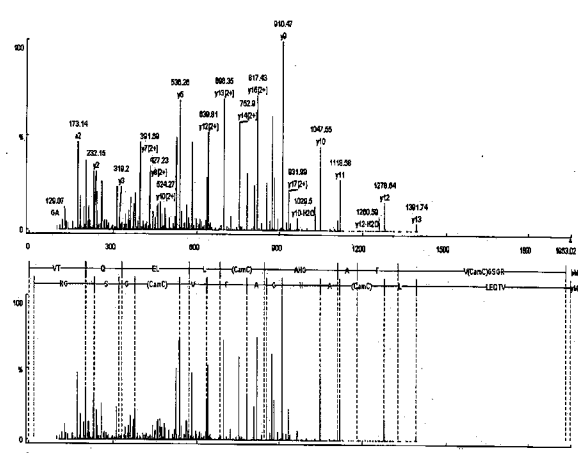
【 図 16 - 1 - b 】



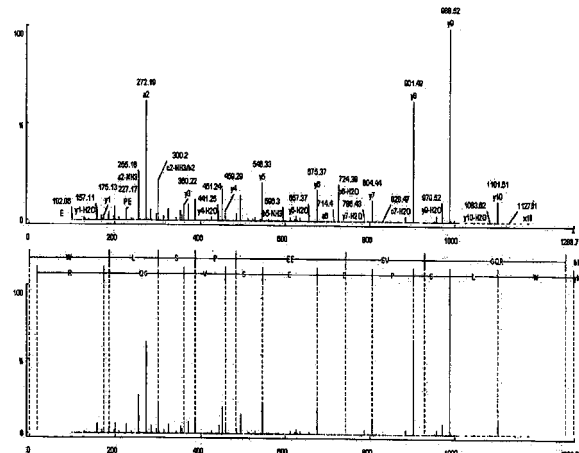
【 図 16 - 2 - a 】



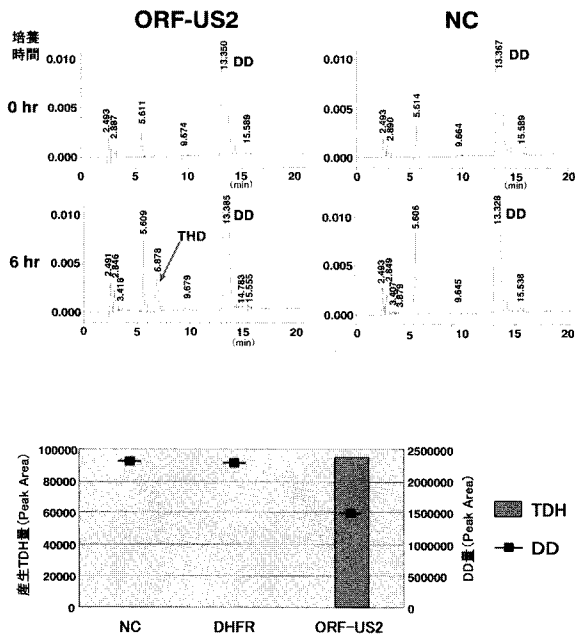
【 図 16 - 2 - b 】



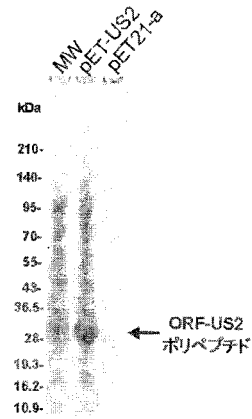
【 図 16 - 3 】



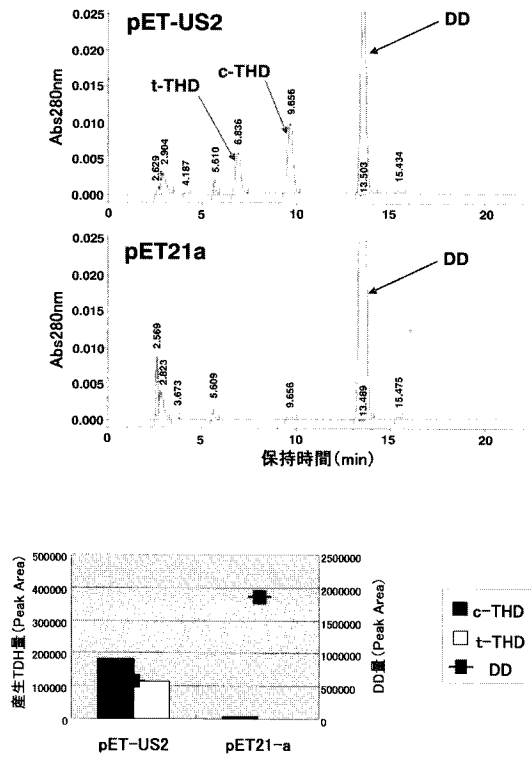
【 図 1 7 】



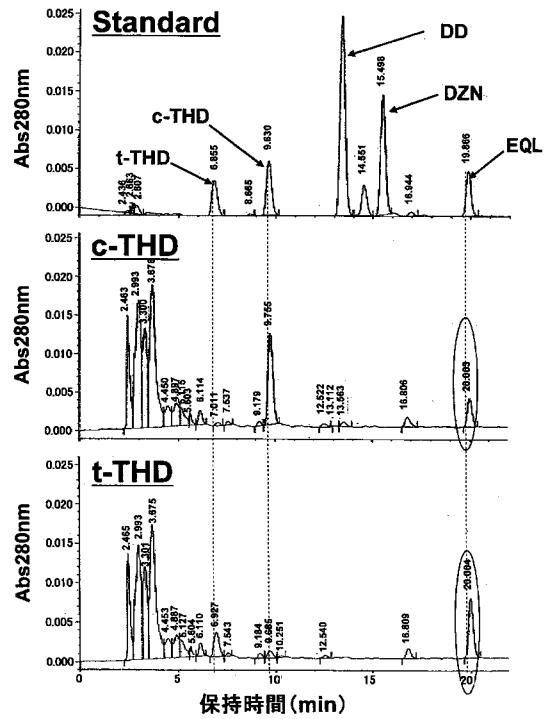
【 図 1 8 】



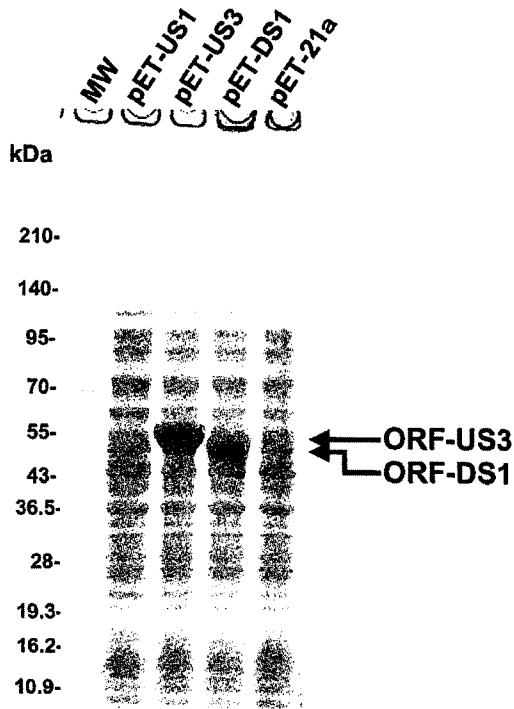
【 図 1 9 】



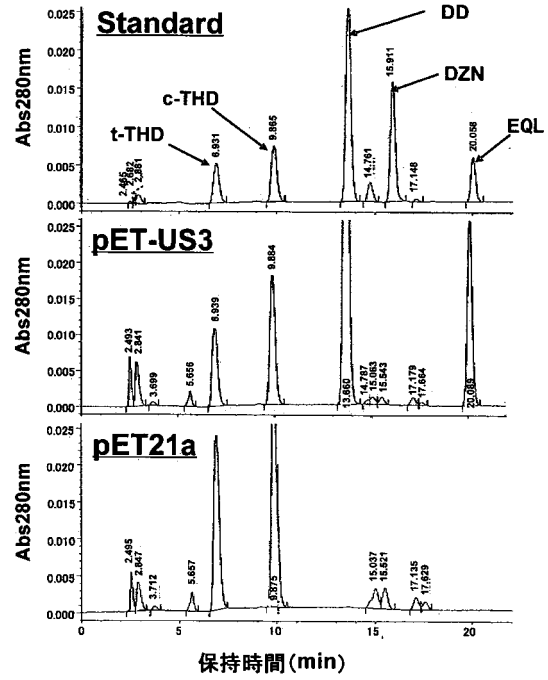
【 図 2 0 】



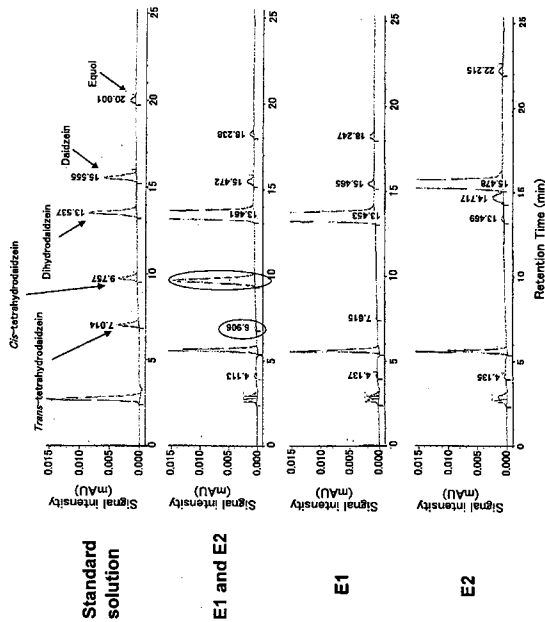
【 図 2 1 】



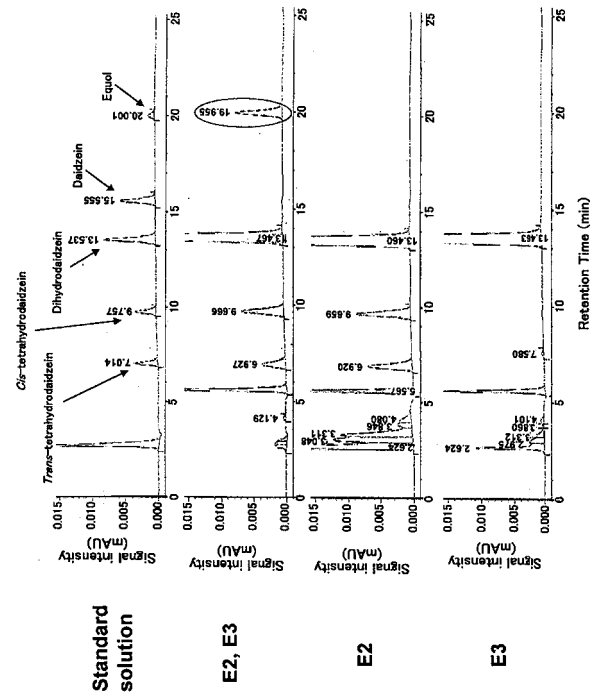
【 図 2 2 】



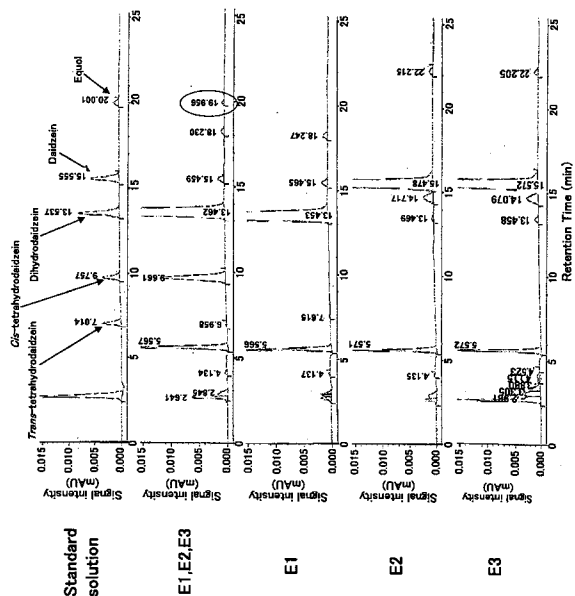
【 図 2 3 】



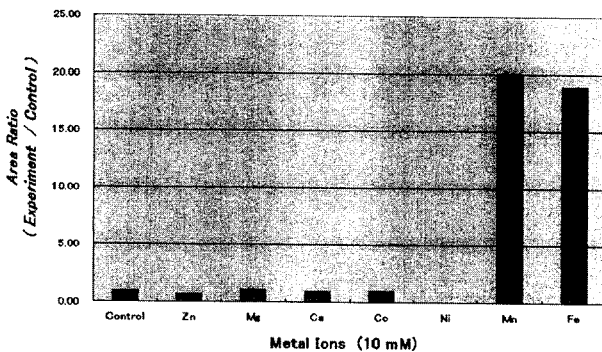
【 図 2 4 】



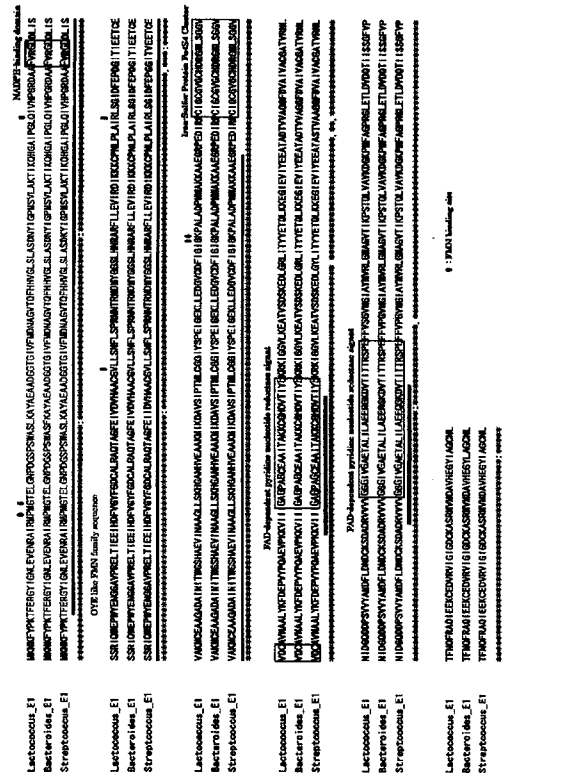
【 2 5 】



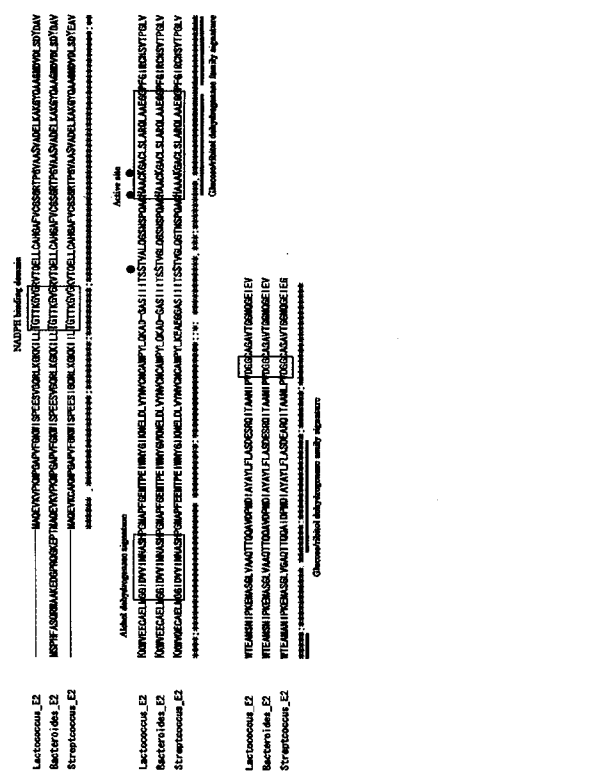
【 2 6 】



【 2 7 】



【 2 8 】





FAD binding domain

Lactococcus\_E3 MAEFDVEYDLVWGGGASGKSAALI AAREGKRWVLEKMPETGGLSHYAEGTAAFESSIQNELGTPRLSKYHFTKQEGIEKFMGYSHORANYDVVRAAFVENSAAETID IYRDLGWYKAC  
 Bacteroides\_E3 MAQFDVEYDLVWGGGASGKSAALI AAREGKRWVLEKMPETGGLSHYAEGTAAFESSIQNELGTPRLSKYHFTKQEGIEKFMGYSHORANYDVVRAAFVENSAAETID IYRDLGWYKAC  
 Streptococcus\_E3 MAEFDVEYDLVWGGGASGKSAALI AARAGKRWVLEKMPETGGLSHYAEGTAAFESSIQKELGTPRLSKYHFTKQEGIEKFMGYSHORASVDVVRAPVENSAAETID IYRELGWYKTC

Lactococcus\_E3 DIAAEDDPNEVITFHLPEGLGAHCEVLLDAIQKLDVDI FTSTPAKELI IEDGAVVGVVAESDGEPLRYGGKAVILATGGMGSSPERIFKYSWFAAPAAYNMNTL TPLQNVGDGLDLALSA  
 Bacteroides\_E3 DIAAEDDPNEVITFHLPEGLGAHCEVLLDAIQKLDVDI FTSTPAKELI IEEGAVVGVVAESDGEPLRYGGKAVILATGGMGSSPERIFKYSWFAAPAAYNMNTL TPLQNVGDGLDLALSA  
 Streptococcus\_E3 DIAAEDDPSEVITFHLPEGLGAHCEVLLDAIQKLDVDI FTSTPAKELI IEDSKVVGWVAESDGEPLRYGGKAVILATGGMGSSPDRIFKYSWFAAPAAYNMNTL TPLQNVGDGLDLALSA

Predicted oxidoreductase [General function prediction only] seq.

Lactococcus\_E3 GADPTYITTCPI LAAGGRMITNDSVGGAGVNPQVWINKTGRFFAAESVAENIGD IGTYYGKQPGGVVWSILSDADIDRLVAEGSEIAI GEFVYTHKPIERLP ILEAHLESGLYKKAAGS  
 Bacteroides\_E3 GADPTYITTCPI LAAGGRMITNDSVGGAGVNPQVWINKTGRFFAAESVAENIGD IGTYYGKQPGGVVWSILSDADIDRLVAEGSEIAI GEFVYTHKPIERLP ILEAHLESGLYKKAAGS  
 Streptococcus\_E3 GADDTAITTCPI LAAGGRMITNDSVGGAGVNPQVWINKSGRFFCAESVAENIGD IGTYYGKQPGGI VWSILSDADIDRLVNEGSEIAI GEFVYTHKPIERLP IELMAHLESGLYKKAAGC

Lactococcus\_E3 FEELAALIDVPMVDTFVATMADYNEACEKGYDDAFINKKPYLRPNWEGPFYAI PLATGTGSSAGGIRI INGNIDVVDADYMAIPBL YAVGLDATGL YGDSYMEVPGAANGFAHTSSRI IAAIR  
 Bacteroides\_E3 FEELAALIDVPMVDTFVATMADYNEACEKGYDDAFINKKPYLRPNWEGPFYAI PLATGTGSSAGGIRI INGNIDVVDADYMAIPBL YAVGLDATGL YGDSYMEVPGAANGFAHTSSRI IAAIR  
 Streptococcus\_E3 FEELAERKIDVPMVDTFVATMADYNEACEKGYDDAFINKKPEYLRPETDAFFYAI PLATGTGSSAGGIRI INGNIDV I DSDAMP I PBL YAVGLDATGL YGDSYMEVPGAANGFAHTSSRI IAAIR

Lactococcus\_E3 HAISTH-  
 Bacteroides\_E3 HAISTH-  
 Streptococcus\_E3 HALSTHE

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>			G 0 1 N 33/53	D	
<b>G 0 1 N 33/569 (2006.01)</b>			G 0 1 N 33/569	B	

(72)発明者 林 隆史

大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内

(72)発明者 宮澤 憲浩

大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内

(72)発明者 阿比留 康弘

大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 大塚製薬株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA08 CA04 DA06 EA04 GA11  
 4B050 CC03 DD02 FF01 FF14E LL05  
 4B063 QA13 QA18 QQ22 QQ42 QQ53 QQ79 QR02 QR36 QR48 QR55  
 QR62 QS33 QS34 QX01  
 4B064 AC19 CA02 CA19 CB18 CC24 CD01 DA01 DA16  
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA50

专利名称(译)	参与雌马酚合成的酶		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013051966A</a>	公开(公告)日	2013-03-21
申请号	JP2012246695	申请日	2012-11-08
申请(专利权)人(译)	大冢制药有限公司		
[标]发明人	嶋田良和 保田世津子 高橋真行 林隆史 宮澤憲浩 阿比留康弘		
发明人	嶋田 良和 保田 世津子 高橋 真行 林 隆史 宮澤 憲浩 阿比留 康弘		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/02 C12P7/22 C07K16/40 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C12P17/06 C12N9/00 C12N9/0073 C12N9/93		
FI分类号	C12N15/00.A C12N9/02.ZNA C12P7/22 C07K16/40 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/569.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA03 4B024/BA08 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/FF01 4B050/FF14E 4B050/LL05 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AC19 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CB18 4B064/CC24 4B064/CD01 4B064/DA01 4B064/DA16 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
优先权	2007336227 2007-12-27 JP 2008054874 2008-03-05 JP 2008080570 2008-03-26 JP		
其他公开文献	JP5689104B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供与牛尿酚合成有关的酶，提供编码酶的基因，并提供使用该酶生产雌马酚及其中间体的方法。溶剂：提供二氢黄豆苷合成酶，四氢黄豆苷元合酶和雌马酚合成酶，以及编码合酶的基因。此外，提供了通过使用酶合成二氢黄豆苷元，四氢黄豆苷和/或牛尿酚的方法。

