

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6932354号
(P6932354)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月20日(2021.8.20)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 P 17/10 (2006.01)	C 1 2 P	17/10 Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N	15/53
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55
C 1 2 R 1/66 (2006.01)	C 1 2 R	1:66

請求項の数 6 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-534126 (P2017-534126)	(73) 特許権者	000004477
(86) (22) 出願日	平成28年6月17日(2016.6.17)		キッコーマン株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/068128		千葉県野田市野田250番地
(87) 国際公開番号	W02017/026173	(73) 特許権者	501168814
(87) 国際公開日	平成29年2月16日(2017.2.16)		国立研究開発法人水産研究・教育機構
審査請求日	平成31年4月15日(2019.4.15)		神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目1番地25
(31) 優先権主張番号	特願2015-157443 (P2015-157443)	(74) 代理人	100149032
(32) 優先日	平成27年8月7日(2015.8.7)		弁理士 森本 敏明
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(72) 発明者	市川 憲一
			千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内
		(72) 発明者	篠原 靖智
			千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セレノネインの製造方法

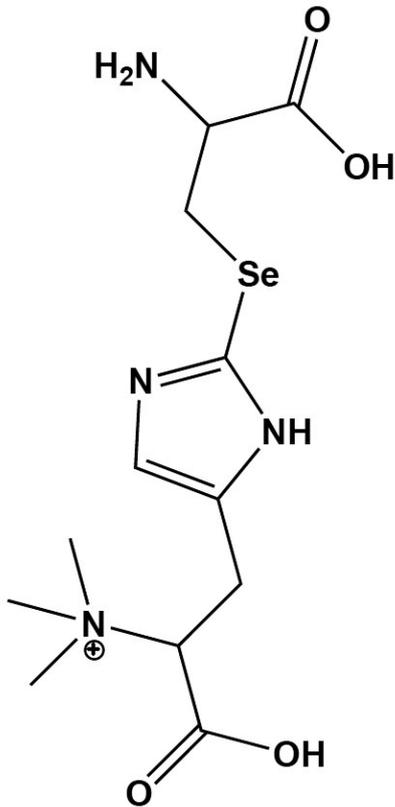
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒスチジン及びセレン化合物としてセレノシスチン又は亜セレン酸を、下記(1)の酵素をコードするアスペルギルス(Aspergillus)属微生物由来の遺伝子が外来遺伝子として挿入されており、該挿入された遺伝子を過剰発現し、かつ、アスペルギルス(Aspergillus)属微生物を宿主生物とする形質転換体に作用させて、セレノネインを得る工程を含む、セレノネインの製造方法。

(1) S-アデノシルメチオニン及び鉄(II)の存在下で、ヒスチジン及びセレノシスチンから下記式〔I〕

【化 1】



〔 I 〕

に示されるヘルシニルセレノシステインを生成する反応を触媒する酵素であって、該酵素をコードする遺伝子が配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列、及び配列表の配列番号 2 3 に記載の塩基配列及び該塩基配列と 90% 以上の配列同一性を有する塩基配列からなる群から選ばれる塩基配列を有する遺伝子であり、又は配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列及び該アミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する、前記酵素

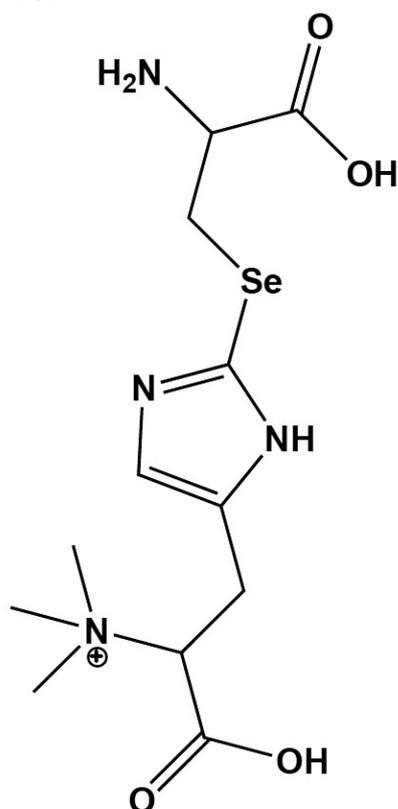
30

【請求項 2】

前記形質転換体が、さらに下記(2)の酵素をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体である、請求項 1 に記載の製造方法。

(2) ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素として、下記式〔 I 〕

【化 2】



〔 I 〕

に示されるヘルシニルセレノシステインからセレノネインを生成する反応を触媒する酵素であって、該酵素をコードする遺伝子が配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列、及び配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列及び該塩基配列と 90% 以上の配列同一性を有する塩基配列からなる群から選ばれる塩基配列を有する遺伝子であり、又は配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列、及び配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列及び該アミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する、前記酵素

30

【請求項 3】

前記宿主生物としての前記アスペルギルス属微生物が、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamarisii*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ウサミ (*Aspergillus usamii*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*) 及びアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) からなる群から選ばれるアスペルギルス属微生物である、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

40

【請求項 4】

前記外来遺伝子としての前記アスペルギルス属微生物が、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamarisii*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ウサミ (*Aspergillus usamii*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*) 及びアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) からなる群から選ばれるアスペルギルス属微生物である、請求項 1 ~ 3 のい

50

ずれか1項に記載の製造方法。

【請求項5】

前記形質転換体は、前記(1)の酵素をコードする遺伝子の発現が、宿主生物に比してセレノネインの量が増えるように増強された形質転換体である、請求項1~4のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項6】

前記形質転換体は、前記(1)の酵素をコードする遺伝子の発現が、該形質転換体を、宿主生物の生育に適したセレノシスチン含有培地を用いて30、5日間で培養した場合のセレノネインの量が湿菌体質量1gあたり10 μ g以上になるように増強された形質転換体である、請求項1~5のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2015年8月7日出願の日本特願2015-157443号の優先権を主張し、それらの全記載は、ここに開示として援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、セレノネインの製造方法に関し、特にセレノネイン生産能を有する微生物を用いたセレノネインの製造方法に関する。

【背景技術】

【0003】

セレン(Se)は周期表における第16族に属する元素、すなわち、酸素族元素(カルコゲン元素)の1種であり、ヒトにとって必須の微量元素である。セレンは、生体内では、酵素やタンパク質の一部を構成し、抗酸化反応において重要な役割を担っている。藻類、魚介類、肉類、卵黄などに豊富に含まれていることから、これらを含む食品を通じてセレンを摂取することができる。

【0004】

セレンを含有する酵素としては、例えば、動物種においては、構成アミノ酸としてセレノシスチンやセレノメチオニンを含むグルタチオンペルオキシターゼなどが知られている。また、藻類や植物種においてもセレノプロテインの存在が多数報告されている。

【0005】

セレンが不足すると、過酸化物による細胞障害が生じ、結果として心筋症(克山病)、カシン・ベック症(地方病性変形性骨軟骨関節症)、狭心症や心筋梗塞などの冠動脈疾患、心臓血管系疾患などの疾患の発症に繋がりが得る。この他にも、セレン欠乏によって、筋肉痛;皮膚の乾燥、肝壊死、肺がん、大腸がん、前立腺がん、直腸がん、乳がん、白血病などの発癌のリスクの上昇が誘起されるという報告がある。

【0006】

一方で、セレンは、毒物としての有害性を持ち合わせている。例えば、セレノオキサニオンの形態をとることにより、毒性が高まる。そこで、セレンを過剰摂取することにより、爪の変形や脱毛、胃腸障害、神経障害、心筋梗塞、急性の呼吸困難、腎不全などが誘起されることが知られている。そこで、厚生労働省によりセレンの食事摂取基準が定められており、例えば、30~49歳の男性(女性)であれば、推定平均必要量は25(20) μ g/日、推奨量は30(25) μ g/日、上限量は460(350) μ g/日である(非特許文献1を参照、該文献の全記載はここに開示として援用される)。

【0007】

現在、セレン欠乏に関わる疾病の予防や治療には、亜セレン酸などの無機態セレン(無機セレン化合物)やセレノメチオニンなどの有機態セレン(有機セレン化合物)を含有するサプリメントが利用されている。また、無機セレン化合物を含む培地中で酵母を培養することによって、セレノメチオニンを高濃度に含むセレン酵母が有機セレン化合物の1種として利用されている。

10

20

30

40

50

【0008】

その他の有機セレン化合物の1種としてセレノネインがあり、セレノネインは生体抗酸化作用及び細胞増殖促進作用などを有することが知られている（特許文献1を参照、該文献の全記載はここに開示として援用される）。セレノネインは、エルゴチオネインのSH基がSeH基に置換したセレンアナログであるところ、その抗酸化能はエルゴチオネインの1,000倍（非特許文献3を参照、該文献の全記載はここに開示として援用される）に達する。

【0009】

セレノネインの製造方法としては、動物の臓器や血液から抽出する方法（下記特許文献1を参照、該文献の全記載はここに開示として援用される）に加えて、エルゴチオネイン生合成系に関する遺伝子を導入した分裂酵母であるシゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）を利用する方法が知られている（非特許文献2を参照、該文献の全記載はここに開示として援用される）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特許第5669056号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】厚生労働省、「日本人の食事摂取基準（2015年版）策定検討会」報告書、平成26年3月28日（<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000042638.pdf>）

【非特許文献2】PLOS One 2014 May 14; 9(5): e97774

【非特許文献3】J. Biol. Chem. - 2010 18134 - 8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

特許文献1に記載の方法は、魚類の臓器や血液からセレノネインを抽出する方法であるところ、これらに含まれるセレノネイン含有量は非常に少ないことから、大量のセレノネインを得るためには大量の魚類が必要になるという問題がある。

【0013】

一方、非特許文献2には、ヒスチジン及びセレノシステインからヘルシニルセレノシステインを生成する反応を触媒する酵素としてEgt1があり、該酵素をコードする遺伝子SPBC1604.01を過剰発現するように形質転換した形質転換シゾサッカロミセス・ポンベを用いてセレノネインを*in vivo*合成したことが記載されている。しかし、非特許文献2に記載の形質転換シゾサッカロミセス・ポンベを用いて得られたセレノネインの量は非常に少ないという問題がある。

【0014】

そこで、本発明が解決しようとする課題は、非特許文献2に記載の形質転換シゾサッカロミセス・ポンベに比べて、セレノネインを高収量で生産することができることから、工業的規模でのセレノネインの製造を可能にする、セレノネインの製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を積み重ねた結果、菌類の一種であるアスペルギルス・ソーヤ（*Aspergillus sojae*）において、ヒスチジン及びセレン化合物からセレノネインを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子AsEgtAを特定することに成功した。

【0016】

10

20

30

40

50

次に、本発明者らは、A s E g t Aタンパク質を過剰発現するためのDNAコンストラクトを作製し、アスペルギルス・ソーヤに導入して形質転換することによって、A s E g t Aタンパク質を過剰発現する形質転換アスペルギルス・ソーヤを作製することに成功した。また、同様にして、遺伝子A s E g t Aと相同性の高いアスペルギルス・オリゼ (A s p e r g i l l u s o r y z a e) の遺伝子A o E g t Aを特定して、A o E g t Aタンパク質を過剰発現する形質転換アスペルギルス・オリゼを作製することに成功した。

【0017】

驚くべきことに、得られた形質転換体は、セレノシスチンなどの有機セレン化合物だけではなく、亜セレン酸などの無機セレン化合物からセレノネインを生産することができ、しかもその量は非特許文献2に記載の形質転換シゾサッカロミセス・ポンベに比べて著しく多い量であった。

10

【0018】

本発明者らは、さらに驚くべきことに、有毒性が認められる濃度のセレン化合物を添加した場合であっても、上記形質転換体は野生株と比較して明らかにセレン化合物に対して高い耐性を示すことを見出した。また、上記形質転換体は、常法に従って培養することができ、その増殖速度などについても野生株と格別相違がないものであった。これらのことより、上記形質転換体を用いればセレノネインを大量生産し得ることがわかった。本発明はこのような成功例や知見に基づいて完成するに至った発明である。

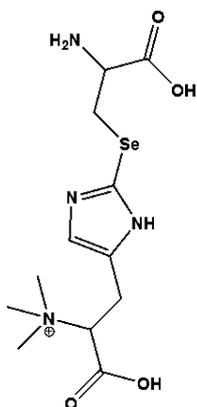
【0019】

したがって、本発明の一実施態様によれば、ヒスチジン及びセレン化合物を、下記(1)の酵素をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体に作用させて、セレノネインを得る工程を含む、セレノネインの製造方法が提供される。

20

(1) S - アデノシルメチオニン及び鉄(II)の存在下で、ヒスチジン及びセレノシステインから下記式〔I〕

【化1】



〔I〕

に示されるヘルシニルセレノシステインを生成する反応を触媒する酵素

40

【0020】

好ましくは、有機セレン化合物及び無機セレン化合物並びにこれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも1種のセレン化合物である。

【0021】

好ましくは、前記有機セレン化合物及びその塩がセレノシステイン、セレノシスチン、セレノメチオニン、Se-(メチル)セレノ-L-システイン、セレノペプチド、セレノプロテイン及びそれらの塩並びにセレン酵母からなる群から選ばれる少なくとも1種のセレン化合物であり、かつ、前記無機セレン化合物及びその塩がセレン酸、亜セレン酸、塩化セレン、セレン、硫化セレン、ジメチルセレン、セレノリン酸、二酸化セレン及びそれらの塩からなる群から選ばれる少なくとも1種のセレン化合物である。

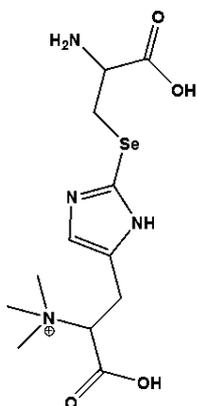
50

【0022】

好ましくは、前記形質転換体が、さらに下記(2)の酵素をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体である。

(2) ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素として、下記式〔I〕

【化2】



〔I〕

に示されるヘルシニルセレノシステインからセレノネインを生成する反応を触媒する酵素

【0023】

好ましくは、前記形質転換体が、セレン酸レダクターゼ、セレノシステインリアーゼ及びセリンデヒドラターゼからなる群から選ばれる少なくとも1種の酵素を発現する微生物を宿主生物とする。

【0024】

好ましくは、前記形質転換体が、Aspergillus 属微生物、Escherichia 属微生物、Trichoderma 属微生物、Fusarium 属微生物、Penicillium 属微生物、Rhizopus 属微生物、及び Neuspora 属微生物からなる群から選ばれる少なくとも1種の微生物を宿主生物とする。

【0025】

好ましくは、前記 Aspergillus 属微生物が、Aspergillus sojae、Aspergillus oryzae、Aspergillus niger、Aspergillus tamarii、Aspergillus awamori、Aspergillus usami、Aspergillus kawachi 及び Aspergillus saitoi からなる群から選ばれる Aspergillus 属微生物である。

【0026】

好ましくは、前記形質転換体が、大腸菌を宿主生物とする。

【0027】

好ましくは、前記形質転換体は、前記(1)の酵素をコードする遺伝子の発現が、宿主生物に比してセレノネインの量が増えるように増強された形質転換体である。

【0028】

好ましくは、前記形質転換体は、前記(1)の酵素をコードする遺伝子の発現が、該形質転換体を、宿主生物の生育に適したセレノシスチン含有培地を用いて30、5日間で培養した場合のセレノネインの量が湿菌体質量1gあたり10µg、より好ましくは湿菌体質量1gあたり20µg、さらに好ましくは湿菌体質量1gあたり40µg、なおさらに好ましくは湿菌体質量1gあたり100µgになるように増強された形質転換体である。

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

好ましくは、前記(1)の酵素をコードする遺伝子が配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有する遺伝子及び配列表の配列番号23に記載の塩基配列を有する遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子であり、又は前記(1)の酵素が配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する酵素及び配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列を有する酵素からなる群から選ばれる酵素である。

【 0 0 3 0 】

好ましくは、前記(2)の酵素をコードする遺伝子が配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有する遺伝子及び配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有する遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子であり、又は前記(2)の酵素が配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する酵素及び配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する酵素からなる群から選ばれる酵素である。

【 0 0 3 1 】

また、本発明の一実施態様として、上記形質転換体を用いた製造方法と比較するとセレノネインの生産量としては微量ではあるが、アスペルギルス属微生物といった麹菌などの糸状菌を用いてセレノシスチンなどの有機セレン化合物や、亜セレン酸などの無機セレン化合物からセレノネインを生産することができることを見出している。すなわち、本発明の別の一実施態様によれば、ヒスチジン及びセレン化合物を、前記(1)の酵素をコードする遺伝子をゲノムDNA上に有するアスペルギルス属微生物といった麹菌などの糸状菌に作用させて、セレノネインを得る工程を含む、セレノネインの製造方法が提供される。

【 発明の効果 】

【 0 0 3 2 】

本発明の一実施態様である製造方法や形質転換体によれば、通常の宿主生物を培養する条件により、高収量のセレノネインを製造することができる。その結果、本発明の一実施態様である製造方法や形質転換体によれば、工業的規模でセレノネインを製造することが期待できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 】 図 1 は、実施例に記載のコントロール株及び形質転換アスペルギルス・ソーヤ(「(AsEgtA+AsEgtC)形質転換体」)をセレノシスチン添加DPY液体培地で培養して得られた培養物から作製したセレノネイン抽出液について、セレノネインに相当するピークの検出を試みたLC-MS分析結果を示した図である。

【 図 2 】 図 2 は、実施例に記載のコントロール株及び形質転換アスペルギルス・ソーヤ(「(AsEgtA+AsEgtC)形質転換体」)をセレノシスチン添加DPY液体培地で培養して得られた培養物から作製したセレノネイン抽出液について、エルゴチオネインに相当するピークの検出を試みたLC-MS分析結果を示した図である。

【 図 3 】 図 3 は、図 1 の LC - MS 分析結果のうち、リテンションタイム 3 1 分付近のピークの MS スペクトルの拡大図である。

【 図 4 】 図 4 は、図 3 について、天然存在比から推定されるセレノネインのイオン分布の計算値を示した図である。

【 図 5 】 図 5 は、実施例に記載の形質転換アスペルギルス・ソーヤをDPY液体培地(「DPY」)、セレノシスチン添加DPY液体培地(「DPY+セレノシスチン」)又は亜セレン酸添加DPY液体培地(「DPY+亜セレン酸」)を用いて培養して得られた培養物から作製したセレノネイン抽出液について、セレノネインに相当するピークの検出を試みたLC-MS分析結果を示した図である。

【 図 6 】 図 6 は、実施例に記載のコントロール株及び形質転換アスペルギルス・オリゼ(「AoEgtA形質転換体」)をセレノシスチン添加DPY液体培地で培養して得られた培養物から作製したセレノネイン抽出液について、セレノネインに相当するピークの検出を試みたLC-MS分析結果を示した図である。

【 図 7 】 図 7 は、実施例に記載のコントロール株(「NBRC4239株」)及び形質転

換アスペルギルス・ソーヤ（「(A s E g t A + A s E g t C) 形質転換体」）について、セレノシスチンに対する毒性を評価した結果を示した図である。

【図 8】図 8 は、実施例に記載のコントロール株（「N B R C 4 2 3 9 株」）及び形質転換アスペルギルス・ソーヤ（「(A s E g t A + A s E g t C) 形質転換体」）について、亜セレン酸に対する毒性を評価した結果を示した図である。

【図 9】図 9 は、実施例に記載の形質転換体及びコントロール株から抽出した総タンパク質を用いた SDS - P A G E の写真図である。レーン 1 はコントロール株、レーン 2 は A s E g t A 形質転換体、レーン 3 は A s E g t B 形質転換体、レーン 4 は A s E g t C 形質転換体、レーン 5 は (A s E g t A + A s E g t B) 形質転換体、レーン 6 は (A s E g t A + A s E g t C) 形質転換体の由来のものをそれぞれ示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、本発明の一実施態様である製造方法及び形質転換体の詳細について説明する。

【0035】

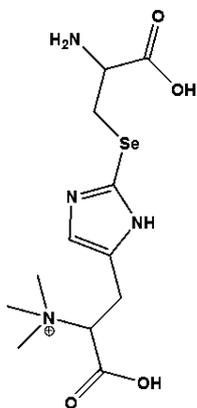
（製造方法の概要）

製造方法の一実施態様は、ヒスチジン及びセレン化合物を、下記(1)の酵素（以下、酵素(1)とよぶ。）をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体に作用させて、セレノネインを得る工程を少なくとも含む。本明細書において、セレン化合物は、セレン化合物そのものに加えて、セレン化合物の塩、錯体、架橋物及び誘導体を包含する。

20

(1) S - アデノシルメチオニン及び鉄(II)の存在下で、ヒスチジン及びセレノシスチンから下記式〔I〕

【化 3】



〔I〕

に示されるヘルシニルセレノシスチンを生成する反応を触媒する酵素

【0036】

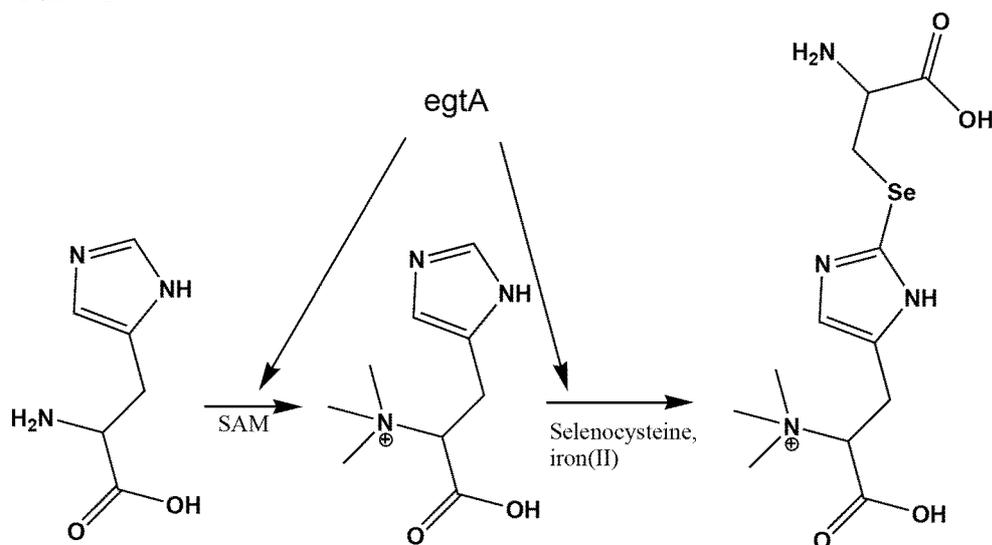
製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、外来遺伝子として挿入された酵素(1)をコードする遺伝子を過剰発現することにより、ヒスチジン及びセレン化合物から最終的にセレノネインを生成することができる。過剰発現する酵素(1)をコードする遺伝子は1種又は2種以上であり得る。

40

【0037】

本発明の技術的範囲はいかなる理論や推測に拘泥されるわけではないが、菌類の想定されるセレノネインの生合成系の一態様として、ヒスチジン及びセレノシスチンからヘルシニルセレノシスチンを生成する反応を模式的に表わすと下記式〔II〕

【化4】



【 I I 】

(式中、SAMはS - アデノシルメチオニンを表わす。)

のようになる。酵素(1)は式【 I I 】中のegtAに相当するものである。

【 0 0 3 8 】

製造方法の一実施態様で使用される形質転換体は、さらに下記(2)の酵素(以下、酵素(2)とよぶ。)をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体であることが好ましい。

(2)ピリドキサル 5' - リン酸を補酵素として、前記式【 I 】に示されるヘルシニルセレノシステインからセレノネインを生成する反応を触媒する酵素

【 0 0 3 9 】

製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、外来遺伝子として挿入された酵素(2)をコードする遺伝子を過剰発現することにより、ヘルシニルセレノシステインなどのセレノネイン前駆体からセレノネインを効率的に生成することができると考えられる。ただし、宿主生物が酵素(2)を十分に発現している場合は、酵素(2)をコードする遺伝子を挿入しなくともよい。過剰発現する酵素(2)をコードする遺伝子は1種又は2種以上であり得る。

【 0 0 4 0 】

製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、大きく、酵素(1)をコードする遺伝子を過剰発現し、かつ、酵素(2)をコードする遺伝子を過剰発現しないもの；及び、酵素(1)をコードする遺伝子を過剰発現し、かつ、酵素(2)をコードする遺伝子を過剰発現するものの2つの態様に分けられる。

【 0 0 4 1 】

(酵素(1)及び(2)の酵素学的性質)

酵素(1)は、上記式【 I I 】に示されているとおり、S - アデノシルメチオニン(SAM)に依存して、ヒスチジンを、-NH₂基がトリメチル化されたヘルシニンへ転換する反応を触媒し得る活性(以下、第1の活性とよぶ。)を有する。さらに、酵素(1)は、鉄(II)の存在下で、ヘルシニン及びセレノシステインからヘルシニルセレノシステインを生成する反応を触媒し得る活性(以下、第2の活性とよぶ。)を有する。したがって、酵素(1)は、第1及び第2の活性を有することにより、結果として、S - アデノシルメチオニン及び鉄(II)の存在下で、ヒスチジン及びセレノシステインからセレノネインを生成することができる。

【 0 0 4 2 】

酵素(2)は、ピリドキサル 5' - リン酸(PLP)を補酵素として、ヘルシニルセレノシステインからセレノネインを生成する反応を触媒し得る活性(以下、第3の活性と

20

30

40

50

よぶ。)を有する。

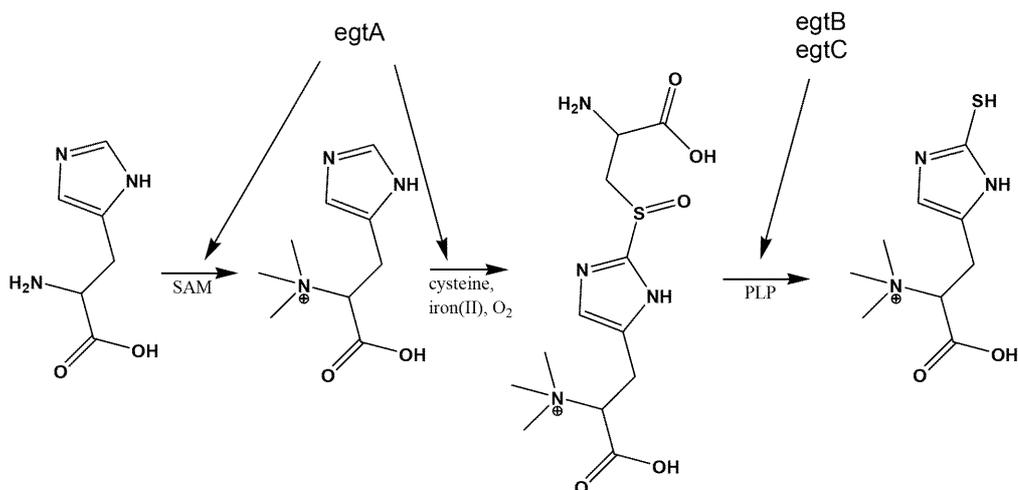
【0043】

製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を発現することによって、それぞれの酵素が活性化する条件において、ヒスチジン及びセレノシステインなどの有機セレン化合物から最終的にセレノネインを生産することができる。しかも、驚くべきことに、該形質転換体は、有機セレン化合物に限らず、亜セレン酸などの無機セレン化合物からもセレノネインを生産することができる。

【0044】

なお、酵素(1)及び酵素(2)はエルゴチオネインの生合成系でも使用され得る。菌類の想定されるエルゴチオネインの生合成系の一態様は下記式〔III〕

【化5】



〔III〕

(式中、SAMはS-アデノシルメチオニンを表わし、PLPはピリドキサル 5'-リン酸を表わす。)

のようになる。酵素(1)は式〔III〕中のegtAに相当するものであり、酵素(2)は式〔III〕中のegtB及び/又はegtCに相当するものである。

【0045】

(酵素(1)及び(2)の構造的性質)

酵素(1)は、上記した酵素学的性質を有するもの、すなわち、S-アデノシルメチオニン及び鉄(II)の存在下で、ヒスチジン及びセレノシステインからヘルシニルセレノシステインを生成する反応を触媒する活性を有するものであれば、アミノ酸配列、全体的及び部分的な立体構造、分子量などの構造的性質；最適pH、最適温度、失活条件などの生化学的性質；由来生物などによって特に限定されない。ただし、酵素(1)は、第1及び第2の活性を有するものであるために、第1の活性及び/又は第2の活性を有する酵素によく保存されている保存領域(ドメイン)を含むものであることが好ましい。

【0046】

第1の活性を有する酵素の保存領域としては、例えば、SAM依存型メチルトランスフェラーゼの保存領域が挙げられ、具体的には、ドメインDUF2260を含むSAM依存型メチルトランスフェラーゼドメインが挙げられる。また、第2の活性を有する酵素の保存領域としては、例えば、スルファターゼの保存領域が挙げられ、具体的には、ホルミルグリシン生成酵素(FGE)-スルファターゼドメインが挙げられる。第1及び第2の活性を有する酵素であるために、上記ドメインは一体的に連結されているものでなくともよく、例えば、ドメイン内に非保存領域が含まれていてもよい。また、酵素(1)は、SAM依存型メチルトランスフェラーゼの保存領域とスルファターゼの保存領域との間に、Di

10

30

40

50

n B__2ドメインを含むものであることが好ましく、鉄結合モチーフであるHX₃HXEを含むD i n B__2ドメインを含むものであることがより好ましい。

【0047】

例えば、酵素(1)の一態様は、SAM依存型メチルトランスフェラーゼの保存領域、D i n B__2ドメイン及びスルファターゼの保存領域を含む構造を有するものであり、酵素(1)の別の態様は、ドメインDUF2260を含むSAM依存型メチルトランスフェラーゼドメイン、HX₃HXEを含むD i n B__2ドメイン及びFGE-スルファターゼドメインを含む構造を有するものである。

【0048】

酵素(1)の好ましい態様は、非特許文献2に記載のNCU04343のアミノ酸配列との配列同一性が好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上、さらに好ましくは45%以上、なおさらに好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上であるアミノ酸配列を有するものである。なお、本明細書において「配列同一性」とは、2つの配列をアラインメントした場合の配列間の同一性(一致性; *I d e n t i t y*)を意味し、配列間の類似性(*S i m i r a l i t y*)を意味するものではない。酵素(1)の好ましい態様の具体例は、アクセッション番号(カッコ内の数値は配列番号4に記載のA s E g t Aタンパク質のアミノ酸配列をクエリーにしたB l a s t pの結果としての配列同一性を示す)がそれぞれXP__001727309.1(97%)、XP__002375556.1(97%)、XP__001211614.1(74%)、GAA90479.1(75%)、XP__001261027.1(72%)、XP__001275843.1(72%)、EDP55069.1(72%)、XP__755900.1(72%)、EHA24811.1(74%)、XP__001397117.2(73%)、EYE96655.1(72%)、CAK42541.1(71%)、XP__680889.1(69%)、EPS32723.1(66%)、GAD91762.1(63%)、EKV06018.1(63%)、XP__002487159.1(61%)、XP__002145387.1(61%)、CDM31097.1(62%)、XP__002623045.1(57%)、EQL36096.1(57%)、EEQ91012.1(57%)、XP__002794316.1(57%)、XP__002540839.1(57%)、XP__001246505.1(57%)、XP__003066681.1(56%)、EFW18329.1(56%)、EEH06820.1(56%)、XP__003172803.1(55%)、EGE82230.1(56%)、EGD95426.1(54%)、EZ F30391.1(54%)、EHY53149.1(53%)、XP__002844140.1(54%)、XP__003237555.1(54%)、EXJ78765.1(52%)、XP__001543980.1(53%)、EXJ84167.1(53%)、EXJ76804.1(51%)、ETI21425.1(52%)、EXJ55868.1(52%)、EKG13377.1(51%)、XP__003836988.1(51%)、EON60831.1(50%)、EGE08446.1(52%)、EMD86163.1(51%)、EUN21814.1(51%)、EMD69895.1(50%)、EME40669.1(52%)、EUC45427.1(51%)、EEH18365.1(52%)、XP__001939537.1(51%)、EUC28327.1(50%)、XP__003296645.1(50%)、EER38486.1(54%)、XP__007587632.1(50%)、EOA87110.1(50%)、EEH47303.1(54%)、EMC91772.1(51%)、EJT79063.1(50%)、XP__007289878.1(51%)、EMF09308.1(50%)、XP__007274188.1(49%)、XP__003849540.1(51%)、ENH83409.1(50%)、EQB47754.1(48%)、XP__006693510.1(51%)、ETN41916.1(50%)、XP__003711933.1(49%)、EWG46299.1(50%)、EGU87412.1(49%)、ESZ95365.1(48%)、EGC47631.1(52%)、EXM31381.1(49%)、EXL83373.1(49%)、XP__38582

3 . 1 (5 0 %)、 E M T 7 0 0 5 4 . 1 (5 0 %)、 E X K 9 5 3 1 3 . 1 (4 9 %)、 C C T 7 1 8 6 0 . 1 (5 0 %)、 E X M 0 4 8 6 7 . 1 (4 9 %)、 E X A 3 8 5 3 1 . 1 (4 9 %)、 E W Z 3 4 5 7 7 . 1 (4 9 %)、 E W Y 8 7 1 0 2 . 1 (4 9 %)、 E N H 7 0 5 8 5 . 1 (4 9 %)、 E Y B 2 9 6 6 1 . 1 (5 0 %)、 E X K 3 7 2 1 9 . 1 (4 9 %)、 E W Z 9 5 3 2 3 . 1 (4 9 %)、 E G Y 2 0 6 1 3 . 1 (4 9 %)、 E M E 7 8 6 7 1 . 1 (5 0 %)、 E K J 7 3 6 2 3 . 1 (5 0 %)、 E F Q 3 0 7 0 1 . 1 (4 8 %)、 E P E 0 9 9 7 7 . 1 (4 8 %)、 E X V 0 6 6 2 4 . 1 (4 9 %)、 E R S 9 9 8 5 2 . 1 (4 9 %)、 E G O 5 9 4 6 2 . 1 (4 9 %)、 X P _ 0 0 3 3 4 8 7 8 0 . 1 (4 8 %)、 E F Y 9 9 9 2 7 . 1 (4 9 %)、 X P _ 0 0 7 5 9 4 9 1 5 . 1 (4 7 %)、 X P _ 0 0 3 6 6 0 7 5 2 . 1 (4 9 %)、 E A A 2 7 0 8 8 . 3 (4 9 %)、 E R F 6 8 2 7 9 . 1 (4 9 %)、 E F X 0 4 4 2 9 . 1 (5 0 %)、 E T R 9 8 6 7 6 . 1 (4 9 %)、 E F Y 8 4 3 4 0 . 1 (4 8 %)、 X P _ 0 0 6 9 6 8 6 2 0 . 1 (4 8 %)、 X P _ 0 0 3 0 4 8 8 8 4 . 1 (4 9 %)、 E H K 2 0 8 3 2 . 1 (4 9 %)、 E P E 2 4 4 1 3 . 1 (4 9 %)、 E J P 6 2 9 6 2 . 1 (4 9 %)、 E T S 8 3 7 4 0 . 1 (4 8 %)、 E H K 4 5 9 8 9 . 1 (4 9 %)、 E L Q 6 4 9 0 4 . 1 (4 7 %)、 X P _ 0 0 6 6 7 2 5 5 5 . 1 (4 8 %)、 E L Q 4 0 0 0 7 . 1 (4 6 %)、 E X L 8 3 3 7 5 . 1 (5 0 %)、 E X K 9 5 3 1 5 . 1 (5 0 %)、 C C E 3 3 5 9 1 . 1 (4 8 %)、 E X M 0 4 8 6 9 . 1 (5 1 %)、 E X A 3 8 5 3 3 . 1 (5 0 %)、 E W Z 9 5 3 2 5 . 1 (5 0 %)、 E X K 3 7 2 2 1 . 1 (5 0 %)、 E W Z 3 4 5 7 9 . 1 (5 0 %)、 E W Y 8 7 1 0 4 . 1 (5 0 %)、 C C X 3 1 7 5 4 . 1 (4 7 %)、 X P _ 9 5 6 3 2 4 . 2 (4 6 %) 及び X P _ 9 5 6 3 2 4 . 2 (4 6 %) であるタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。上記のうち、例えば、アクセッション番号が X P _ 0 0 1 7 2 7 3 0 9 . 1 (9 7 %) であるタンパク質は配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質である。また、アクセッション番号が X P _ 0 0 1 3 9 7 1 1 7 . 2 (7 3 %) であるタンパク質は、アスペルギルス・ニガー由来のものでありながら、アスペルギルス・ソーヤにおいて発現並びに上記第 1 及び第 2 の活性を有することを確認している。これらのことより、A s E g t A タンパク質のアミノ酸配列との配列同一性が 4 0 % 以上、好ましくは 5 0 % 以上、より好ましくは 7 0 % 以上であるアミノ酸配列を有する、メチルトランスフェラーゼである、又はメチルトランスフェラーゼと推定される (m e t h y l t r a n s f e r a s e , p u t a t i v e) アミノ酸配列やメチルトランスフェラーゼとみなされる理論的タンパク質 (h y p o t h e t i c a l p r o t e i n) のアミノ酸配列を有するタンパク質は酵素 (1) として利用し得る。

【 0 0 4 9 】

酵素 (2) もまた、上記した酵素学的性質を有するもの、すなわち、ピリドキサル 5 ' - リン酸 (P L P) を補酵素として、ヘルシニルセレノシステインからセレノネインを生成する反応を触媒する活性を有するものであれば、構造的性質、生化学的性質及び由来生物などによって特に限定されない。ただし、酵素 (2) は、第 3 の活性を有するものであるために、第 3 の活性を有する酵素によく保存されている保存領域 (ドメイン) を含むものであることが好ましい。

【 0 0 5 0 】

第 3 の活性を有する酵素の保存領域としては、例えば、P L P 結合型システイン・デスルフラゼドメインが挙げられる。酵素 (2) としては、ベロらの文献 (B e l l o M H e t a l . , F u n g a l G e n e t B i o l . 2 0 1 2 F e b ; 4 9 (2) : 1 6 0 - 7 2、該文献の全記載はここに開示として援用される) に記載の N C U 0 4 6 3 6 との配列同一性が 7 5 % 程度である P L P 結合型システイン・デスルフラゼドメインを含む構造を有するものと非特許文献 2 に記載の N C U 1 1 3 6 5 との配列同一性が 4 4 % 程度である P L P 結合型システイン・デスルフラゼドメインを含む構造を有するものという少なくとも構造的に 2 種類のものであり得る。酵素 (2) は、これら 2 種類のうちいずれか 1 種のものであってもよく、両方であってもよい。

【 0 0 5 1 】

(酵素 (1) 及び (2) のアミノ酸配列)

酵素 (1) 及び (2) は、上記した酵素学的性質、好ましくは上記した酵素学的性質及び構造的性質を有するものであれば、アミノ酸配列については特に限定されない。例えば、上記した酵素学的性質及び構造的性質を有する酵素 (1) の一態様として配列番号 4 に示すアミノ酸配列があり、上記した酵素学的性質及び構造的性質を有する酵素 (2) の一態様として配列番号 5 及び 6 に示すアミノ酸配列がある。これら配列番号 4 ~ 6 に示すアミノ酸配列を有する酵素は、すべてアスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*) に由来するものであり、本発明者らによりそれぞれ A s E g t A、A s E g t B 及び A s E g t C タンパク質と名付けられる。また、これらの酵素をコードする遺伝子の塩基配列は配列番号 1 ~ 3 に示す塩基配列である。

10

【 0 0 5 2 】

同様に、上記した酵素学的性質及び構造的性質を有する酵素 (1) の一態様として配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列がある。この配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列を有する酵素は、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) に由来するものであり、本発明者らにより A o E g t A タンパク質と名付けられる。また、該酵素をコードする遺伝子の塩基配列は配列番号 2 3 に示す塩基配列である。

【 0 0 5 3 】

A s E g t A、A s E g t B 及び A s E g t C タンパク質は、アスペルギルス・ソーヤの染色体 DNA 上に存在するこれらの酵素をコードする遺伝子によってコードされるものである。また、A o E g t A タンパク質は、アスペルギルス・オリゼの染色体 DNA 上に存在する該酵素をコードする遺伝子によってコードされるものである。このような由来生物の染色体 DNA 上に存在する遺伝子及び該遺伝子によってコードされるタンパク質や酵素を、それぞれ「野生型遺伝子」及び「野生型タンパク質」や「野生型酵素」と本明細書ではよぶ場合がある。

20

【 0 0 5 4 】

酵素 (1) 及び (2) のアミノ酸配列は、それぞれ上記した酵素 (1) 及び (2) の酵素学的性質を有するものであれば、野生型酵素が有するアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などを有するアミノ酸配列からなるものであってもよい。ここで、アミノ酸配列の「1 から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加」における「1 から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個、好ましくは 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個程度、より好ましくは 1、2、3、4 又は 5 個程度を意味する。また、「アミノ酸の欠失」とは配列中のアミノ酸残基の欠落又は消失を意味し、「アミノ酸の置換」は配列中のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置き換えられていることを意味し、「アミノ酸の付加」とは配列中に新たなアミノ酸残基が挿入するように付け加えられていることを意味する。

30

【 0 0 5 5 】

「1 から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加」の具体的な態様としては、1 から数個のアミノ酸が別の化学的に類似したアミノ酸で置き換えられた態様がある。例えば、ある疎水性アミノ酸を別の疎水性アミノ酸に置換する場合、ある極性アミノ酸を同じ電荷を有する別の極性アミノ酸に置換する場合などを挙げることができる。このような化学的に類似したアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において知られている。具体例を挙げると、非極性 (疎水性) アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性 (中性) アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ塩基性アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ酸性アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

40

【 0 0 5 6 】

野生型酵素が有するアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加など

50

を有するアミノ酸配列としては、野生型酵素が有するアミノ酸配列と一定以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられ、例えば、野生型酵素が有するアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%又は99%以上、さらに好ましくは99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

【0057】

(酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子)

酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子は、上記した酵素学的性質、好ましくは上記した酵素学的性質及び構造的性質を有する酵素(1)及び(2)が有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものであれば特に限定されない。酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子が形質転換体内で過剰発現することにより酵素(1)及び(2)が生産される。本明細書における「遺伝子の発現」とは、転写や翻訳などを介して、遺伝子によってコードされる酵素が本来の触媒活性を有する態様で生産されることを意味する。また、本明細書における「遺伝子の過剰発現」とは、遺伝子が挿入されたことにより、宿主生物が本来発現する量を超えて、該遺伝子によってコードされるタンパク質(酵素)が生産されることを意味する。

【0058】

酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子は、宿主生物に導入された際に、該遺伝子の転写後にスプライシングを経由して酵素(1)及び(2)を生成し得る遺伝子であっても、該遺伝子の転写後にスプライシングを経由せずに酵素(1)及び(2)を生成し得る遺伝子であっても、どちらでもよい。

【0059】

酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子は、由来生物が本来保有する遺伝子(すなわち、野生型遺伝子)と完全に同一でなくともよく、少なくとも上記した酵素学的性質を有する酵素をコードする遺伝子である限り、野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAであってもよい。

【0060】

本明細書における「ストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、野生型遺伝子の塩基配列を有するDNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味する。

【0061】

本明細書における「ストリンジентな条件」とは、特異的なハイブリッドのシグナルが非特異的なハイブリッドのシグナルと明確に識別される条件であり、使用するハイブリダイゼーションの系と、プローブの種類、配列及び長さによって異なる。そのような条件は、ハイブリダイゼーションの温度を変えること、洗浄の温度及び塩濃度を変えることにより決定可能である。例えば、非特異的なハイブリッドのシグナルまで強く検出されてしまう場合には、ハイブリダイゼーション及び洗浄の温度を上げるとともに、必要により洗浄の塩濃度を下げることにより特異性を上げることができる。また、特異的なハイブリッドのシグナルも検出されない場合には、ハイブリダイゼーション及び洗浄の温度を下げるるとともに、必要により洗浄の塩濃度を上げることにより、ハイブリッドを安定化させることができる。

【0062】

ストリンジентな条件の具体例としては、例えば、プローブとしてDNAプローブを用い、ハイブリダイゼーションは、 $5 \times S S C$ 、 1.0% (w/v) 核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬(ベーリング・マンハイム社)、 0.1% (w/v) N-ラウロイルサルコシン、 0.02% (w/v) SDSを用い、一晚(8~16時間程度)で行う。洗浄は、 $0.1 \sim 0.5 \times S S C$ 、 0.1% (w/v) SDS、好ましくは $0.1 \times S S C$ 、 0.1% (w/v) SDSを用い、15分間、2回行う。ハイブリダイゼーションおよび洗浄を行う温度は65以上、好ましくは68以上である。

【0063】

また、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAとしては、例えば、コロニー若しくはブランク由来の野生型遺伝子の塩基配列を有するDNA又は該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、上記したストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションすることによって得られるDNAや0.5~2.0MのNaCl存在下にて、40~75℃でハイブリダイゼーションを実施した後、好ましくは0.7~1.0MのNaCl存在下にて、65℃でハイブリダイゼーションを実施した後、0.1~1×SSC溶液(1×SSC溶液は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAなどを挙げるができる。プローブの調製やハイブリダイゼーションの方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd-Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, John Wiley & Sons, 1987-1997(以下、これらの文献を参考技術文献とよぶ。これらの文献の全記載はここに開示として援用される)などに記載されている方法に準じて実施することができる。なお、当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度や温度などの条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブ長さ、反応時間などの諸条件を加味して、野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを得るための条件を適宜設定することができる。

【0064】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むDNAとしては、プローブとして使用する野生型遺伝子の塩基配列を有するDNAの塩基配列と一定以上の配列同一性を有するDNAが挙げられ、例えば、野生型遺伝子の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%又は99%以上、さらに好ましくは99.5%以上の配列同一性を有するDNAが挙げられる。

【0065】

野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列としては、例えば、野生型遺伝子の塩基配列において1から数個、好ましくは1から50個、より好ましくは1から30個、さらに好ましくは1から20個、なおさらに好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の塩基の欠失、置換、付加などを有する塩基配列を含む。ここで、「塩基の欠失」とは配列中の塩基に欠落又は消失があることを意味し、「塩基の置換」は配列中の塩基が別の塩基に置き換えられていることを意味し、「塩基の付加」とは新たな塩基が挿入するように付け加えられていることを意味する。

【0066】

野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によってコードされる酵素は、野生型遺伝子の塩基配列によってコードされる酵素が有するアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などを有するアミノ酸配列を有する酵素である蓋然性があるが、野生型遺伝子の塩基配列によってコードされる酵素と同じ酵素活性を有するものである。

【0067】

(配列同一性を算出するための手段)

塩基配列やアミノ酸配列の配列同一性を求める方法は特に限定されないが、例えば、通常知られる方法を利用して、野生型遺伝子や野生型遺伝子によってコードされる酵素のアミノ酸配列と対象となる塩基配列やアミノ酸配列とをアラインメントし、両者の配列の一致率を算出するためのプログラムを用いることにより求められる。

【0068】

10

20

30

40

50

2つのアミノ酸配列や塩基配列における一致率を算出するためのプログラムとしては、例えば、Karlin及びAltschulのアルゴリズム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)が知られており、このアルゴリズムを用いたBLASTプログラムがAltschulなどによって開発されている(J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。さらに、BLASTより感度よく配列同一性を決定するプログラムであるGapped BLASTも知られている(Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997)。したがって、当業者は例えば上記のプログラムを利用して、与えられた配列に対し、高い配列同一性を示す配列をデータベース中から検索することができる。これらは、例えば、米国National Center for Biotechnology Informationのインターネット上のウェブサイト(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)において利用可能である。

【0069】

上記の各方法は、データベース中から配列同一性を示す配列を検索するために通常的に用いられ得るが、個別の配列の配列同一性を決定する手段としては、Genetyxネットワーク版 version 12.0.1(ゼネティックス社)のホモロジー解析を用いることもできる。この方法は、Lipman-Pearson法(Science 227:1435-1441, 1985)に基づくものである。塩基配列の配列同一性を解析する際は、可能であればタンパク質をコードしている領域(CDS又はORF)を用いる。

【0070】

(酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の由来)

酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子は、例えば、セレノネイン生産能又はエルゴチオネイン生産能がある生物種や酵素(1)及び(2)の発現が見られる生物種などに由来する。酵素(1)及び(2)の酵素をコードする遺伝子の由来生物としては、例えば、微生物が挙げられる。微生物の中でも糸状菌はエルゴチオネイン生産能があることが知られている菌種が多いことから好ましい。糸状菌の具体例としては、アスペルギルス(Aspergillus)属糸状菌が挙げられ、より具体的にはアスペルギルス・ソーヤ(Aspergillus sojae)、アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、アスペルギルス・タマリ(Aspergillus tamarisii)、アスペルギルス・アワモリ(Aspergillus awamori)、アスペルギルス・ウサミ(Aspergillus usamii)、アスペルギルス・カワチ(Aspergillus kawachii)、アスペルギルス・サイトイ(Aspergillussaitoi)などが挙げられる。

【0071】

上記アスペルギルス属糸状菌の具体例として挙げたアスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・タマリ、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・ウサミ、アスペルギルス・カワチ及びアスペルギルス・サイトイは、味噌、醤油、日本酒、焼酎などの醸造食品の製造、クエン酸製造、アミラーゼなどの酵素剤製造への使用実績が豊富であり、高い酵素生産性と長年の利用による安全性に対する高い信頼性とから、産業上利用可能な微生物である。

【0072】

上記のとおり、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の由来生物は特に限定されないが、形質転換体において発現される酵素(1)及び(2)は、宿主生物の生育条件によって不活化せず、又はそれぞれの活性を示す蓋然性がある。そこで、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の由来生物は、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を挿入することによって形質転換すべき宿主生物と生育条件が近似する微生物であることが好ましい。

【0073】

(遺伝子工学的的手法による酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子のクローニング)
酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子は、適当な公知の各種ベクター中に挿入することができる。さらに、このベクターを適当な公知の宿主生物に導入して、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を含む組換えベクター(組換え体DNA)が導入された形質転換体を作製できる。酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の取得方法や、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子配列、酵素(1)及び(2)のアミノ酸配列情報の取得方法、各種ベクターの作製方法や形質転換体の作製方法などは、当業者にとって適宜選択することができる。また、本明細書では、形質転換や形質転換体にはそれぞれ形質導入や形質導入体を包含する。酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子のクローニングの一例を非限定的に後述する。 10

【0074】

酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子をクローニングするには、通常一般的に用いられている遺伝子のクローニング方法を適宜用いることができる。例えば、酵素(1)及び(2)の生産能を有する微生物や種々の細胞から、常法、例えば、参考技術文献に記載の方法により、染色体DNAやmRNAを抽出することができる。抽出したmRNAを鋳型としてcDNAを合成することができる。このようにして得られた染色体DNAやcDNAを用いて、染色体DNAやcDNAのライブラリーを作製することができる。

【0075】

例えば、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子は、該遺伝子を有する微生物由来の染色体DNAやcDNAを鋳型としたクローニングにより得ることができる。酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の由来生物は上記したとおりのものであり、具体的な例としては、アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株やアスペルギルス・オリゼRIB40株を挙げることができる。例えば、アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株を培養し、得られた菌体から水分を取り除き、液体窒素中で冷却しながら乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の菌体片とし、該菌体片から通常の方法により染色体DNA画分を抽出する。染色体DNA抽出操作には、DNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)などの市販の染色体DNA抽出キットが利用できる。 20

【0076】

次いで、前記染色体DNAを鋳型として、5'末端配列及び3'末端配列に相補的な合成プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」と表記する)を行うことにより、DNAを増幅する。プライマーとしては、該遺伝子を含むDNA断片の増幅が可能であれば特に限定されない。その例としては、アスペルギルス・ソーヤのゲノム配列を参考として設計した配列番号17~22で表されるプライマーなどが挙げられる。なお、これらのプライマーを用いると、目的遺伝子全長が増幅されるので、RACEを省略できる。別の方法として、5'RACE法や3'RACE法などの適当なPCRにより、目的の遺伝子断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の目的遺伝子を含むDNAを得ることができる。 30

【0077】

また、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されず、遺伝子工学的的手法によらなくとも、例えば、化学合成法を用いて酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を構築することが可能である。 40

【0078】

PCRにより増幅された増幅産物や化学合成した遺伝子における塩基配列の確認は、例えば、次のように行うことができる。まず、配列を確認したいDNAを通常の方法に準じて適当なベクターに挿入して組換え体DNAを作製する。ベクターへのクローニングには、TA Cloning Kit(インビトロジェン社)などの市販のキット; pUC119(タカラバイオ社)、pUC18(タカラバイオ社)、pBR322(タカラバイオ社)、pBluescript SK+(ストラタジーン社)、pYES2/CT(インビトロジェン社)などの市販のプラスミドベクターDNA; EMBL3(ストラタジーン 50

社)などの市販のバクテリオファージベクターDNAが使用できる。該組換え体DNAを用いて、宿主生物、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、好ましくは大腸菌 JM109株(タカラバイオ社)や大腸菌 DH5 株(タカラバイオ社)を形質転換する。得られた形質転換体に含まれる組換え体DNAを、QIAGEN Plasmid Mini Kit(キアゲン社)などを用いて精製する。

【0079】

該組換え体DNAに挿入されている各遺伝子の塩基配列の決定は、ジデオキシ法(Methods in Enzymology、101、20-78、1983)などにより行う。塩基配列の決定の際に使用する配列解析装置は特に限定されないが、例えば、LICOR MODEL 4200Lシークエンサー(アロカ社)、370DNAシークエンスシステム(パーキンエルマー社)、CEQ2000XL DNAアナリシスシステム(ベックマン社)などが挙げられる。そして、決定された塩基配列を元に、翻訳されるタンパク質、すなわち、酵素(1)及び(2)のアミノ酸配列を知り得る。

【0080】

(酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を含む組換えベクターの構築)

酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を含む組換えベクター(組換え体DNA)は、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子のいずれかを含むPCR増幅産物と各種ベクターとを、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の発現が可能な形で結合することにより構築することができる。例えば、適当な制限酵素で酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子のいずれかを含むDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な制限酵素で切断したプラスミドと連結することにより構築することができる。または、プラスミドと相同的な配列を両末端に付加した該遺伝子を含むDNA断片と、インバースPCRにより増幅したプラスミド由来のDNA断片とを、In-Fusion HD Cloning Kit(クロンテック社)などの市販の組換えベクター作製キットを用いて連結させることにより得ることができる。

【0081】

(形質転換体の作製方法)

製造方法の一実施態様に用いられる形質転換体の作製方法は特に限定されず、例えば、常法に従って、酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子が発現する態様で宿主生物に挿入する方法が挙げられる。具体的には、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子のいずれかを発現誘導プロモーター及びターミネーターの間に挿入したDNAコンストラクトを作製し、次いで酵素(1)をコードする遺伝子を含むDNAコンストラクトのみ又は酵素(1)をコードする遺伝子を含むDNAコンストラクト及び酵素(2)をコードする遺伝子を含むDNAコンストラクトの両方で宿主生物を形質転換することにより、酵素(1)をコードする遺伝子のみ又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の両方を過剰発現する形質転換体を得られる。本明細書では、宿主生物を形質転換するために作製された、発現誘導プロモーター-酵素(1)又は(2)をコードする遺伝子-ターミネーターからなるDNA断片及び該DNA断片を含む組換えベクターをDNAコンストラクトと総称してよぶ。

【0082】

酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子が発現する態様で宿主生物に挿入する方法は特に限定されないが、例えば、相同組換えを利用することにより宿主生物の染色体上に直接的に挿入する手法; プラスミドベクター上に連結することにより宿主生物内に導入する手法などが挙げられる。

【0083】

相同組換えを利用する方法では、染色体上の組換え部位の上流領域及び下流領域と相同な配列の間に、DNAコンストラクトを連結し、宿主生物のゲノム中に挿入することができる。自身の高発現プロモーター制御下で宿主生物内で過剰発現することにより、セルフクロニングによる形質転換体を得ることができる。高発現プロモーターは特に限定されないが、例えば、翻訳伸長因子であるTEF1遺伝子(*tef1*)のプロモーター領域、

- アミラーゼ遺伝子 (amy) のプロモーター領域、アルカリプロテアーゼ遺伝子 (alp) プロモーター領域などが挙げられる。

【0084】

ベクターを利用する方法では、DNAコンストラクトを、常法により、宿主微生物の形質転換に用いられるプラスミドベクターに組み込み、対応する宿主生物を常法により形質転換することができる。

【0085】

そのような、好適なベクター - 宿主系としては、宿主生物中で酵素(1)又は酵素(1)及び(2)を生産させ得る系であれば特に限定されず、例えば、pUC19及び糸状菌の系、pSTA14 (Mol. Gen. Genet. 218, 99-104, 1989)及び糸状菌の系などが挙げられる。

【0086】

DNAコンストラクトは宿主生物の染色体に導入して用いることが好ましいが、この他の方法として、自律複製型のベクター (Ozeki et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 1133 (1995)) にDNAコンストラクトを組み込むことにより、染色体に導入しない形で用いることもできる。

【0087】

DNAコンストラクトには、形質転換された細胞を選択することを可能にするためのマーカー遺伝子が含まれていてもよい。マーカー遺伝子は特に限定されず、例えば、pyrG、niaD、adeAのような、宿主生物の栄養要求性を相補する遺伝子；ピリチアミン、ハイグロマイシンBオリゴマイシンなどの薬剤に対する薬剤耐性遺伝子などが挙げられる。また、DNAコンストラクトは、宿主生物中で酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を過剰発現することを可能にするプロモーター、ターミネーターその他の制御配列 (例えば、エンハンサー、ポリアデニル化配列など) を含むことが好ましい。プロモーターは特に限定されないが、適当な発現誘導プロモーターや構成的プロモーターが挙げられ、例えば、tef1プロモーター、alpプロモーター、amyプロモーターなどが挙げられる。ターミネーターもまた特に限定されないが、例えば、alpターミネーター、amyターミネーター、tef1ターミネーターなどが挙げられる。

【0088】

DNAコンストラクトにおいて、酵素(1)又は(2)をコードする遺伝子の発現制御配列は、挿入する酵素(1)又は(2)をコードする遺伝子を含むDNA断片が、発現制御機能を有している配列を含む場合は必ずしも必要ではない。また、共形質転換法により形質転換を行う場合には、DNAコンストラクトはマーカー遺伝子を有しなくてもよい場合がある。

【0089】

DNAコンストラクトには精製のためのタグをつけることができる。例えば、酵素(1)又は(2)をコードする遺伝子の上流又は下流に適宜リンカー配列を接続し、ヒスチジンをコードする塩基配列を6コドン以上接続することにより、ニッケルカラムを用いた精製を可能にすることができる。

【0090】

DNAコンストラクトの一実施態様は、例えば、pUC19のマルチクローニングサイトにあるIn-Fusion Cloning Siteに、tef1遺伝子プロモーター、酵素(1)又は(2)をコードする遺伝子、alp遺伝子ターミネーター及びpyrGマーカー遺伝子を連結させたDNAコンストラクトである。

【0091】

糸状菌への形質転換方法としては、当業者に知られる方法を適宜選択することができる。例えば、宿主生物のプロトプラストを調製した後に、ポリエチレングリコール及び塩化カルシウムを用いるプロトプラストPEG法 (例えば、Mol. Gen. Genet. 218, 99-104, 1989、特開2007-222055号公報などを参照) を用いることができる。形質転換体を再生させるための培地は、用いる宿主生物と形質転換マーカー

遺伝子とに応じて適切なものを用いる。例えば、宿主生物としてアスペルギルス・ソーヤを用い、形質転換マーカー遺伝子として *pyrG* 遺伝子を用いた場合は、形質転換体の再生は、例えば、0.5%寒天及び1.2Mソルビトールを含む *Czapek-Dox* 最少培地（ディフコ社）で行うことができる。

【0092】

また、例えば、製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体を得るために、相同組換えを利用して、宿主生物が本来染色体上に有する酵素（1）又は酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子のプロモーターを *tef1* などの高発現プロモーターへ置換してもよい。この際も、高発現プロモーターに加えて、*pyrG* などの形質転換マーカー遺伝子を挿入することが好ましい。例えば、この目的のために、特開2011-239681に記載の実施例1や図1を参照して、酵素（1）又は（2）をコードする遺伝子上流領域 - 形質転換マーカー遺伝子 - 高発現プロモーター - 酵素（1）若しくは（2）をコードする遺伝子の全部又は部分からなる形質転換用カセットなどが利用できる。この場合、酵素（1）又は（2）をコードする遺伝子上流領域及び酵素（1）若しくは（2）をコードする遺伝子の全部又は部分が相同組換えのために利用される。酵素（1）若しくは（2）をコードする遺伝子の全部又は部分は、開始コドンから途中の領域を含むものが使用できる。相同組換えに適した領域の長さは0.5kb以上あることが好ましい。

【0093】

形質転換体が作製されたことの確認は、酵素（1）又は酵素（1）及び（2）の酵素活性が認められる条件下で形質転換体を培養し、次いで培養後に得られた培養物におけるセレノネインが検出されること、又は検出されたセレノネインの量が、同じ条件下で培養した宿主生物の培養物におけるセレノネインの量よりも多いことを確認することにより行うことができる。

【0094】

また、製造方法の一実施態様に用いられる形質転換体が作製されたことの確認は、形質転換体から染色体DNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行い、形質転換が起きた場合に増幅が可能なPCR産物が生じることを確認することにより行ってよい。

【0095】

例えば、用いたプロモーターの塩基配列に対するフォワードプライマーと、形質転換マーカー遺伝子の塩基配列に対するリバースプライマーとの組み合わせでPCRを行い、想定長さの産物が生じることを確認する。

【0096】

相同組み換えにより形質転換を行う場合には、用いた上流側の相同領域より上流に位置するフォワードプライマーと、用いた下流側の相同領域より下流に位置するリバースプライマーとの組み合わせでPCRを行い、相同組み換えが起きた場合に想定される長さの産物が生じることを確認することが好ましい。

【0097】

（宿主生物）

宿主生物としては、酵素（1）をコードする遺伝子を含むDNAコンストラクト又は酵素（1）をコードする遺伝子を含むDNAコンストラクト及び酵素（2）をコードする遺伝子を含むDNAコンストラクトによる形質転換により、酵素（1）又は酵素（1）及び（2）を生産することができる微生物であれば特に限定されないが、例えば、セレン化合物の有毒性の観点からセレンを代謝できる微生物が挙げられ、セレン酸レダクターゼ（*EC 1.97.1.9*）、セレンシステインリアーゼ（*EC 4.4.1.16*）若しくはセリンデヒドラターゼ（*EC 4.3.1.17*）又はこれらの2種以上の酵素を発現する微生物であることが好ましく、アスペルギルス（*Aspergillus*）属微生物、エシェリキア（*Escherichia*）属微生物、トリコデルマ（*Trichoderma*）属微生物、フザリウム（*Fusarium*）属微生物、ペニシリウム（*Penicillium*）属微生物、クモノスカビ（*Rhizopus*）属微生物、アカパンカビ（*Neurospora*）属微生物などの糸状菌、光合成微生物及びプロバイオティック微生物など

がより好ましい。

【0098】

例えば、アシネトバクター属微生物 (Acinetobacter)、アエロモナス属微生物 (Aeromonas)、アルスロバクター属微生物 (Arthrobacter)、バチルス属微生物 (Bacillus)、カンジダ属微生物 (Candida)、セファロスポリウム属微生物 (Cephalosporium)、シトロバクター属微生物 (Citrobacter)、コリネバクテリウム属微生物 (Corynebacterium)、フラボバクテリウム属微生物 (Flavobacterium)、フサリウム属微生物 (Fusarium)、ミクロコッカス属微生物 (Micrococcus)、ニューロスポラ属微生物 (Neurospora)、ペニシリウム属微生物 (Penicillium)、シュードモナス属微生物 (Pseudomonas)、サルモネラ属微生物 (Salmonella)、スコプラリオプシス属微生物 (Scopulariopsis)、セレノモナス属微生物 (Selenomonas) などの微生物には、セレン化合物を酸化又は還元する能力があることが知られている (D. T. MAIERS et al., APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 1988, p. 2591 - 2593 を参照)。特に、タウエラ・セレナティス (Thauera selenatis)、大腸菌 (Escherichia coli)、エンテロバクター・クロアカエ (Enterobacter cloacae) 及びバチルス・セレナタルセナティス (Bacillus selenatarsenatis) からは、セレン酸還元酵素又は該酵素をコードする遺伝子が見出されている (阪口利文、「セレンオキシニオン還元酵素とその遺伝子」、バイオメディア、2012年第3号、p. 133 を参照)。また、アルカリジェネス・ヴィスコラクティス (Alcaligenes viscolactis)、エシェリキア・フロインディ (Escherichia freundii)、コリネバクテリウム・シュードディフテリティカム (Corynebacterium pseudodiphtheriticum)、シュードモナス・アルカノリティカ (Pseudomonas alkanolytica)、ブレヴィバクテリウム・ロイシノファガム (Brevibacterium leucinophagum)、エシェリキア・コリ (Escherichia coli)、アーウィニア・カロトヴォラ (Erwinia carotovora)、セラチア・マルセセンス (Serratia marcescens)、アルカリジェネス・ブッカー (Alcaligenes bookeri)、アスペルギルス・フィキューム (Aspergillus ficuum)、アスペルギルス・ソーヤ (Aspergillus sojae)、アブシディア・コリピフェラ (Absidia corymbifera)、ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa)、ペニシリウム・エクспанサム (Penicillium expansum)、サッカロミセス・セルピシエ (Saccharomyces cerevisiae)、クルイベロミセス・フラギリス (Kluyveromyces fragilis)、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、ハンセヌラ・ベッキー (Hansenula beckii)、シュワニオミセス・オクシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis) にもまたセレノシステインリアーゼ活性を有すること、又は該活性を有する可能性があることが知られている (PATRICK CHOCAT et al., JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Oct. 1983, p. 455 - 457 を参照)。そこで、これらの微生物を宿主生物として使用することができる。また、これらに限らず、セレン代謝遺伝子を強化又は異種発現させたものを宿主生物とすることができる。さらに酵素(1)をコードする遺伝子又は酵素(2)をコードする遺伝子の由来生物とすることができる蓋然性がある。

【0099】

これらの中でも、エルゴチオネインの生産が認められる糸状菌や酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子をゲノムDNA上に有する糸状菌がさらに好ましい。糸状菌の具体例としては、ドナルドらの文献 (Donald B. Melville et al, J. B

iol. Chem. 1956, 223: 9-17、該文献の全記載はここに開示として援用される)やドロシーらの文献(Dorothy S. Genghof, J. Bacteriology, Aug. 1970, p. 475-478、該文献の全記載はここに開示として援用される)に記載の糸状菌が挙げられ、例えば、アスペルギルス属、ニューロスポラ属、ペニシリウム属、フザリウム(Fusarium)属、トリコデルマ(Trichoderma)属、ムコール(Mucor)属などに属する糸状菌が挙げられる。酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子をゲノムDNA上に有する糸状菌としては、例えば、ネオサルトリア(Neosartorya)属、ビソクラミス(Byssochlamys)属、タラロミセス(Talaromyces)属、アジェロミセス(Ajellomyces)属、パラコッシデオイデス(Paracoccidioides)属、アンシノカルプス(Uncinocarpus)属、コッシデオイデス(Coccidioides)属、アルフロデルマ(Arthroderma)属、トリコフィトン(Trichophyton)属、エクソフィラ(Exophiala)属、カプロニア(Capronia)属、クラドフィアロフォラ(Cladophialophora)属、マクロホミナ(Macrophomina)属、レプトスファエリア(Leptosphaeria)属、ビポラリス(Bipolaris)属、ドチストローマ(Dothistroma)属、ピレノフォラ(Pyrenophora)属、ネオフシコッカム(Neofusicoccum)属、セトスファエリア(Setosphaeria)属、バウドイニア(Baudoinia)属、ガエウマノミセス(Gaeumannomyces)属、マルツソニナ(Marssonina)属、スファエルリナ(Sphaerulina)属、スクレロチニア(Sclerotinia)属、マグナポルセ(Magnaporthe)属、ヴェルチシリウム(Verticillium)属、シュードセルコスボラ(Pseudocercospora)属、コレトトリカム(Colletotrichum)属、オフィオストーマ(Ophiostoma)属、メタルヒジウム(Metarhizium)属、スポロスリックス(Sporothrix)属、ソルダリア(Sordaria)属などに属する糸状菌などが挙げられる。

【0100】

糸状菌の中でも、安全性や培養の容易性を加味すれば、上記に酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の由来生物として挙げた、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・タマリ、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・ウサミ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・サイトイなどのアスペルギルス属微生物であることが好ましい。

【0101】

(酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の具体例)

アスペルギルス・ソーヤNBRC 4239株由来の酵素(1)をコードする遺伝子としては、例えば、後述する実施例に記載がある遺伝子AsEgtAが挙げられる。また、アスペルギルス・ソーヤNBRC 4239株由来の酵素(2)をコードする遺伝子としては、例えば、後述する実施例に記載がある遺伝子AsEgtB及びAsEgtCが挙げられる。遺伝子AsEgtA、AsEgtB及びAsEgtCの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号1~3として示す。また、AsEgtA、AsEgtB及びAsEgtCタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号4~6として示す。

【0102】

アスペルギルス・オリゼRIB 40株由来の酵素(1)をコードする遺伝子としては、例えば、後述する実施例に記載がある遺伝子AoEgtAが挙げられる。遺伝子AoEgtAの塩基配列を配列表の配列番号23として示す。また、AoEgtAタンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号24として示す。

【0103】

アスペルギルス・ソーヤ及びアスペルギルス・オリゼ以外の微生物から酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子を得る方法は特に限定されないが、例えば、遺伝子AsEgtA、AsEgtB、AsEgtC及びAoEgtAの塩基配列(配列番号1~3及び23)

並びに A s E g t A、A s E g t B、A s E g t C 及び A o E g t A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 4～6 及び 24）に基づいて、アスペルギルス・ソーヤ及びアスペルギルス・オリゼ以外の微生物のゲノム DNA を B L A S T 相同性検索して、遺伝子 A s E g t A、A s E g t B、A s E g t C 及び A o E g t A の塩基配列と配列同一性の高い塩基配列を有する遺伝子を特定することにより得ることができる。また、アスペルギルス・ソーヤ及びアスペルギルス・オリゼ以外の微生物の総タンパク質を基に、A s E g t A、A s E g t B、A s E g t C 及び A o E g t A タンパク質と配列同一性の高いアミノ酸配列を有するタンパク質を特定し、該タンパク質をコードする遺伝子を特定することにより得ることができる。得られた遺伝子が酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子に相当することは、得られた遺伝子により由来生物を宿主生物として形質転換し、セレノネインが生産されていることを確認すること、又は宿主生物に比してセレノネインの生産量が增強されていることで確認できる。

【0104】

アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・オリゼ及びアスペルギルス・ニガーは生育条件が近似していることから、これらそれぞれが有する遺伝子を挿入することにより、相互に形質転換できる蓋然性がある。例えば、アスペルギルス・ソーヤから得られた酵素（1）又は酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子を、宿主生物としてアスペルギルス・オリゼやアスペルギルス・ニガーに導入して形質転換することができる。酵素（1）又は酵素（1）及び（2）が確実に所望の酵素活性を有することを鑑みれば、酵素（1）又は酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子の由来生物と宿主生物とが同一であることが好ましい。例えば、アスペルギルス・ソーヤ由来の酵素（1）又は酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子を、同じアスペルギルス・ソーヤに形質転換することが挙げられる。

【0105】

酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子は、アスペルギルス・ソーヤなどに由来する酵素（1）や酵素（2）をコードする遺伝子のアミノ酸配列に基づいて、宿主生物に発現させるためにコドン、二次構造、GC 含量などを最適化した遺伝子であってもよい。そのような遺伝子の具体例としては、大腸菌発現用に合成された E c E g t A（配列番号 27）及び E c E g t C（配列番号 28）が挙げられる。

【0106】

（形質転換体の一実施態様）

製造方法の一実施態様で使用する形質転換体の一実施態様は、遺伝子 A s E g t A をアスペルギルス・ソーヤに挿入して、A s E g t A タンパク質を過剰発現するように形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤである。上記形質転換体の別の一実施態様は、遺伝子 A o E g t A をアスペルギルス・オリゼに挿入して、A o E g t A タンパク質を過剰発現するように形質転換した形質転換アスペルギルス・オリゼである。このような形質転換アスペルギルス・ソーヤ及び形質転換アスペルギルス・オリゼは、A s E g t A や A o E g t A タンパク質を過剰発現することにより、宿主生物では生産しない、又は生産したとしても微量であるセレノネインを検出可能以上に生産することができる。さらに、後述する実施例に記載があるとおり、形質転換アスペルギルス・ソーヤ及び形質転換アスペルギルス・オリゼは、セレノシステインやセレノシスチンといった有機セレン化合物に限らず、亜セレン酸などの無機セレン化合物からもセレノネインを生産することができる。そこで、形質転換体の一実施態様は、酵素（1）又は酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子の発現が、宿主生物に比してセレノネインの量が増えるように增強された形質転換体であることが好ましい。また、形質転換体の一実施態様は、酵素（1）及び（2）をコードする遺伝子の発現が、酵素（1）をコードする遺伝子の発現が增強された形質転換体に比してセレノネインの量が増えるように增強された形質転換体であることがより好ましい。

【0107】

また、後述する実施例に記載があるとおり、A s E g t A タンパク質を過剰発現するように形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤは、宿主生物であるアスペルギルス・ソーヤの生育に適した D P Y 培地を用いて 30、4～5 日間で培養することにより、湿菌

10

20

30

40

50

体質量 1 g あたり亜セレン酸を用いた場合に 15.8 μg 及びセレノシスチンを用いた場合に 207.9 μg のセレノネインが得られている。そこで、形質転換体の一実施態様は、酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の発現が、形質転換体を宿主生物の生育に適したセレン化合物含有培地を用いて30、5日間で培養した場合のセレノネインの量が湿菌体質量 1 g あたり、例えば、5 μg 以上、好ましくは 10 μg 以上、より好ましくは 20 μg 以上、さらに好ましくは 40 μg 以上になるように増強された形質転換体である。形質転換体の別の一実施態様は、酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の発現が、形質転換体を宿主生物の生育に適した亜セレン酸含有培地を用いて30、5日間で培養した場合のセレノネインの量が湿菌体質量 1 g あたり、例えば、5 μg 以上、好ましくは 6 μg 以上、より好ましくは 10 μg 以上、より好ましくは 15 μg 以上になるように増強された形質転換体である。形質転換体の別の一実施態様は、酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子の発現が、形質転換体を宿主生物の生育に適したセレノシスチン含有培地を用いて30、5日間で培養した場合のセレノネインの量が湿菌体質量 1 g あたり、例えば、10 μg 以上、好ましくは 20 μg 以上、より好ましくは 40 μg 以上、さらに好ましくは 100 μg 以上、なおさらに好ましくは 200 μg 以上になるように増強された形質転換体である。

【0108】

製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、挿入された酵素(1)及び酵素(2)をコードする遺伝子によって生産される酵素(1)及び(2)と同時に、宿主生物が本来保有している酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子により上記酵素(1)及び(2)と構造的性質が同種又は別種の野生型の酵素(1)及び(2)を生産する場合がある。結果として、製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、たとえ酵素(2)をコードする遺伝子を導入したものでなくとも、セレノネインを生産することができる。

【0109】

製造方法の一実施態様で用いられる形質転換体は、酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換古細菌又は形質転換真性細菌が挙げられる。形質転換真性細菌の非限定的な例としては、EcEgtA又はEcEgtA及びEcEgtCを含有するプラスミドベクターによって形質転換された形質転換大腸菌が挙げられる。

【0110】

(製造方法)

製造方法の一実施態様は、ヒスチジン及びセレン化合物を、酵素(1)又は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体に作用させて、セレノネインを得る工程を少なくとも含む、セレノネインの製造方法である。

【0111】

ヒスチジン及びセレン化合物を形質転換体に作用させる方法は、ヒスチジン及びセレン化合物と形質転換体とが接触して、形質転換体が有する酵素によってセレノネインが生産できる方法であれば特に限定されないが、例えば、ヒスチジン及びセレン化合物を含有し、かつ、形質転換体の生育に適した培地を用いて、形質転換体の生育に適した培養条件下で形質転換体を培養することによって、セレノネインを製造する方法が挙げられる。培養方法は特に限定されず、例えば、通気又は非通気条件下で行う固体培養法や液体培養法が挙げられる。セレン化合物の添加量は、形質転換体の生育阻害が認められない程度の量であれば特に限定されないが、例えば、培養当初には菌体濃度に対して十分に小さい量であり、好ましくは 1 mM 以下であり、より好ましくは 0.1 mM 以下であり、さらに好ましくは 0.05 mM 以下である。大量のセレノネインを得たければ、セレン化合物を、培養経過時に、又は菌体濃度が高まるにつれて増やすことが好ましい。例えば、セレン化合物を、培養開始から 1~24 時間、好ましくは 3~22 時間経過時に、0.001~10 mM、好ましくは 0.005~5 mM の濃度で追加的に培養液に添加することが挙げられる。

【0112】

培地は、宿主生物を培養する通常の培地、すなわち炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適切な割合で含有するものであれば、合成培地及び天然培地のいずれでも使用できる。宿主生物がアスペルギルス属微生物である場合は、後述する実施例に記載があるようなD P Y培地などを利用することができるが、特に限定されない。ただし、培地成分には、酵素(1)の活性化に必要な鉄(II)が含まれることが好ましい。鉄(II)は化合物として培地に添加することができるが、ミネラル含有物として添加してもよい。

【0113】

セレン化合物はセレンを構成元素として含むものであれば特に限定されないが、例えば、有機セレン化合物及び無機セレン化合物並びにこれらの塩であり、このうち有機セレン化合物及びその塩としてはセレノシステイン、セレノシスチン、セレノメチオニン、Se-(メチル)セレノ-L-システイン、セレノペプチド、セレノプロテイン及びそれらの塩並びにセレン酵母などが好ましく、無機セレン化合物及びその塩としてはセレン酸、亜セレン酸、塩化セレン、セレン、セレン化物、硫化セレン、ジメチルセレン、セレノリン酸、二酸化セレン及びそれらの塩などが好ましい。また、セレン化合物は、有機セレン化合物及び無機セレン化合物並びにこれらの塩を含む有機物であってもよい。該有機物としては、例えば、かつお(加工品、かつお節)、からし(粉、粒入りマスタード、練りマスタード)、ぶた(腎臓、肝臓、生)、うし(マメ、生)、あんこう(きも、生)、すけとうだら(タラコ、生)、くろまぐろ(赤身、生)、まがれい(生)、かつお(秋獲り、生)、ずわいがに(生)、ひまわりの種(フライ、味付け)、まあじ(焼き)、あまだい(生)、顆粒風味調味料、きはだ(生)、びんなが(生)、カキ(水煮)などのセレンを多く含むことが知られている食品などを挙げるができるが、これらに限定されない。セレン化合物はこれらのうちの1種又は2種以上を組みわせて用いることができる。

【0114】

セレン化合物としては、セレノシステイン及びセレノシスチンがより好ましい。セレノシステイン及びセレノシスチンの入手方法は特に限定されないが、例えば、セレノシステインは特開2001-61489号公報を参照して製造できる。

【0115】

製造方法の一実施態様で用いる形質転換体は、上記した形質転換体であればよく、例えば、セレノシステインやセレノシスチンなどの有機セレン化合物をセレン化合物として用いる場合は酵素(1)及び(2)をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体とすることができ、亜セレン酸などの無機セレン化合物をセレン化合物として用いる場合は酵素(1)をコードする遺伝子が挿入されており、かつ、該挿入された遺伝子を過剰発現する形質転換体とすることができるが、これに限定されない。

【0116】

形質転換体の培養条件は、当業者により通常知られる宿主生物の培養条件を採用すればよく、例えば、宿主生物が糸状菌である場合、培地の初発pHは5~10に調整し、培養温度は20~40、培養時間は数時間~数日間、好ましくは1~7日間、より好ましくは2~4日間など、適宜設定することができる。培養手段は特に限定されず、通気攪拌深部培養、振盪培養、静地培養などを採用することができるが、溶存酸素が十分になるような条件で培養することが好ましい。例えば、アスペルギルス属微生物を培養する場合の培地及び培養条件の一例として、後述する実施例に記載があるD P Y培地を用いた、30、160rpmでの3~5日間の振盪培養が挙げられる。

【0117】

培養終了後に培養物からセレノネインを抽出する方法は特に限定されない。抽出には、培養物から濾過、遠心分離などの操作により回収した菌体をそのまま用いてもよく、回収した後に乾燥した菌体やさらに粉碎した菌体を用いてもよい。菌体の乾燥方法は特に限定されず、例えば、凍結乾燥、天日乾燥、熱風乾燥、真空乾燥、通気乾燥、減圧乾燥などが挙げられる。

【0118】

抽出溶媒はセレノネインが溶解するものであれば特に限定されず、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトンなどの有機溶媒；これらの有機溶媒と水とを混合させた含水有機溶媒；水、温水及び熱水などが挙げられる。溶媒を加えた後、適宜、菌体破碎処理を加えながらセレノネインを抽出する。抽出溶媒温度は室温から100に設定することができる。

【0119】

セレノネインの抽出方法の一実施態様としては、例えば、培養物から回収した菌体を水で洗浄した後に、菌体を水に加えた懸濁液を調製し、次いで得られた懸濁液を100、15分間などの加温処理に供した後に、遠心分離することにより上清を回収し、次いで回収した上清をろ過して不溶物を取り除く方法が挙げられる。また、該加熱処理した懸濁液を、遠心分離に供することなく、ろ過してもよい。

【0120】

また、上記加温処理に代えて、例えば、超音波破碎機、フレンチプレス、ダイノミル、乳鉢などの破壊手段を用いて菌体を破壊する方法；ヤタラーゼなどの細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法；SDS、トリトンX-100などの界面活性剤を用いて菌体を溶解する方法などの菌体破碎処理に供してもよい。これらの方法は単独又は組み合わせて使用することができる。

【0121】

得られた抽出液は、遠心分離、フィルターろ過、限外ろ過、ゲルろ過、溶解度差による分離、溶媒抽出、クロマトグラフィー（吸着クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなど）、結晶化、活性炭処理、膜処理などの精製処理に供することによりセレノネインを精製することができる。

【0122】

セレノネインの定性的又は定量的分析は、LC-MSやLC-ICP-MSなどにより行うことができる。これらの分析の条件は当業者であれば適宜選択することができ、例えば、後述する実施例に記載がある条件で実施できる。

【0123】

製造方法の一実施態様によれば、高収量のセレノネインが得られる。例えば、非特許文献2のFig. S6及びFig. 3Bなどでは、セレン非含有培地を用いた培養結果としてエルゴチオネインの生産量が記載されており、かつ、セレン含有培地を用いた培養結果としてエルゴチオネイン及びセレノネインのピーク比が記載されているところ、これらの結果から総合して考えれば、セレノネインの生産量は約0.047 µg/mlと推定できる。これに対して、製造方法の一実施態様では、後述する実施例に記載されているように、分析値である6.46 µg-Se/ml（セレンのみの量）からセレノネイン生産量を計算すると、14.56 µg/mlとなる。したがって、製造方法の一実施態様によれば、非特許文献2に記載の製造方法に比して、100倍以上の量で、セレノネインを製造することができるという格別に有利な点がある。

【0124】

製造方法の一実施態様では、本発明の課題を解決し得る限り、上記した工程の前段若しくは後段又は工程中に、種々の工程や操作を加入することができる。

【0125】

製造方法の別の一実施態様は、形質転換体ではなく、酵素(1)又は酵素(1)及び酵素(2)をコードする遺伝子をゲノムDNA上に有する微生物を用いる製造方法である。例えば、製造方法の別の一実施態様は、ヒスチジン及びセレン化合物を、酵素(1)又は酵素(1)及び酵素(2)をコードする遺伝子をゲノムDNA上に有するアスペルギルス属微生物といった麹菌などの糸状菌に作用させて、セレノネインを得る工程を含む、セレノネインの製造方法である。

【0126】

製造方法の一実施態様において、生産物であるセレノネインが使用する微生物に対して増

殖阻害又は生産阻害を引き起こし得る。そこで、培地中に銅イオンなどの酸化剤を添加することにより、生産したセレノネインを二量体化（S e - S e 結合の形成）して、微生物の増殖阻害又は生産阻害を回避できる可能性がある。したがって、製造方法の一実施態様において、ヒスチジン及びセレン化合物を微生物に作用させる際に、銅イオンなどの酸化剤が存在していることが好ましい。

【0127】

（セレノネインの用途）

本発明の一実施態様である製造方法や形質転換体を利用して得られたセレノネインは、種々の生理活性を有する機能性生体物質であることや熱に強く水溶性の物質であるという特徴を活かして、一般飲食品、機能性飲食品、機能性表示飲食品、特定保健用飲食品、栄養機能飲食品、保健機能飲食品、特別用途飲食品、栄養補助飲食品、健康補助飲食品、サプリメント、美容飲食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、動物飼料などやこれらの製品を製造するための原料として利用可能である。

【0128】

特に、セレノネインは抗酸化活性を有することが知られており、その活性はチオアナログであるエルゴチオネインの1,000倍に達するといわれている。そこで、セレノネインは、例えば、ヒドロキシルラジカルの捕捉作用、ヘム鉄の自動酸化抑制作用などの生体抗酸化作用を示す物質として有用である。また、セレノネインを含有する具体的な製品としては、亜セレン酸やセレノメチオニンなどに代わる栄養補助剤、癌や虚血性心疾患などの生活習慣病の予防剤又は治療剤、メチル水銀の解毒剤などが挙げられるが、これらに限定

【0129】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではなく、本発明の課題を解決し得る限り、本発明は種々の態様をとることができる。

【実施例】

【0130】

[例1. 遺伝子 A s E g t A、A s E g t B 又は A s E g t C を挿入した DNA コンストラクトの作製]

(1) 対象遺伝子の探索

ニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) においてエルゴチオネインの生合成に関与する酵素として NC U 0 4 3 4 3 及び NC U 1 1 3 6 5 が知られている（非特許文献3及び4を参照）。また、非特許文献3では、NC U 0 4 6 3 6 がエルゴチオネインの生合成に関与する可能性が示唆されている。そこで、ニューロスポラ・クラッサの上記3つの酵素をコードする遺伝子をクエリーとして、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*) NBRC 4 2 3 9 株のゲノム配列を基に、NC U 0 4 3 4 3、NC U 0 4 6 3 6 及び NC U 1 1 3 6 5 のそれぞれをコードする遺伝子と比較的配列同一性の高い領域を検索した。検索には BLAST プログラム (tblastn) 及びアスペルギルス・ソーヤ NBRC 4 2 3 9 株のゲノム配列 (DDBJ/EMBL/GenBank DNA databases, Accession numbers for the 65 scaffold sequences; DF093557-DF093585, DNA RESEARCH 18, 165-176, 2011) を用いた。

【0131】

その結果、NC U 0 4 3 4 3 と比較的遺伝子配列の同一性が高かった配列領域として、配列番号1に示す遺伝子が見出された。この遺伝子をアスペルギルス・ソーヤ由来の e g t A 遺伝子という意味で A s E g t A 遺伝子（配列番号1）と名付けた。NC U 0 4 6 3 6 と比較的遺伝子配列の同一性が高かった配列領域として、配列番号2に示す遺伝子が見出され、この遺伝子を A s E g t B 遺伝子（配列番号2）と名付けた。NC U 1 1 3 6 5 と比較的遺伝子配列の同一性が高かった配列領域として、配列番号3に示す遺伝子が見出さ

れ、この遺伝子を *AsEgtC* 遺伝子 (配列番号 3) と名付けた。

【0132】

遺伝情報処理ソフトウェア *Genetyx* ネットワーク版 *version 12.0.1* (ゼネティックス社) によりアミノ酸レベルでの配列同一性の比較を行うと、*AsEgtA* タンパク質 (配列番号 4)、*AsEgtB* タンパク質 (配列番号 5) 及び *AsEgtC* タンパク質 (配列番号 6) と *NCU04343*、*NCU04636* 及び *NCU11365* との配列同一性は、それぞれ 46%、75% 及び 44% であった。また、*AsEgtC* タンパク質と *NCU11365* のシゾサッカロミセス・ボンベのオルソログである *SPBC660.12c* との配列同一性は 27% であった。以上の結果から、*AsEgtA*、*AsEgtB* 及び *AsEgtC* の塩基配列やアミノ酸配列に基づけば、他のアスペルギルス属微生物の *egtA* 遺伝子、*egtB* 遺伝子及び *egtC* 遺伝子が探索できることが示唆された。

【0133】

(2) アスペルギルス・ソーヤ *NBRC4239* 株の染色体 DNA の抽出
150 ml 容量の三角フラスコにポリペプトンデキストリン培地 (1% (w/v) ポリペプトン、2% (w/v) デキストリン、0.5% (w/v) KH_2PO_4 、0.1% (w/v) NaNO_3 、0.05% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% (w/v) カザミノ酸; pH 6.0) を蒸留水で 30 ml 調製し、アスペルギルス・ソーヤ *NBRC4239* 株の分生子を接種して 30 で一晩振とう培養した。得られた培養液から過により菌体を回収し、ペーパータオルに挟んで水分を除き、予め液体窒素で冷却した乳鉢と乳棒を用いて液体窒素で冷却しながら菌体を粉碎した。得られた粉碎菌体から *DNeasy Plant Mini Kit* (キアゲン社) を用いて染色体 DNA を抽出した。

【0134】

(3) コンストラクト用プラスミドの作製
プラスミド *pUC19* に、翻訳伸長因子遺伝子 *tef1* のプロモーター配列である *Ptef* (*tef1* 遺伝子の上流 748 bp、配列番号 7)、アルカリプロテアーゼ遺伝子 *alp* のターミネーター配列である *Talp* (*alp* 遺伝子の下流 800 bp、配列番号 8)、及びウリジン要求性を相補する形質転換マーカー遺伝子 *pyrG* (上流 407 bp、コード領域 896 bp 及び下流 535 bp を含む 1838 bp、配列番号 9) を連結させたコンストラクト用プラスミドを次のとおりに作製した。

【0135】

Ptef、*Talp* 及び *pyrG* は、鋳型 DNA として上記で得られたアスペルギルス・ソーヤ *NBRC4239* 株の染色体 DNA、PCR の酵素として *KOD-Plus-DNA Polymerase* (東洋紡社)、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置として *Mastercycler gradient* (エッペンドルフ社) を使用して、酵素に添付されたプロトコールに従って PCR を実施した。*Ptef*、*Talp* 及び *pyrG* を増幅するために使用したプライマー及び PCR 条件を下記表 1~3 に示す。なお、表中の配列のうち、小文字の配列は *Ptef*、*Talp* 及び *pyrG* の各増幅断片をこの順に連結し、さらに *pUC19* と連結するための付加配列を示す。増幅した DNA 断片を 1% (w/v) アガロースゲル中で分離し、*QIAquick Gel Extraction Kit* (キアゲン社) を用いて精製した。

【0136】

【表 1】

増幅対象領域	Ptef
フォワードプライマー (配列番号 10)	Ptef1_-748R_pUC cggatccccgggatacTGTGGACCAGACAGGCGCCACTC
リバースプライマー (配列番号 11)	Ptef1_-1R_Talp atgtactcctgggtacTTTGAAGGTGGTGC GAAC TTTGTAG
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、1分) × 25回)

【0137】

10

【表 2】

増幅対象領域	Talp
フォワードプライマー (配列番号 12)	Talp_1F GTACCAGGAGTACATTGGAGAGTTCTAC
リバースプライマー (配列番号 13)	Talp_800R CCGATCCAACCACCCGGCTATCG
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、1分) × 25回)

【0138】

20

【表 3】

増幅対象領域	pyrG
フォワードプライマー (配列番号 14)	PyrG_-407_F_Talp gggtggttgatcggTTGGGCTTATTGCTATGTCCTGAAAGG
リバースプライマー (配列番号 15)	PyrG_1431R_pUC cgactctagaggatcCCGCACCTCAGAAGAAAAGGATGA
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、2分) × 25回)

【0139】

30

pUC19は、In-Fusion HD Cloning Kit (クロンテック社) に付属されている pUC19 linearized Vector を用いた。pUC19 のマルチクローニングサイトにある In-Fusion Cloning Site にて、増幅した Ptef、Talp 及び pyrG を、上記した In-Fusion HD Cloning Kit を使用して、キットに添付されたプロトコールに従って連結して、コンストラクト用プラスミドを得た。

【0140】

得られたコンストラクト用プラスミドにより、コンピテントセルである ECOS Competent E. coli JM109 (ニッポンジーン社) を、製造業者の指示に従って形質転換することにより、形質転換大腸菌を得た。

40

【0141】

得られた形質転換大腸菌を、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地で 37、一晩振とう培養した。培養後の培養液を遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体について、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス社) を用いて、キットに添付されたプロトコールに従ってプラスミド DNA を抽出した。

【0142】

(4) 対象遺伝子挿入コンストラクトの作製

コンストラクト用プラスミドの Ptef 及び Talp の間に、対象遺伝子である AsEgtA、AsEgtB 又は AsEgtC を連結させた DNA コンストラクトを次のとおりに作製した。

50

【 0 1 4 3 】

鋳型DNAとして上記で得られたコンストラクト用プラスミド、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてMastercycler gradient（エッペンドルフ社）を使用して、酵素に添付されたプロトコールに従ってインバースPCRを実施することによりコンストラクト用プラスミドのベクター断片を得た。使用したプライマー及びPCR条件を下記表4に示す。増幅したベクター断片を1%（w/v）アガロースゲル中で分離し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて精製した。

【 0 1 4 4 】

【表4】

増幅対象領域	コンストラクト用プラスミド
フォワードプライマー (配列番号16)	Ptef_1R TTTGAAGGTGGTGCGAACTTTGTAG
リバースプライマー (配列番号12)	Talp_1F (前出) GTACCAGGAGTACATTGGAGAGTTCTAC
PCR条件	(94℃、2分、(98℃、10秒、65℃、30秒、68℃、6分) ×20回)

10

【 0 1 4 5 】

アスペルギルス・ソーヤ由来の遺伝子AsEgtA（配列番号1）、AsEgtB（配列番号2）及びAsEgtC（配列番号3）を増幅するために、鋳型DNAとして上記で得られたアスペルギルス・ソーヤNBRC4239株の染色体DNA、PCRの酵素としてKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡社）、反応試薬として本酵素に付属のもの、装置としてMastercycler gradient（エッペンドルフ社）を使用して、酵素に添付されたプロトコールに従ってPCRを実施した。AsEgtA、AsEgtB及びAsEgtCを増幅するために使用したプライマー及びPCR条件を下記表5～7に示す。なお、表中の配列のうち、小文字の配列はコンストラクト用プラスミド（Ptef及びTalpの間）に連結するための付加配列を示す。増幅したDNA断片を1%（w/v）アガロースゲル中で分離し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて精製した。

20

【 0 1 4 6 】

【表5】

増幅対象領域	AsEgtA
フォワードプライマー (配列番号17)	EgtA_1F_Ptef cgcaccaccttcaaaATGTCACCTTTGGCTCTCTCTCC
リバースプライマー (配列番号18)	EgtA_2925R_Talp atgtactcctggtacCTAAAGATCCCGCACCAGGCGT
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、3分) ×25回)

30

【 0 1 4 7 】

【表 6】

増幅対象領域	AsEgtB
フォワードプライマー (配列番号 19)	EgtB_1F_Ptef cgccaccaccttcaaaaATGTCGTAATGTTACCCAATCAGCCTTGAG
リバースプライマー (配列番号 20)	EgtB_1770R_Talp atgtactcctggtacTTAATGTTGACTCCATTCGATCGTGTTCAG
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、2分) × 25回)

【0148】

10

【表 7】

増幅対象領域	AsEgtC
フォワードプライマー (配列番号 21)	EgtC_1F_Ptef cgccaccaccttcaaaaATGACCACTCCCTTCGGAGCT
リバースプライマー (配列番号 22)	EgtC_1529R_Talp atgtactcctggtacTCAAAGCTTCGCAGAAGAAACCCCAACC
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、2分) × 25回)

【0149】

20

上記のとおり増幅したベクター断片と、AsEgtA、AsEgtB又はAsEgtCとを、In-Fusion HD Cloning Kitを使用して、キットに添付されたプロトコールに従って連結して、AsEgtA、AsEgtB又はAsEgtCが挿入された対象遺伝子挿入DNAコンストラクトを得た。このようにして得られたDNAコンストラクトは、5'末端側から3'末端側にかけて、pUC19由来のDNA断片とPtefのDNA断片とAsEgtA、AsEgtB又はAsEgtCのDNA断片とTalpのDNA断片とpyrGのDNA断片とpUC19由来のDNA断片とが連結されたものである。すなわち、pUC19のMCSに、Ptef-AsEgtA、AsEgtB又はAsEgtC-Talp-pyrGの配列が順に連結された3種のDNAコンストラクトが得られた。

30

【0150】

得られたDNAコンストラクトにより、コンピテントセルであるECOS Competent E.coli JM109(ニッポンジーン社)を、製造業者の指示に従って形質転換することにより、形質転換大腸菌を得た。

【0151】

得られた形質転換大腸菌を、50 µg/mlのアンピシリンを含むLB液体培地で37、一晩振とう培養した。培養後の培養液を遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体について、FastGene Plasmid Mini Kit(日本ジェネティクス社)を用いて、キットに添付されたプロトコールに従ってプラスミドDNA(DNAコンストラクト)を抽出した。

40

【0152】

抽出したプラスミドDNA中に挿入された各DNAの塩基配列を決定することにより、AsEgtA、AsEgtB又はAsEgtCが挿入されたDNAコンストラクトが得られたことを確認した。

【0153】

[例2. 形質転換アスペルギルス・ソーヤの作製(1)]

(1) アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株由来pyrG破壊株

各DNAコンストラクトをエタノール沈殿した後に、TEに溶解して、所望の濃度に調製したDNA溶液を、下記の手順でアスペルギルス・ソーヤNBRC4239株由来pyrG破壊株(pyrG遺伝子の上流48bp、コード領域896bp、下流240bp欠損

50

株)の形質転換に用いた。

【0154】

(2) アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株由来pyrG破壊株の形質転換

500ml容三角フラスコ中の20mMウリジンを含むポリペプトンデキストリン液体培地100mlに、アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株由来pyrG破壊株の分生子を接種し、30℃で約20時間振とう培養を行った後、菌体を回収した。回収した菌体からプロトプラストを調製した。得られたプロトプラスト及び20µgの対象遺伝子挿入DNAコンストラクトを用いて、プロトプラストPEG法により形質転換を行い、次いで0.5%(w/v)寒天及び1.2Mソルビトールを含むCzapek-Dox最少培地(ディフコ社; pH6)を用いて、30℃、5日間以上インキュベートし、コロニー形成能があるものとして形質転換アスペルギルス・ソーヤを得た。 10

【0155】

得られた形質転換アスペルギルス・ソーヤは、ウリジン要求性を相補する遺伝子であるpyrGが導入されることにより、ウリジン無添加培地に生育できるようになることで、目的の遺伝子が導入された株として選択できた。

【0156】

[例3. 遺伝子AoEgtAを挿入したDNAコンストラクトの作製]

(1) 対象タンパク質の探索

アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)RIB40株の総タンパク質を基に、アスペルギルス・ソーヤのAsEgtAアミノ酸配列をクエリーとして配列同一性の高いタンパク質を検索した。検索にはDOGAN(<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/AO>)を用いた。 20

【0157】

その結果、AsEgtAアミノ酸配列と比較的配列同一性が高かったタンパク質として、AO090012000265が見出された。なお、AO090012000265は、*S. pombe*のEgt1と類似するものとして、非特許文献5のTable 2に記載されているものである。AO090012000265は、AsEgtAと97%の配列同一性が認められた。AO090012000265をコードする遺伝子をアスペルギルス・オリゼ由来のegtA遺伝子という意味でAoEgtA遺伝子(配列番号23)と名付けた。AoEgtAタンパク質のアミノ酸配列は配列番号24に記載するものである。 30

【0158】

(2) アスペルギルス・オリゼRIB40株の染色体DNAの抽出

アスペルギルス・オリゼRIB40株の分生子を用いた以外は、上記例1-(2)と同様の方法で実施した。

【0159】

(3) コンストラクト用プラスミドの作製

上記例1-(3)で作製したベクター断片を用いた。

【0160】

(4) 対象遺伝子挿入コンストラクトの作製 40

対象遺伝子がAoEgtAであること及び鑄型DNAとして上記で得られたアスペルギルス・オリゼRIB40株の染色体DNAを用いた以外は、上記例1-(4)と同様の方法で実施した。なお、AoEgtAを増幅するために使用したプライマー及びPCR条件を下記表8に示す。

【0161】

【表 8】

増幅対象領域	AoEgtA
フォワードプライマー (配列番号 25)	AoEgtA_1F_Ptef cgcaccacccttcaaaaATGTCACCGTTGGCTCTTTCTCG
リバープライマー (配列番号 26)	AoEgtA_2917R_Talp atgtactcctggtacCTAAAGATCCCGCACTAGGGGTG
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、3分) × 25回)

【0162】

なお、上記例 1 - (4) と同様にして、抽出したプラスミド DNA 中に挿入された DNA の塩基配列を決定することにより、A o E g t A が挿入された DNA コンストラクトが得られたことを確認した。

【0163】

[例 4 . 形質転換アスペルギルス・オリゼの作製]

特開 2013 - 034416 号公報に記載のアスペルギルス・オリゼ R I B 40 株由来 p y r G 破壊株について形質転換した以外は、上記例 2 - (1) 及び (2) と同様の方法で実施した。

【0164】

[例 5 . 形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いたセレノネイン生産]

コントロールであるアスペルギルス・ソーヤ N B R C 4239 株並びに遺伝子 A s E g t A 及び A s E g t C により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤのそれぞれのセレノネイン生産能を以下のとおりと比較した。

【0165】

200 ml 容三角フラスコ中のセレノシスチン添加 D P Y 液体培地 (0.1% (w/v) ヒスチジン、1 mM セレノシスチン、1% (w/v) ポリペプトン、2% (w/v) デキストリン、0.5% (w/v) 酵母エキス、0.5% (w/v) K H₂ P O₄、0.05% (w/v) M g S O₄ · 7 H₂ O、0.00017% F e S O₄ ; pH 未調整) 40 ml に、各菌株の分生子を接種し、30 で 5 日間、160 rpm で振とう培養を行った。次いで、培養後の培養物から菌体をミラクロス (カルバイオケム社) 上で回収した。回収した菌体を 40 ml の蒸留水で洗浄した後、菌体をペーパータオルに挟むことによって水分を押し出して湿菌体を得た。8 ml の水を添加して攪拌することにより、菌懸濁液を得た。得られた菌懸濁液を、100、15 分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により上清として回収した菌体外液を、0.45 μ m フィルターでろ過することにより、セレノネイン抽出液を得た。

【0166】

得られたセレノネイン抽出液について、下記の条件の L C M S により分析を行った。

[LC - MS 条件]

LC 装置 ; A g i l e n t 1100 シリーズ (アジレント社)

質量分析装置 ; Q S T A R E l i t e (A B s c i e x 社)

カラム ; C O S M O S I L H I L I C (4.6 × 250 mm)

溶離液 ; アセトニトリル + 0.1% 酢酸 : 水 + 0.1% 酢酸 = 75 : 25 (v/v)

流速 ; 250 μ l / m l

検出 ; E S I p o s i t i v e

I n j e c t i o n ; 10 μ l

温度 ; 室温

【0167】

アスペルギルス・ソーヤ N B R C 4239 株及び遺伝子 A s E g t A 及び A s E g t C により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いて得られたセレノネイン抽出液について、セレノネインのプロトン付加イオンに相当する、m/z 278 の L C - M S 分

10

20

30

40

50

析結果を図1に示す。アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株では非常に小さかったピークが、遺伝子AsEgtA及びAsEgtCにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤでは明確に検出された。

【0168】

なお、エルゴチオネインのプロトン付加イオンに相当する m/z 230のLC-MS分析結果を図2に示す。アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株を用いた場合はエルゴチオネインに相当するピークがわずかに検出され、遺伝子AsEgtA及びAsEgtCにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いた場合はエルゴチオネインに相当するピークが明確に検出された。

【0169】

[例6. セレノネイン生産の確認]

図1で検出された、 m/z 278に検出された、リテンションタイム31分付近のピークのMSスペクトルの拡大図を図3に示す。さらに、天然存在比から推定されるセレノネインのイオン分布の計算値を図4に示す。イオン分布の実測値が概ね一致することから、上記ピークがセレノネインであることを示すピークであり、遺伝子AsEgtA及びAsEgtCにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤはセレノネインを生産することが示された。

【0170】

[例7. 形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いたセレノネイン生産(1)]

200ml容三角フラスコ中にて、DPY液体培地 40ml; 亜セレン酸添加DPY液体培地(1mM 亜セレン酸、0.1%(w/v)ヒスチジン、1%(w/v)ポリペプトン、2%(w/v)デキストリン、0.5%(w/v)酵母エキス、0.5%(w/v)KH₂PO₄、0.05%(w/v)MgSO₄·7H₂O、0.00017%FeSO₄; pH未調整)40ml; 又はセレノシスチン添加DPY液体培地 40mlを用いて、遺伝子AsEgtA及びAsEgtCにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの分生子を接種し、30℃で5日間、160rpmで振とう培養を行った。次いで、培養後の培養物から菌体をミラクロス(カルバイオケム社)上で回収した。回収した菌体を40mlの蒸留水で洗浄した後、菌体をペーパータオルに挟むことによって水分を押し出して湿菌体質量2.28g(セレノシスチン添加DPY液体培地)及び1.89g(亜セレン酸添加DPY液体培地)を得た。8mlの水を添加して攪拌することにより、菌懸濁液を得た。得られた菌懸濁液を、100℃、15分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により上清として回収した菌体外液を、0.45µmフィルターでろ過することにより、セレノネイン抽出液を得た。

【0171】

得られたセレノネイン抽出液について、セレノネインの存在を上記条件のLC-MSにより分析した。また、セレノネイン及び総セレンの定量は、ヤマシタらの文献(THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 24, pp. 18134-18138, June 11, 2010, 「EXPERIMENTAL PROCEDURES」、"Selenium Determination"、該文献の全記載はここに開示として援用される)に記載の条件にて、LC-ICP-MSにより分析した。

【0172】

セレノネインに相当する、 m/z 278のLC-MS分析結果を図5に示す。DPY液体培地そのものではセレノネインは検出されず、セレノシスチン添加又は亜セレン酸添加によりセレノネインが検出された。したがって、形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いれば、セレン化合物を培地に添加することにより、セレノネインを生産できることが確認された。

【0173】

セレノネイン抽出液中のセレノネイン含量(セレン当量)を上記のようにして分析したところ、セレノシスチン添加液体培地を用いた場合は16.3µg-Se/g-抽出液であ

10

20

30

40

50

り、亜セレン酸添加液体培地を用いた場合は $4.6 \mu\text{g} - \text{Se} / \text{g}$ - 抽出液であった。なお、DAN蛍光法によりセレノネイン抽出液中の総セレン含量を測定したところ、セレノシスチン添加液体培地を用いた場合は $20.8 \mu\text{g} / \text{g}$ - 抽出液であり、亜セレン酸添加培地を用いた場合は $8.1 \mu\text{g} / \text{g}$ - 抽出液であった。また、湿菌体質量あたりのセレノネイン生産量は、セレノシスチン添加液体培地を用いた場合は $128.93 \mu\text{g} / \text{g}$ - 湿菌体質量であり、亜セレン酸添加培地を用いた場合は $43.89 \mu\text{g} / \text{g}$ - 湿菌体質量であった。これらの結果より、形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いることにより、セレノシスチン又は亜セレン酸を用いることにより、大量のセレノネインが得ることができた。なお、DAN蛍光法は、硝酸・過塩素酸混液による湿式加熱分解後、2,3-ジアミノナフタレン(DAN)と反応させ、Se(IV)との錯体形成反応により生じる4,5-ベンゾピアセレノール(Se-DAN)の蛍光を利用する方法であり、ワトキンソンの文献(J. H. Watkinson, Anal. Chem., 38(1), 92-97 (1966)、該文献の全記載はここに開示として援用される)を参照して実施した。

【0174】

[例8. 形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いたセレノネイン生産(2)]

アスペルギルス・ソーヤNBRC4239株；遺伝子AsEgtAにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤ；遺伝子AsEgtA及びAsEgtBにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤ；並びに遺伝子AsEgtA及びAsEgtCにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの分生子を接種したこと、及び30で4日間、160rpmで振とう培養したこと以外は、上記例7と同様の操作を実施した。結果をまとめたものを表9及び表10に示す。

【0175】

【表9】

導入遺伝子	セレン化合物	セレノネイン濃度-抽出液 (セレン等量) (mg-Se/L)	湿菌体質量 (g)	抽出液量 (ml)	セレノネイン量	
					抽出液量換算 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ -抽出液)	湿菌体質量換算 ($\mu\text{g}/\text{g}$ -湿菌体質量)
AsEgtA	セレノシスチン	25	2.17	8	56.4	207.9
AsEgtA+AsEgtB	セレノシスチン	19.1	2.09	8	43.1	165
AsEgtA+AsEgtC	セレノシスチン	18.6	2.3	8	41.9	145.7
AsEgtA	亜セレン酸	2.1	2.37	8	4.7	15.8
AsEgtA+AsEgtB	亜セレン酸	1.3	2.58	8	2.9	9
AsEgtA+AsEgtC	亜セレン酸	1	2.78	8	2.3	6.6

【0176】

【表 10】

導入遺伝子	セレン化合物	総セレン濃度-抽出液 (mg/kg)	湿菌体質量 (g)	抽出液量 (ml)
AsEgtA	セレンシスチン	36.2	2.17	8
AsEgtA+AsEgtB	セレンシスチン	30.2	2.09	8
AsEgtA+AsEgtC	セレンシスチン	34.6	2.3	8
AsEgtA	亜セレン酸	5.7	2.37	8
AsEgtA+AsEgtB	亜セレン酸	4.1	2.58	8
AsEgtA+AsEgtC	亜セレン酸	4.1	2.78	8

【0177】

上記結果より、形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いることにより、セレンシスチン又は亜セレン酸を用いることにより、大量のセレンネインが得ることができた。また、驚くべきことに、遺伝子 AsEgtA により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤは、遺伝子 AsEgtA 及び AsEgtB により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤ並びに遺伝子 AsEgtA 及び AsEgtC により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤよりも、セレンシスチン量及び総セレン量が多くなるという結果が得られた。

20

【0178】

[例9. 形質転換アスペルギルス・オリゼを用いたセレンネイン生産]

コントロールであるアスペルギルス・オリゼ RIB40 株及び遺伝子 AoEgtA により形質転換した形質転換アスペルギルス・オリゼのそれぞれのセレンネイン生産能を以下のとおりに比較した。

30

【0179】

200ml 容三角フラスコ中のセレンシスチン添加 DPY 液体培地 40ml に、各菌株の分生子を接種し、30℃ で4日間、160rpm で振とう培養を行った。次いで、培養後の培養物から菌体をミラクロス(カルバイオケム社)上で回収した。回収した菌体を40ml の蒸留水で洗浄した後、菌体をペーパータオルに挟むことによって水分を押し出して湿菌体質量 1.84g を得た。8ml の水を添加して攪拌することにより、菌懸濁液を得た。得られた菌懸濁液を、100℃、15分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により上清として回収した菌体外液を、0.45µm フィルターでろ過することにより、セレンネイン抽出液を得た。

【0180】

得られたセレンネイン抽出液について、セレンネインの存在を上記条件の LC-MS により分析した。また、セレンネインの定量は、ヤマシタらの文献に記載の条件にて、LC-ICP-MS により分析した。

40

【0181】

セレンネインに相当する、m/z 278 の LC-MS 分析結果を図6に示す。アスペルギルス・オリゼにおいて、コントロール株では、アスペルギルス・ソーヤ NBRC 4239 株よりも若干大きなピークとしてセレンネインが検出された。一方、遺伝子 AoEgtA により形質転換した形質転換体はリテンションタイムが 31.5 分付近のセレンネインのピークが明確に検出された。これらの結果より、形質転換アスペルギルス・オリゼを用いることにより、セレンネインを大量に生産できることが確認された。

50

【0182】

セレノネイン抽出液中のセレノネイン含量（セレン当量）を上記のようにして分析したところ、形質転換アスペルギルス・オリゼを用いた場合のセレノネイン含量は $32.3 \mu\text{g} - \text{Se} / \text{g}$ - 抽出液であった。また、湿菌体質量あたりのセレノネイン生産量は、 $316.58 \mu\text{g} / \text{g}$ - 湿菌体質量であった。なお、DAN蛍光法によりセレノネイン抽出液中の総セレン含量を測定したところ、 $39.1 \mu\text{g} - \text{Se} / \text{g}$ - 抽出液であった。

【0183】

[例10．セレン化合物毒性]

D P Y液体培地に 0 mM 、 0.1 mM 、 0.3 mM 若しくは 1.0 mM のセレノシスチン又は亜セレン酸を添加した。これらのそれぞれに、コントロールであるアスペルギルス・ソーヤN B R C 4 2 3 9株又は遺伝子A s E g t A及びA s E g t Cにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの分生子を接種し、 30°C で4日間、 160 rpm で振とう培養を行った。次いで、培養後の培養物から菌体をミラクロス（カルバイオケム社）上で回収した。回収した菌体を 40 ml の蒸留水で洗浄した後、菌体をペーパータオルに挟むことによって水分を押し出して湿菌体重量を測定した。

【0184】

セレン化合物の各濃度について、コントロールに対する形質転換体の湿菌体重量の相対量を図示したものを図7及び図8に示す。図7及び図8が示すように、形質転換体は、いずれのセレン化合物に対して耐性を示すことが示された。

【0185】

[例11．形質転換アスペルギルス・ソーヤの確認]

試験管中のD P Y液体培地 10 ml に、コントロールであるアスペルギルス・ソーヤN B R C 4 2 3 9株；遺伝子A s E g t A、A s E g t B及びA s E g t Cのいずれか1種の遺伝子により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤ；並びに遺伝子A s E g t AとA s E g t B又はA s E g t Cとにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの各分生子を接種し、 30°C で3日間振とう培養を行った後、菌体を回収した。回収した菌体を、ビーズ式細胞破碎装置（M S - 1 0 0 R；トミー精工社）を用いて冷却条件で破碎した破碎菌体末を、 0.1% （w/v）S D S水溶液に懸濁することによりS D S懸濁液を得た。得られたS D S懸濁液にサンプルバッファー（Lane Marker Reducing Sample Buffer, ImmunoPure（5x）；サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を $1/4$ 容量添加して攪拌し、次いで 98°C 、3分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により回収した上清について、菌体 0.2 mg 相当をアプライすることにより、アクリルアミドゲル電気泳動に供して、S D S - P A G Eを実施した。結果を図9に示す。

【0186】

図9に示されているとおり、A s E g t Aタンパク質はアミノ酸配列からの想定分子量が 95.7 kDa であるところ、S D S - P A G Eでは 90 kDa 付近に2本のバンドとして見られた。同様に、A s E g t Bタンパク質はアミノ酸配列からの想定分子量が 56.4 kDa であるところ、S D S - P A G Eでは 50 kDa 弱のバンドとして見られた。また、A s E g t Cタンパク質はアミノ酸配列からの想定分子量が 51.2 kDa であるところ、S D S - P A G Eでは 50 kDa のバンドとして見られた。

【0187】

図9から、コントロール株はA s E g t Aタンパク質、A s E g t Bタンパク質及びA s E g t Cタンパク質をほとんど発現しておらず、（A s E g t A + A s E g t B）形質転換体及び（A s E g t A + A s E g t C）形質転換体はA s E g t Aタンパク質とA s E g t Bタンパク質又はA s E g t Cタンパク質とを発現していた。また、A s E g t A形質転換体、A s E g t B形質転換体及びA s E g t C形質転換体は、それぞれ対応するA s E g t Aタンパク質、A s E g t Bタンパク質及びA s E g t Cタンパク質を発現していた。

【0188】

10

20

30

40

50

[例12. 形質転換大腸菌の作製]

A s E g t A 及び A s E g t C のそれぞれのアミノ酸配列をもとに、コドン、二次構造、GC 含量などの観点から大腸菌発現用に遺伝子配列を最適化したものに、遺伝子の上流に E c o R V 配列 (G A T A T C) を付加し、かつ、下流に S p e I 配列 (A C T A G T) を付加することにより、E c E g t A (配列番号27) 及び E c E g t C (配列番号28) を得た。

【0189】

発現用ベクターとして p U T E 1 2 0 K ' を構築した。すなわち、特開平6-292584号公報に記載の p U T E 1 0 0 K ' を N h e I 及び H p a I で消化し、l a c プロモーターを除去した。次いで、p K K 2 2 3 - 3 (G E 社) の T a c プロモーター領域を3' 10
末端に N h e I サイト及び5' 末端に E c o R V サイトを付加して P C R で増幅及び精製した。次いで、N h e I 消化した後、p U T E 1 0 0 K ' の本来 l a c プロモーターがあった部位に挿入して、p U T E 1 2 0 K ' を作製した。

【0190】

p U T E 1 2 0 K ' を E c o R V 及び S p e I を用いて制限酵素処理し、次いで E c E g t A 又は E c E g t C をライゲーションして、E c E g t A 又は E c E g t C が挿入されたプラスミド p U T E 1 2 0 K ' - E c E g t A 及び p U T E 1 2 0 K ' - E c E g t C を作製した。

【0191】

上記コンストラクト用プラスミドにて形質転換した大腸菌を培養し、プラスミド p U T E 20
1 2 0 K ' - E c E g t A 及び p U T E 1 2 0 K ' - E c E g t C を精製した。次いで、p U T E 1 2 0 K ' - E c E g t C を B a m H I 及び S p e I で制限酵素処理をし、遺伝子 E c E g t C を含む断片を切り出し、精製した。また、p U T E 1 2 0 K ' - E c E g t A を B a m H I 及び N h e I で制限酵素処理し、上記遺伝子 E c E g t C を含む断片を挿入して、プラスミド p U T E 1 2 0 K ' - E c E g t A - E c E g t C を作製した。該プラスミドを用いて、大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換して、形質転換大腸菌を得た。

【0192】

形質転換大腸菌を、1 m M セレノシスチン又は 1 m M 亜セレン酸及び 0 . 1 m M イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) を含む T Y 培地 (1 % (w / v) バクト・トリプトン、0 . 5 % (w / v) バクト・イースト・エクストラクト、0 . 30
5 % (w / v) N a C l 、p H 7 . 0) を用いて、25℃で16時間培養することにより、培養液全体及び回収した菌体の熱水抽出液中にセレノニンが検出される。

【0193】

[例13. 遺伝子 A n E g t A を挿入した DNA コンストラクトの作製]

(1) 対象タンパク質の探索

データベース Non - r e d u n d a n t p r o t e i n s e q u e n c e s (n r) を基に、アスペルギルス・ソーヤの A s E g t A タンパク質のアミノ酸配列をクエリーとして配列同一性の高いタンパク質を検索した。検索には B l a s t p (h t t p : / / b l a s t . n c b i . n l m . n i h . g o v / B l a s t . c g i ? P R O G R A M = b l a s t p & P A G E _ T Y P E = B l a s t S e a r c h & L I N K _ L O C = b l a s t h o m e) を用いた。 40

【0194】

その結果、A s E g t A タンパク質のアミノ酸配列と配列同一性が高かったタンパク質のうち、アスペルギルス・ニガーである A s p e r g i l l u s n i g e r C B S 5 1 3 . 8 8 株の相同タンパク質として X P _ 0 0 1 3 9 7 1 1 7 . 2 (配列番号30) が見出された。X P _ 0 0 1 3 9 7 1 1 7 . 2 は、A s E g t A タンパク質と73%の配列同一性が認められた。X P _ 0 0 1 3 9 7 1 1 7 . 2 をコードする遺伝子をアスペルギルス・ニガーのゲノム DNA から特定し、アスペルギルス・ニガー由来の e g t A 遺伝子という意味で、遺伝子 A n E g t A (配列番号29) と名付けた。

【0195】

(2) アスペルギルス・ニガー I A M 2 5 3 3 株の染色体 DNA の抽出
アスペルギルス・ニガー I A M 2 5 3 3 株の分生子を用いた以外は、上記例 1 - (2) と同様の方法で実施した。

【0196】

(3) コンストラクト用プラスミドの作製

上記例 1 - (3) で作製したベクター断片を用いた。

【0197】

(4) 対象遺伝子挿入コンストラクトの作製

対象遺伝子が AnEgtA 遺伝子であること及び鋳型 DNA として上記で得られたアスペルギルス・ニガー I A M 2 5 3 3 株の染色体 DNA を用いた以外は、上記例 1 - (4) と同様の方法で実施した。なお、AnEgtA 遺伝子を増幅するために使用したプライマー及び PCR 条件を下記表 11 に示す。

【0198】

【表 11】

増幅対象領域	AnEgtA
フォワードプライマー (配列番号 31)	AnEgtA_1F_Ptef cgcaccacottcaaaATGTCACCCCTTATGTCGGTCGTCAAG
リバースプライマー (配列番号 32)	AnEgtA_2890R_Talp atgtactcctggtacTCAGACATCCCGCACCCAGCC
PCR条件	(94℃、2分、(94℃、15秒、62℃、30秒、68℃、3分) ×25回)

【0199】

なお、上記例 1 - (4) と同様にして、抽出したプラスミド DNA 中に挿入された DNA の塩基配列を決定することにより、遺伝子 AnEgtA が挿入された DNA コンストラクトが得られたことを確認した。

【0200】

クローニングした遺伝子 AnEgtA の配列を確認したところ、ゲノム情報が公開されている *A. niger* CBS 513.88 株の予測遺伝子 (ANI__1__792134) の配列と一致した (対応するアミノ酸配列は上記 XP__001397117.2)。

【0201】

[例 14. 形質転換アスペルギルス・ソーヤの作製 (2)]

遺伝子 AnEgtA を挿入した DNA コンストラクトを用いた以外は、上記例 2 - (1) 及び (2) と同様の方法で実施した。

【0202】

[例 15. 形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いたセレノニン生産 (3)]

コントロールであるアスペルギルス・ソーヤ NBRC 4239 株及び遺伝子 AnEgtA により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの分生子を接種した以外は上記例 7 と同様の方法により実施した。得られたエルゴチオニン抽出液及び本培養後の培養物から得た培養上清 (0.45 μm フィルターを用いたろ過処理済み) について、ヤマシタらの文献に記載の条件にて、LC-ICP-MS によりセレノニンを定量した。コントロール株及び形質転換アスペルギルス・ソーヤによるセレノニン生産量を比較した結果を表 12 に示す。

【0203】

【表 1 2】

微生物株	セレン化合物	セレン (mg Se/kg-抽出液)	セレン (mg/L-抽出液)	セレン (mg/L-培養液)
AnEgtA形質転換株	セレンシスチン	2.9	10.2	2.00
コントロール株	セレンシスチン	0.1	0.35	0.07
AnEgtA形質転換株	亜セレン酸	0.2	0.70	0.14
コントロール株	亜セレン酸	0.1	0.35	0.07

【0204】

表12に示されているとおり、遺伝子AsEgtAにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤと同様に、遺伝子AnEgtAにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤは、形質転換していないコントロール株よりも、いずれの基質を用いた場合にも、抽出液中及び培養液中のセレノネインの生産量が多かった。これらの結果より、由来生物種が異なる異種遺伝子AnEgtAにより形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤにおいてもセレノネインを効率的に生産できることがわかった。

【0205】

[例16. 形質転換大腸菌を用いたセレノネイン生産]

下記表13に示すとおり、コントロールである発現用ベクターpUTE120K'を導入した大腸菌；遺伝子EcEgtA又はEcEgtCにより形質転換した形質転換大腸菌；及び遺伝子EcEgtAと遺伝子EcEgtCとにより形質転換した形質転換大腸菌のそれぞれのセレノネイン生産能を以下のとおりと比較した。

【0206】

【表 1 3】

導入遺伝子	菌株名称
pUTE120K'	コントロール株
EcEgtA	EcEgtA 形質転換株
EcEgtC	EcEgtC 形質転換株
EcEgtA, EcEgtC	(EcEgtA+EcEgtC) 形質転換株

【0207】

19ml容試験管中のTY培地 2.5mlに、表13に示す各菌株を接種し、37℃で16時間、180rpmでの振とう条件下で、種培養を行った。種培養した培養液 20μlを、19ml容試験管中のアンピシリン及び0.5mM IPTGを含有するTY培地 2.5mlに接種し、25℃で20.5時間、180rpmでの振とう条件下で、本培養を行った。なお、本培養に用いたTY培地には、0.1mM セレノシスチンを含有するもの(TY++)、0.01mM セレノシスチンを含有するもの(TY+)及び培養開始6時間後に0.01mMになるようにセレノシスチンを添加したもの(TY+)の3系統を用意した。

【0208】

さらに、これらとは別に、種培養した培養液 20μlを、19ml容試験管中のアンピシリン及び0.5mM IPTGを含有するTY培地 0.6mlに接種し、25℃で25時間、180rpmでの振とう条件下で、本培養を行った。この際、0.01mMになるようにセレノシスチンを添加した後に、培養開始から20.5時間後に2.5mMのセレノシスチンを10μl添加し、さらに4.5時間培養した(TY+++).

【0209】

培養後の培養物から遠心分離（12,000rpm、4、10分）をすることにより菌体を沈殿物として回収した。TY+++、TY+及びTY+について1mlの培養液から得られる菌体及びTY+++について0.6mlの培養液から得られる菌体に、0.2mlの水を添加し、菌懸濁液を得た。得られた菌懸濁液を、98、10分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により上清として回収した菌体外液を、0.45µmフィルターでろ過することにより、セレノネイン抽出液を得た。

【0210】

得られたセレノネイン抽出液及び本培養後の培養物から得た培養上清（0.45µmフィルターを用いたろ過処理済み）について、下記の条件のLC-MS/MSによりセレノネインを定量した。セレノネインを定量した結果を表14に示す。

LC装置；ACQUITY UPLC（Waters社）

質量分析装置；Micromass Quattro micro API（Waters社）

カラム；COSMOSIL 2.5HILIC（3.0×100mm）

溶離液；アセトニトリル+0.1%ギ酸：水+0.1%ギ酸=80：20（v/v）

流速；500µl/ml

検出；ESI positive

Injection；2µl

温度；40

定量法；セレノネイン標品（アスペルギルス・オリゼ生産）を用いた検量線法

【0211】

【表14】

菌株	培養系統	濃縮率	セレノネイン mg/L-抽出液	セレノネイン mg/L-培養液
EcEgtA形質転換株	TY++	5	nd	nd
EcEgtC形質転換株	TY++	5	nd	nd
(EcEgtA+EcEgtC)形質転換株	TY++	5	0.12	0.02
コントロール株	TY++	5	nd	nd
EcEgtA形質転換株	TY+	5	0.67	0.13
EcEgtC形質転換株	TY+	5	nd	nd
(EcEgtA+EcEgtC)形質転換株	TY+	5	0.92	0.18
コントロール株	TY+	5	nd	nd
EcEgtA形質転換株	TY+○	5	0.65	0.13
EcEgtC形質転換株	TY+○	5	nd	nd
(EcEgtA+EcEgtC)形質転換株	TY+○	5	0.96	0.19
コントロール株	TY+○	5	nd	nd
EcEgtA形質転換株	TY+++	3	0.86	0.29
EcEgtC形質転換株	TY+++	3	nd	nd
(EcEgtA+EcEgtC)形質転換株	TY+++	3	1.60	0.53
コントロール株	TY+++	3	nd	nd

【0212】

表14に示されているとおり、いずれの培養系統においても、コントロール株及びEcEgtC形質転換株では、培養上清及びセレノネイン抽出液にかかわらずセレノネイン量が認められなかった。このことから、コントロール株及びEcEgtC形質転換株は、セレノネインの生産能がないこと、又はセレノネインの生産能は非常に微小であることがわかった。

【0213】

一方で、EcEgtA形質転換株及び(EcEgtA+EcEgtC)形質転換株では、

セレノネインの生産能が確認できた。また、(E c E g t A + E c E g t C) 形質転換株によるセレノネイン量は、E c E g t A 形質転換株によるセレノネイン量よりも多く、それらの差異は培養上清において顕著であった。また、培地中へのセレノシスチンの添加の影響を比較したところ、E c E g t A 形質転換株及び(E c E g t A + E c E g t C) 形質転換株のいずれにおいても、培養開始から十分な時間が経った後に培地中へセレノシスチンを添加することにより、セレノネイン量は増加した。なお、TY++系統については、セレノシスチンが培養当初から高濃度に存在していたことから、生育阻害を起こすなどして、結果的にセレノネイン量が小さくなった。このことから、セレノシスチンの添加量は、培養当初には菌体濃度に対して十分に小さい量であることが好ましく、培養経過時に、又は菌体濃度が高まるにつれて増やすことが好ましいことがわかった。

10

【0214】

以上の結果より、E c E g t A 形質転換株はセレノネインの生産量が多いものの、E C E g t C 形質転換株のセレノネインの生産量は検出できなかったことから、(E c E g t A + E c E g t C) 形質転換株は、E c E g t A 形質転換株に対して、相加的というよりもむしろ相乗的にセレノネインの生産能が増強されたものであることがわかった。

【0215】

[例17. セレン酵母を培地とした形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いたセレノネイン生産]

200ml 容三角フラスコ中にて、セレン酵母液体培地 40ml (1.5% (w/v) セレン酵母、2% (w/v) デキストリン、0.5% (w/v) KH₂PO₄、0.05% (w/v) MgSO₄・7H₂O; pH未調整) に、遺伝子 A s E g t A により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの分生子を接種し、30 で5日間、160rpmで振とう培養を行った。

20

【0216】

次いで、培養後の培養物から菌体をミラクロス(カルバイオケム社)上で回収した。回収した菌体を40mlの蒸留水で洗浄した後、8mlの水を添加して攪拌することにより、菌懸濁液を得た。得られた菌懸濁液を、100、15分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により上清として回収した菌体外液を、0.45µmフィルターでろ過することにより、セレノネイン抽出液を得た。

【0217】

得られたセレノネイン抽出液及び生産株未接種の培地について、LC-MS/MSによりセレノネインを定量した。セレノネインを定量した結果を表15に示す。形質転換アスペルギルス・ソーヤは、セレン酵母中のセレンを利用して、セレノネインを生産できることが確認された。

30

【0218】

【表15】

	セレノネイン(ppm)
セレン酵母培地	n. d.
抽出液	3.39 ppm

【0219】

[例18. カツオマグロエキス(Bacterio-N-KN)を培地とした形質転換アスペルギルス・ソーヤを用いたセレノネイン生産]

200ml 容三角フラスコ中にて、カツオマグロエキス液体培地 40ml (2.0% (w/v) Bacterio-N-KN(マルハニチロ社)、2% (w/v) デキストリン、0.5% (w/v) KH₂PO₄、0.05% (w/v) MgSO₄・7H₂O; pH未調整) に、遺伝子 A s E g t A により形質転換した形質転換アスペルギルス・ソーヤの分生子を接種し、30 で5日間、160rpmで振とう培養を行った。

【0220】

50

次いで、培養後の培養物から菌体をミラクロス（カルバイオケム社）上で回収した。回収した菌体を40mlの蒸留水で洗浄した後、4mlの水を添加して攪拌することにより、菌懸濁液を得た。得られた菌懸濁液を、100、15分の条件で加熱処理に供した。該処理後、遠心分離により上清として回収した菌体外液を、0.45μmフィルターでろ過することにより、セレノネイン抽出液を得た。

【0221】

得られたセレノネイン抽出液及び生産株未接種の培地について、LC-MS/MSによりセレノネインを定量した。セレノネインを定量した結果を表16に示す。形質転換アスペルギルス・ソーヤは、カツオマグロエキス中のセレンを利用して、セレノネインを生産できることが確認された。

10

【0222】

【表16】

	セレノネイン(ppm)
カツオマグロ液体培地	n. d.
抽出液	0.345 ppm

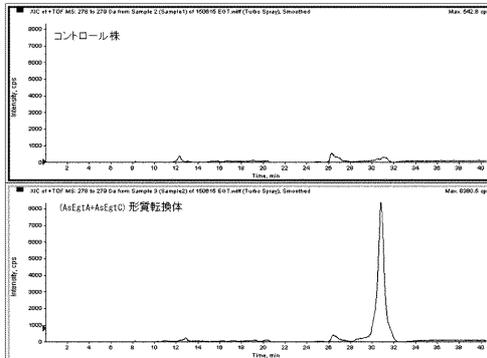
【産業上の利用可能性】

【0223】

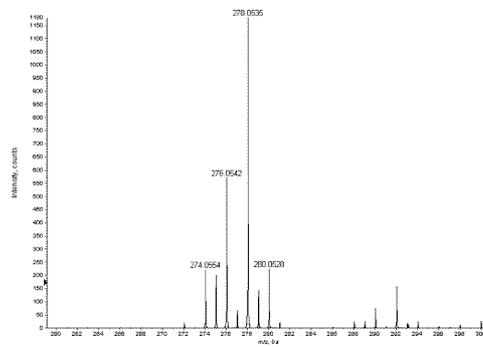
本発明の一実施態様である製造方法や形質転換体は、エルゴチオネインの1,000倍に達するといわれている抗酸化活性を有するセレノネインを大量に製造するために利用することができる。したがって、本発明は、抗酸化機能が付与された化粧品やサプリメントなどの抗酸化製品を製造するための原料を工業的規模で製造するために利用可能である。

20

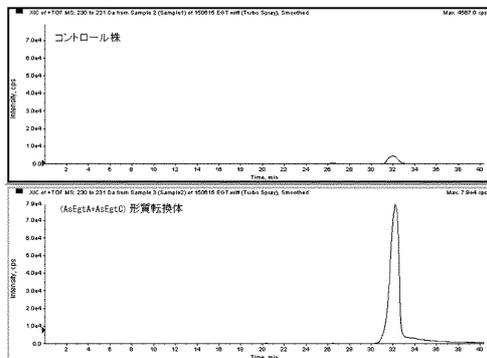
【図1】



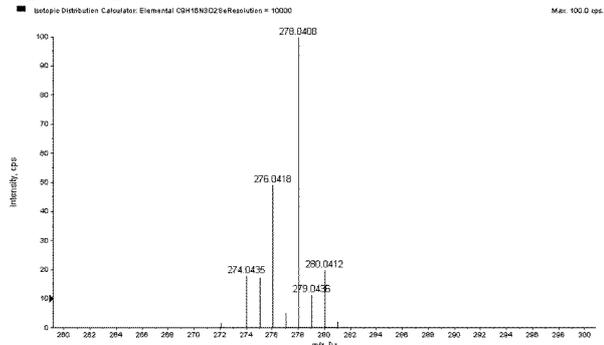
【図3】



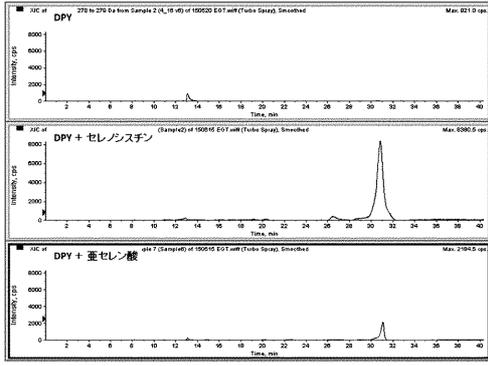
【図2】



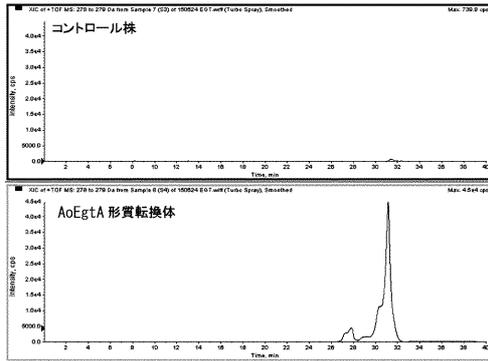
【図4】



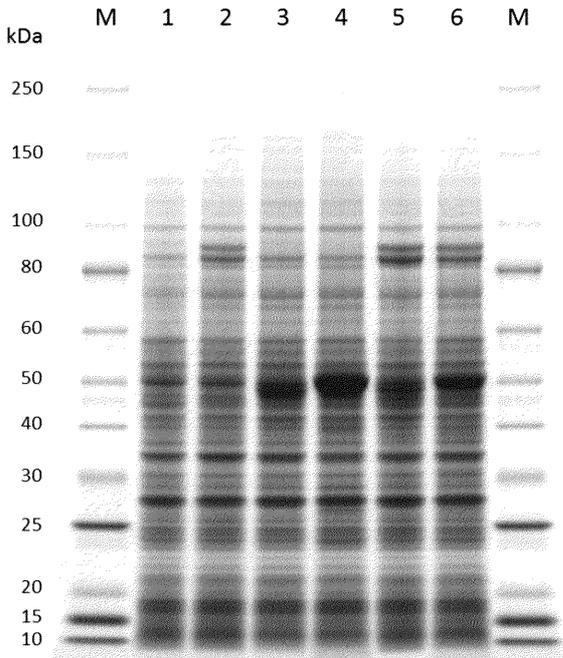
【 図 5 】



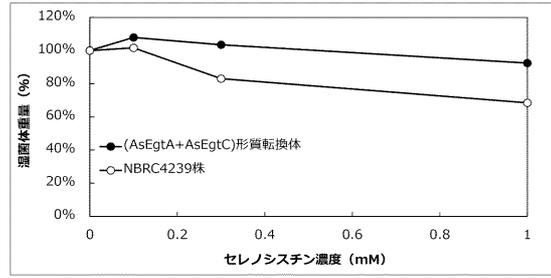
【 図 6 】



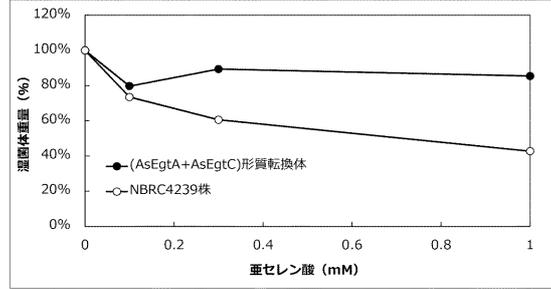
【 図 9 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

0006932354000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 R	1/665 (2006.01)	C 1 2 R	1:665
C 1 2 R	1/685 (2006.01)	C 1 2 R	1:685
C 1 2 R	1/69 (2006.01)	C 1 2 R	1:69

(72)発明者 原 精一

千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内

(72)発明者 黒澤 恵子

千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内

(72)発明者 山下 由美子

神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 1 2 - 4 国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所内

(72)発明者 山下 倫明

神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 1 2 - 4 国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所内

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 database GenBank [online], 2011年06月04日, BAE60470, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAE60470.1>, [検索日 2 0 1 6 年 2 月 2 5 日]
 database GenBank [online], 2014年05月16日, KDE85407, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KDE85407.1>, [検索日 2 0 1 6 年 2 月 2 5 日]
 database GenBank [online], 2012年06月18日, EIT79021, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EIT79021.1>, [検索日 2 0 1 6 年 2 月 2 5 日]
 PLOS ONE, 2014年, vol.9 no.5 e97774, pp.1 12
 JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1970年, vol.103 no.2, pp.475 478
 J. Biol. Chem., 1956年, vol.223, pp.9 17
 CHEMBIOCHEM, 2014年, vol.16, pp.119 125

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

R E G I S T R Y (S T N)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d