

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-61663
(P2003-61663A)

(43) 公開日 平成15年3月4日 (2003. 3. 4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
		9/24	4 B 0 5 0
		C 1 2 P 19/28	4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/28		C 1 2 R 1:01	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	審査請求 未請求 請求項の数7 OL (全 23 頁)		最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-249782 (P2001-249782)

(22) 出願日 平成13年8月21日 (2001. 8. 21)

(71) 出願人 800000035

株式会社産学連携機構九州

福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

(72) 発明者 伊東 信

福岡県福岡市西区愛宕浜4-34-1

(72) 発明者 末吉 紀行

福岡県古賀市花見東5-12-12

(72) 発明者 澄田 智美

福岡県福岡市東区箱崎6-4-11-105

(74) 代理人 100087675

弁理士 筒井 知

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物を用いたスフィンゴ糖脂質の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素を産生するエキソ型ガングリオシド分解酵素産生菌 *Paenibacillus* sp. と、新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素と、新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素を生産する製造方法とを提供すること。

【解決手段】 新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素は、エキソ型ガングリオシド分解酵素を生産する *Paenibacillus* sp. TS12 F E R M P - 1 8 4 1 6 を培養することによって製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で示す塩基配列ならびに配列番号2で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- グルコシダーゼ遺伝子 (glc4)。

【請求項2】 配列番号3で示す塩基配列ならびに配列番号4で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- グルコシダーゼ遺伝子 (glc8)。

【請求項3】 配列番号5で示す塩基配列ならびに配列番号6で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- グルコシダーゼ遺伝子 (glc28)。

【請求項4】 配列番号7で示す塩基配列ならびに配列番号8で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- ヘキササミニダーゼ遺伝子 (hex36)。

【請求項5】 エキソ型ガングリオシド分解酵素 (- グルコシダーゼ、 - ヘキササミニダーゼ、シアリダーゼおよび - ガラクトシダーゼ) を生産する *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P - 18416。

【請求項6】 *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P - 18416由来の - ヘキササミニダーゼ遺伝子および - グルコシダーゼ遺伝子の大腸菌による組み換え体ポリペプチド。

【請求項7】 エキソ型ガングリオシド分解酵素産生菌 *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P - 18416を粗ガングリオシドと共培養して各種スフィンゴ糖脂質を得ることを特徴とするスフィンゴ糖脂質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は、微生物を用いたスフィンゴ糖脂質の製造方法に関するものである。詳細には、ガングリオシドを分解する新規バクテリア、および新規エキソグリコシダーゼとそれらの遺伝子並びにそれらを用いたスフィンゴ糖脂質の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴシン塩基を含むセラミドを脂質部分として持つ糖脂質の総称で、なかでもガングリオシドはシアル酸を分子内に有するスフィンゴ糖脂質の一群につけられた名称である。ガングリオシドという名称は、神経節(ガングリオン)に由来しているが、実際に脳や神経系に豊富に存在している(Ledeer, R. W. (1989) Biosynthesis, metabolism, and biological effects of gangliosides, In Neurobiology of Glycoconjugates; Margolis, R. U. and R. K. Margolis, eds)。ガングリオシドは、成長因子受容体などの膜貫通型タンパク質の機能(多くはリン酸化)を調節することで細胞増殖を制御したり、神経系では軸索の伸長やシナプスの形成にも重要な機能を果たしていると考えられている。一方、ある種の病原菌や毒素の受容体としても注目されている。例えば、ある種のガングリオシドはインフルエンザウイルスのレセプターとして、

また、GM1ガングリオシドはコレラ毒素の受容体として知られている。最近になって、ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質は、スフィンゴミエリンやコレステロールとともに細胞膜マイクロドメインを形成し、同じくマイクロドメインに集積するsrc-family キナーゼやGPI型タンパク質と相互作用することで細胞機能を調節している可能性が指摘されている。ガングリオシドは、分子内に十数個のシアル酸を有しており、骨格となる中性糖鎖の構造に基づいておよそ5つの系統に分類される。なかでも、Gal 1-3GalNAc 1-4Gal 1-4Glc 1-1'Cer (セラミド)という4糖を骨格に持つガングリオテトラオース系列は、神経系に比較的豊富に存在している。ガングリオテトラオース系列のうち、シアル酸を1個有するGM1 (モノシアロガングリオテトラオシルセラミド)はこれまで最もよく研究されてきたガングリオシドの一つで、現在までにアルツハイマー (Svennerholm, L., (1994) Life Sci. 55, 2125-2134) やパーキンソン病 (Schneider J. S., Roeltgen, D. P., Rothblat, D.S., Chapas-Crilly, J., Seraydarian, L., and Rao, J., (1995) Neurology 45, 1149-1154)、脊髄損傷 (Geisler, F. H., Dorsey, F. C., and Coleman, W. P., (1991) New England J. Med. 324, 1829-1838)、脳卒中 (Argentino, C., Sacchetti, M. L., Toni, D., Savoini, G., D'Arcangelo, E., Erminio, G. A., Ponari, O., Rebucci, G., Senin, U., and Fieschi, C., (1989) Stroke 20, 1143-1149)、胎児アルコール障害 (Basalingappa, L. H., Donald, R. C., and Vinayak, G.S. (1994) Alcohol Clin. Exp. Res. 18, 1248-1251) などの様々な神経疾患への臨床応用が試みられている。スフィンゴ糖脂質の調製は、それぞれのスフィンゴ脂質が豊富に含まれていると思われる動物組織から行われている。例えば、ガングリオテトラオース系ガングリオシドであるGT1a, GD1a, GD1b, GM1は、ウシ脳から単離される。GM2は、正常な脳組織には殆ど存在せず、Tay-Sachs病の患者脳から単離される。GM3は、ヒト赤血球から単離される。ラクシルセラミド(LacCer)は、ウシやブタの臓器から単離される。グルコシルセラミド(GlcCer)は、Gaucher病患者の脾臓から単離される。セラミドは、ウシ脳から調製される。これらの天然物由来の標品以外に化学合成法によっても調製されているが、非常に高価である。従って、これらの各種ガングリオシドやスフィンゴ糖脂質を大量にしかも安価に調製する方法の開発が待たれている。動物の生体内でのガングリオシドの分解は、リソソームに存在する種々の糖加水分解酵素によって段階的に進められる。つまり、糖鎖の非還元末端から順次単糖が外れ、最終的にはセラミドが生成する。このセラミドは、リソソームに存在する酸性セラミダーゼによってスフィンゴシン塩基と脂肪酸に代謝される。一方、自然界ではどのようにしてガングリオシドやスフィンゴ糖脂質が分解されているのは明らかでない。自然界では、これらの

複合脂質の分解に微生物が関与していることは漠然と推測されているが、ガングリオシドやスフィンゴ糖脂質を単独で完全に分解できる微生物は知られていない。現在までに報告のあるガングリオシドあるいはスフィンゴ糖脂質に作用する微生物起源の酵素としては、非還元末端の位のシアル酸に作用するシアリダーゼ (Sugano, K., Saito, M., and Nagai, Y., (1978) FEBS Lett. 89, 321-325)、スフィンゴ糖脂質のオリゴ糖鎖とセラミド間のグリコシド結合を加水分解するエンドグリコセラミダーゼ (EGCase) (Ito, M. and Yamagata, T. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14278-14282)、また、スフィンゴ糖脂質のセラミド内にあるスフィンゴシン塩基と脂肪酸との酸アミド結合を加水分解するグリコスフィンゴ脂質セラミドデアシラーゼ (Hirabayashi, Y., Kimura, Matsumoto, M., Yamamoto, K., Kadowaki, S, Tochikura, T. (1988) J. Biochem. (Tokyo) 103, 1-4) およびスフィンゴ糖脂質のみならずスフィンゴミエリンのセラミドの酸アミド結合も加水分解するスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ (SCDase) (Ito, M., Kurita, T., and Kita, K. (1995) J. Biol. Chem. 270, 24370-24374) などがある。しかし、シアリダーゼを除いてガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質糖鎖の非還元末端に作用する微生物起源のエキソグリコシダーゼは未だ報告がない。

【0003】グリコシダーゼは、その性質によってエキソ型とエンド型に分けられる。エキソ型酵素は、糖鎖の非還元末端の糖に作用し、単糖を遊離する。一方、エンド型酵素は、糖鎖の内部グリコシド結合に作用し、単糖ではなくオリゴ糖あるいはより大きな糖鎖を遊離する。一般に、微生物由来のエキソグリコシダーゼは、動物起源の酵素と比較すると糖鎖部分の構造に対する特異性が厳密である。この性質を利用して糖タンパク質やオリゴ糖鎖の構造解析に繋ぎされてきた。しかし、ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質糖鎖に作用する微生物由来のエキソ型グリコシダーゼは、シアリダーゼ以外には知られておらず、植物や動物臓器由来の酵素を使用することを余儀無くされてきた。安価で大量に調製可能な微生物起源のエキソ型グリコシダーゼの開発が待たれている。微生物由来のエキソグリコシダーゼは、糖鎖配列自動決定装置 (糖鎖シーケンサー) の開発にも欠かせない。また、エキソ型グリコシダーゼを動物や植物の培養細胞に作用させ、細胞表面の糖鎖をトリミングすることによって、細胞の増殖、分化、サイトカインや増殖因子との応答性の変化を調べ、糖鎖の機能を知ることもできる。さらに、糖鎖をトリミングすることで積極的に細胞機能を変化させる細胞工学的な試みも可能であろう。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、ガングリオシドを分解する微生物について鋭意研究・検討した結果、ある種の微生物が単独でGD1a, GM1等のガングリオシドを完全に分解することを見出した。さらに検討を

続けた結果、本菌は培地中にガングリオシドに作用する特異性の高いエキソ型グリコシダーゼを産生することを突き止めた。そこで、発現クローニング法を用いて、幾つかのエキソ型グリコシダーゼの遺伝子を取得し、この発明を完成した。

【0005】今回適用した発現クローニング法は、酵素生産菌のゲノムDNAを制限酵素で適当な大きさに切断し、発現ベクターに繋いで大腸菌に導入した後、寒天プレート上で大腸菌の酵素活性を判定し、目的の遺伝子をクローン化する方法である。この方法は、煩雑なタンパク精製を行わずに直接目的遺伝子を得ることができ、今回のように一つのバクテリアから多数の遺伝子を単離する場合に、効力を発揮する。目的酵素の人工発色基質が手に入るかどうかは鍵であるが、今回は市販の基質が利用できることが判明した。この方法は、大腸菌で発現する遺伝子のみにはしか単離できないが、そのことは逆に遺伝子を取得できれば、大腸菌で必ず発現できることを意味しているし、大量生産も可能な場合が多い。実際、今回単離した4つの遺伝子 (hex36およびglc4, glc8, glc28) は全て大腸菌で発現させることができた。

【0006】この発明の目的は、(1)ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質を単独で完全に分解できるバクテリアを提供すること、(2)微生物起源の特異性の高いエキソ型グリコシダーゼ遺伝子を提供すること、(3)糖脂質の糖鎖に作用する新規なエキソ型グリコシダーゼを提供すること、(4)微生物を使用した簡便なフィンゴ糖脂質の製造方法を提供することを目的としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、まず、この発明は、ガングリオシドを分解できる微生物の単離を試み、ガングリオシドを完全分解できる細菌 *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P-18416 を提供する。次に、この発明は、*Paenibacillus* sp. TS12株のゲノムDNAライブラリーを作製し、蛍光基質 4-メチルウンベリフェリル-グリコシド類 (4MU-glycosides) を用いた発現クローニング法によって得られる各種グリコシダーゼ遺伝子を提供する。さらに、この発明は、クローン化した遺伝子で大腸菌で大量発現させ、糖脂質の糖鎖に作用する新規なエキソグリコシダーゼを提供する。また、この発明は、ガングリオシド分解酵素生産菌である *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P-18416 を粗ガングリオシドと共培養して、糖鎖トリミングによってスフィンゴ糖脂質を製造する方法を提供する。

【0008】この発明を実施例によって更に詳細に説明する。

【実施例】この発明を実施例により更に詳細に説明する。

実施例1：ガングリオシド分解菌TS12株の単離と同定お

よび分解機序の検討

(ガングリオシド分解菌TS12株の単離) 福岡県福岡市東区箱崎の土壌から採集したサンプルを、モノシアロガングリオテトラオシルセラミド (GM1) を含む合成培地

(0.05% GM1, 0.05% NH₄Cl, 0.05% K₂HPO₄, 0.5% NaCl, 0.05% タウロデオキシコール酸ナトリウム, pH 7.2-7.4) 100 μl 中に加え、30 °C で2日間培養した。その後、培養上清を20 μl 乾燥させ、クロロホルム/メタノール

(2/1, v/v) 5 μl に溶解してTLCに負荷した。薄層クロマトグラフィー (TLC) はクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v) で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた。その結果、12番のサンプルに活性が見られた(図1(A))。TS12株によるGM1の分解の時間変化をTLCを用いて調べた結果、GM1は、時間経過とともにアジアロGM1、アジアロGM2、ラク

トシルセラミド(LacCer)、グルコシルセラミド(GlcCer)の順に分解された。この結果は、本菌がGM1に作用するエキソ型のシアリダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 α -ヘキソサミニダーゼを生産していることを示している(図1(B))。次に、セラミドの脂肪酸の位置に蛍光でラベルされたNBD-GM1を用いてGlcCerから先に分解が進むかを調べた。その結果、TS12株はGlcCerに作用してグルコースを遊離し、セラミドを生成する α -グルコシダーゼも生産していることが分かった。また、TS12株は、GM1だけでなくGD1a, GD1b, GT1a等の複数のシアル酸を持つガングリオシド、GM2, GM3等の短鎖のガングリオシド、LacCerのような中性スフィンゴ糖脂質を分解してGlcCerを生成した。しかし、スルファチドやグロボシドは分解しなかった。

【0009】(ガングリオシド分解菌TS12株の同定) 単離した菌株TS12株の同定は、基本的にはBergey's Manual (第8版) (Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., (1974)) に基づいて行った。培養温度は30 °C で行った。運動性、グラム染色の判定は光学顕微鏡観察で行った。オキシダーゼテストはKovacsらの方法(Kovacs, N. (1956) Nature, 178, 703)を用い、グルコースの利用(O-Fテスト)はHughとLeifsonの方法(Hugh, R., and Leifson, E. (1953) J. Bacteriol. 66, 24-26)を用いた。16S rDNA解析は平石の方法(Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology Vol. 10, No. 2, 81-102, (1995))に従った。その結果、TS12株は、運動性のある短桿菌で、電子顕微鏡観察の結果、周毛を有していた。また、TS12株は、グラム染色陰性、カタラーゼ陰性、オキシダーゼ陽性、GC含量49%であった(表1)。さらに、16S rDNAによる解析を行った結果、本菌は、Paenibacillus属の一種であると同定された。本菌はFERMにP-18416として寄託している。

【0010】表1: 各種生理生化学的試験形態

短桿菌

運動性	+
グラム染色	-
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	-
0% NaCl 中での生育	+
0.5% NaCl 中での生育	+
3% NaCl 中での生育	+
5% NaCl 中での生育	-
7% NaCl 中での生育	-
コロニーの色	乳白色
O/Fテスト	-
GC含量	49%

【0011】(TS12株によるGM1の分解) TS12株を、前述のGM1合成培地250 μl に植菌し、30 °C で54時間培養し、6時間ごとに培地中のGM1の分解をTLCにて確認したところ、分解は時間経過とともに進行し、最終的にGM1はGlcCerに変換された。なお、TLCは、クロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v) で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた。発色させた糖脂質の吸光度(540 nm)をデンストメータ(SHIMADZU CS-9300 PC)で定量した結果、時間経過とともに培地中のGM1は減少してアジアロGM1(AsGM1)が増加し、さらにLacCerに変換され、最終的にGM1はGlcCerに変換された(図2)。以上の結果から、TS12株は、GM1に作用するエキソ型のシアリダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 α -ヘキソサミニダーゼを生産していることが明らかとなった。

【0012】(TS12株によるNBD-GM1の分解) オルシノール硫酸法は、糖鎖の検出試薬であるため、糖脂質は検出できるが、セラミドは検出できない。そこで、セラミドの脂肪酸部位が蛍光標識されているNBD-GM1を用いてGlcCerからさらにセラミドにまで分解が進むかどうかを調べた。TS12株をNBD-GM1を250 pmol含む合成培地50 μl に植菌し、30 °C で3日間培養した上清を20 μl 回収し、TLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v) で展開し、トランスイルミネーターで紫外線照射し、NBD-GM1の分解を調べた。その結果、NBD-GM1はセラミドにまで分解されることが判明した(図3)。以上の結果から、TS12株はGlcCerに作用する α -グルコシダーゼも生産していることが分かった。また、NBD-GM1の分解の様子から、本菌は、ガングリオシド糖鎖の非還元末端の糖を順に遊離し、資化していることが推測された。

【0013】(TS12株による各種スフィンゴ糖脂質の分解) TS12株を、ガングリオシドを含む各種スフィンゴ糖脂質(GQ1b, GT1b, GD1a, GD1b, GM1, GM2, GM3, LacCer, グロボシド, スルファチド) 1 μgを含む合成培地20 μl に植菌し、30 °C で3日間培養し、全量を乾燥し、TLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v) で展開し、糖脂質はオル

シノール硫酸で発色させた。上述のようにして、TS12株を各種スフィンゴ糖脂質とともに培養してそれぞれの分解をしらべた。その結果、TS12株は各種ガングリオシドおよびLacCerを分解してGlcCerに変換したが、グロボシド、スルファチドは分解しなかった。また、LacCerの分解速度はガングリオシドに比べて遅いことが判明した。以上の結果から、Paenibacillus属の細菌であると同定されたTS12株は、単独で各種ガングリオシドを分解することが明らかになった。また、本菌が自然界においてガングリオシドを分解・資化していることが示唆された。

【0014】実施例2：TS12株の各種エキソグリコシダーゼ遺伝子の発現クローニング

微生物起源の特異性の高いエキソ型グリコシダーゼは、糖鎖構造を決定する糖鎖自動シーケンサーの開発、特定のガングリオシドや糖脂質の大量調製、および動・植物細胞表面糖脂質糖鎖のトリミング等、糖鎖生物学、糖鎖工学における大きな貢献が期待される。ここでは、Paenibacillus sp. TS12株が生産する各種グリコシダーゼ遺伝子の発現クローニング法について記載する。

【0015】(蛍光基質の検討) 発現クローニングを行う前に、TS12株の生産する各種グリコシダーゼが蛍光基質である4-メチルウンベリフェリル-グリコシド類(4MU-glycosides)に作用するか調べた。その結果、TS12株のコロニーは4MU-グリコシド類と反応して蛍光を発することが確認された。これは、基質である4MU-グリコシド類がコロニー(細胞)中に取り込まれ、分解を受けて4MUの蛍光を発しているものと考えられる。具体的には、TS12株をLB平板培地にスプレッダーで播き、30で2日間培養した。生えてきたコロニーを2cm四方のバイオダイナミクスに写し取り、20μlの4MU-シアル酸(4MU-NeuAc)溶液(0.3mM 4MU-シアル酸, 10mM 酢酸バッファー, pH4.0)、4-MU-D-ガラクトシド(4MU-Gal)溶液(0.3mM 4MU-Gal, 10mM 酢酸バッファー, pH4.0)、4-MU-D-N-アセチルガラクトサミン(4MU-GalNAc)溶液(0.3mM 4MU-GalNAc, 10mM 酢酸バッファー, pH4.0)、4-MU-D-グルコシド(4MU-Glc)溶液(0.3mM 4MU-Glc, 10mM 酢酸バッファー, pH4.0)のそれぞれに浸した。これを37で30分間反応させ、紫外線照射により活性を確認した。

【0016】(発現クローニングの方法) TS12株のゲノムDNAをSau3AIで限定分解し、pBluscriptII SKベクターのBamHIサイトに組み込んでゲノムライブラリーを作製した。続いて、作製したゲノムライブラリーを大腸菌DH5にトランスフェクトし、各種4MU-glycosidesと反応させ、宿主にはないグリコシダーゼを新たに生産するコロニーをスクリーニングした。具体的には、TS12株を300mlのPY培地で30、3日間振とう培養し、8,000rpmで5分間遠心し、菌体を回収した。集めた菌体を4mlのTE buffer(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA)に懸濁し、4mgのリゾチームを加え37で10分間インキュベ

ートした。さらに1mlの10% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)を加え、菌体を溶菌させた後に750μlの5M NaClを加えた。5mlの平衡化フェノールを加え、よく転倒飽和した後に5,000rpmで10分間遠心して水層とフェノール層に分離し、水層を回収した。タンパク質の中間層がなくなるまでこの操作を繰り返し行った。次に等量のクロロホルムを加え転倒混和し、5,000rpmで10分間遠心して、水層とクロロホルム層に分離し、水層を回収した。得られた水層に等量のイソプロピルアルコールを加えてDNAを沈澱させ、このDNAを70%エタノールで洗浄した後にTE buffer 4mlに溶解した。このDNA溶液にRNase(20mg/ml)を10μl加え、50で1時間インキュベートしてRNAを分解した。さらに5M NaClを100μl、10% SDSを200μl、Proteinase K(20mg/ml)を25μlを加えて37で1時間インキュベートし、残りのタンパク質を分解した。続いて、上記と同様の方法でフェノール処理、クロロホルム処理、イソプロピルアルコール沈澱を行い、70%エタノールで洗浄したものを2mlのTE bufferに溶かし、分光光度計(Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech)にて定量した。50μgのゲノムDNAをSau3AIで限定分解し、約2k-8kbpの部分を4フラクションに切り出し、それぞれをSepaglas BandPrep Kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてゲルより抽出した。これをpBluscriptII SKベクターのBamHIサイトにLigation Pack(日本ジーン)を用いて組み込んだ。反応溶液をエタノール沈澱し、10μlの滅菌水に溶かし、ゲノムDNAライブラリーとした。

【0017】(-N-アセチルヘキソサミニダーゼ遺伝子の単離) 4MU-D-N-アセチルガラクトサミンを基質とした時に、本基質を分解するコロニーを1つ得た。形質転換した大腸菌の細胞抽出液を用いて基質特異性を検討したところ、本酵素は、AsGM2には作用したがGM2には作用しなかった。また、4MU-D-N-アセチルガラクトサミンのみならず、4MU-D-N-アセチルグルコサミンにも作用することが判明し、本酵素は、-N-アセチルヘキソサミニダーゼと同定された。2,934bpからなる-N-アセチルヘキソサミニダーゼ遺伝子(hex36)(配列番号7、8)は、978アミノ酸をコードし、その推定分子量は105,208、推定等電点は5.00であった。また、アミノ酸レベルでStreptomyces coelicolor, Vibrio cholerae, Homo sapiens, Mus musculusの-N-ヘキソサミニダーゼとそれぞれ41%、26%、26%、25%一致した。TS12株のヘキソサミニダーゼは他のヘキソサミニダーゼと比べて、C末が長く、分子量が大きいことが特徴としてあげられる。

【0018】以下、方法を具体的に記載する。4MU-GalNAcと反応して蛍光を発する1クローン(Hex36)からプラスミド(pHex36)を抽出し、インサートを解析した結果、このプラスミドには-N-ヘキソサミニダーゼ遺伝子が含まれているものの、その全長は含まれておらず、C

末部分が欠如していることが分かった。そこで、下線部をプローブとして、ヘキササミニダーゼのC末断片をサザンブロッティング、コロニーハイブリダイゼーションで取得し、Hex36の3'部分と入れ替えて全長の入ったクローンHex36Tを取得した。Hex36Tの取得は、次のような方法で行った。TS12株のゲノムDNA 500 ngを各種制限酵素で消化し、0.7%のアガロースゲルで泳動した。DNAをアガロースゲルからナイロンメンブレン (Hybond-N⁺、Amersham Pharmacia Biotech) に写し取った。このメンブレンを80 °Cで2時間乾燥させ、三方をシールしたハイブリバックにいれた。ここにハイブリダイゼーション溶液 (1 mM EDTAと7% SDSを含む0.5 M チャーチリン酸バッファー (pH 7.0)) を加え、ポリシーラーで閉じ、1時間プレハイを行った。プローブはReady-To-Go DNA Labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して [³²P] dCTPでラベルし、ハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション溶液中で65 °C、16時間行った。ハイブリダイゼーションさせた後、メンブレンは1% SDSを含む40 mM チャーチリン酸バッファー (pH 7.0) で3回洗浄し、imaging plateに曝した。20分後にBAS1500 imaging analyzer (FujiFilm) にて解析した。サザンブロッティングを行った結果、HindIIIで消化した約1.5 kbpのフラグメントにヘキササミニダーゼのC末部分が含まれていると予想されたので、このフラグメントを取得するために、TS12株のゲノムDNA 5 μgをHindIIIで消化して、0.7%のアガロースゲルで泳動した。約1.5 kbpのフラグメントを切り出し、ゲルから抽出した。これをpBluscript II SKベクターのHindIIIサイトにLigation Packを用いて組み込んだ。反応溶液をエタノール沈澱し、DH5 αに導入し、ヘキササミニダーゼのC末断片の遺伝子を含むゲノムライブラリーを作製して、³²Pでラベルしたプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った (参考文献: 実験医学 17(2), 172-174, 17(3), 517-514 1999)。

【0019】(TS12株のヘキササミニダーゼの基質特異性) GM2 (1 μg GM2, 0.1% TDC) 10 μl とHex36Tのライゼート10 μl を37 °Cで16時間反応させた。反応溶液には終濃度0.05%のTDCを加えた。反応させたサンプルを乾燥させ、クロロホルム/メタノール (2/1) 5 μl に溶解してTLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v) で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた。TS12株のN-アセチルヘキササミニダーゼ36 (Hex36) は、AsGM2には作用したが、GM2には作用しなかった。Bacillus属のAT173-1株もN-アセチルガラクトサミニダーゼを生産することが報告されているが (Tanaka, A and Ozaki, S. (1997) J. Biochem., 122,330-336)、AT173-1株の生産するN-アセチルガラクトサミニダーゼは、オリゴ糖末端のGalNAcには作用するが、糖脂質の末

端GalNAcには作用しない。よって、この発明に係るヘキササミニダーゼは、糖脂質に作用することが示されたので、新規のヘキササミニダーゼであるといえる。

【0020】(グルコシダーゼの発現クローニング) さらに、4MU-Glcを用いて、N-アセチルヘキササミニダーゼと同様な方法で発現クローニングを行った結果、約3,000個のコロニーから、3個の4MUの蛍光を発するコロニーが得られた。これら3個のpositiveクローン (クローンGlc8, クローンGlc4, クローンGlc28) の細胞抽出液を4MU-Glcとエッペンチューブ中で反応させたところ、分解が確認されたので、これら3クローンはグルコシダーゼを生産していることが分かった。それぞれのクローンが持っていたプラスミドpGlc8, pGlc4, pGlc28のインサートを解析した結果、glc8 (配列番号3, 4) は4,098 bpからなり、1,366アミノ酸をコードし、推定分子量145,254、推定pIは4.64だった。glc4 (配列番号1, 2) は、2,493 bpからなり、831アミノ酸をコードし、推定分子量90,706、推定pIは5.34だった。glc28 (配列番号5, 6) は、1,713 bpからなり、571アミノ酸をコードし、推定分子量63,628、推定pIは5.09だった。得られた3クローンの配列は、相互に一致しなかったため、それぞれ異なるグルコシダーゼをコードしていることが明らかとなった。

【0021】(グルコシダーゼの基質特異性) NBD-GlcCer溶液 (100 pmol NBD-GlcCer, 0.1% TDC) 10 μl とグルコシダーゼ遺伝子で形質転換した大腸菌の細胞抽出液10 μl を37 °Cで16時間反応させた。反応させたサンプルを乾燥させ、クロロホルム/メタノール (2/1, v/v) 5 μl に溶解してTLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v) で展開し、分解の様子を紫外線照射で確認した。その結果、グルコシダーゼ4 (Glc4) はNBD-GlcCerに作用してグルコースを遊離し、Cerを生成したが、グルコシダーゼ8 (Glc8)、グルコシダーゼ28 (Glc28) はNBD-GlcCerには作用しないことが判明した。

【0022】(DNAシーケンスとその解析) 発現クローニングで取得したpositiveコロニーをLB培地で16時間培養し、アルカリミニプレップ法でプラスミドを抽出し、得られたプラスミドのインサートの塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いDNAシーケンサー (Applied Biosystem 377型) にてチェーンターミネーター法で解析した。DNAの配列の分析はDNASIS (Hitachi Software Engineering) にて行った。

【0023】

【発明の効果】この発明で以下のような効果が期待される。微生物起源の特異性の厳格なエキソ型グリコシダーゼを用いることによって糖鎖シーケンサーの開発。

TS12株を用いたGlcCerの製造。
 シアリダーゼ阻害剤等を併用して、GM2, GM3 等の短鎖
 ガングリオシドの製造
 セラミドの製造。
 高度に精製した酵素を用いて細胞表面糖鎖のトリミング
 法の開発。

TS12株には、グルコシダーゼおよびヘキササミニダーゼ
 以外に、ガングリオシドに作用するガラクトシダーゼ及
 びシアリダーゼが存在する。それゆえ、TS12株は、これ
 ら新規遺伝子の取得の材料を提供する。

【0024】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;100>; UIP Co., Ltd.
 <;120>; Process for the production of gangliosides by using a microorgani
 sm
 <;130>; P0446T
 <;160>; 8
 <;210>; 1
 <;211>; 2496
 <;212>; DNA
 <;213>; Paenibacillus sp.
 <;400>; 1

gtggcgcaac tcacgcttga agaaaaagcc ggcctctgtt cgggggaaag cttttggagg 60
 accaaagcaa ttgatcgtct ggggattccg tccatcatga tgacagacgg acctcacggc 120
 ttgcgcaagc aagcggggga agcggacat ctgggactga acgagagcat tccggcaacg 180
 tgctttccga ccgccgccgg gcttgcgagc tcctgggacc gcgaactggt gcgaaaggta 240
 ggagaagcgc tgggaaagga aagccaggca gagaactct ccatcctgct gggacctggc 300
 gcgaatatta aacgttcgcc actgtgcggg aggaacttcg agtatatttc ggaagatccg 360
 tatctgacgg gcgagttggc cgcggcgcat attgcaggcg ttcaaagcca ggggtgcggc 420
 acgtcgtgta agcatttcgc tgtcaacaac caggagcadc gccggatgac gacggatgct 480
 gtgggtggacg aacggacgct cgcgaaaatt tatttgaccg gcttcgagat tgccgtgaag 540
 aaatcgcagc catggacggt catgtcggcg tacaaccgga tgaacggaac ctactgctcc 600
 gaaaacgaaa cgttgctgac ccgcattctg aaggaggaaat ggggccacga gggcatcgtc 660
 gtatcggact ggggcccgt caacgaagcg gctgcgagcg tggcggccgg catggagctg 720
 gagatgccgt ccagccatgg catcggccea aggaaaatcg tggcggcggt ggaagcggga 780
 gaactgtccg tcgaggcgt ggatcgggca gtgacgcggc ttttgactgt gattttcaaa 840
 gctgtcgaca gccggaagac ggacgccact tacgacaagg aagcgcata ctacttgcc 900
 cgcgaaatcg cccgcgaatc gatggtgctg ctcaaaaatg aaggcaatct gctcccgtg 960
 gcaaagacgg gcaaaactgg gatcatcgga gccatggctg agcaggttcg ataccaaggt 1020
 ggcggaagct cccacatcaa gccgacaaag ctggatagca tcagggacga gatcgaaaaa 1080
 tcggccagaa gtgcggaat ccgttattcg aaagggtatc ttctcgaaag cgacgagagc 1140
 gacgagtctt tgctgaacga ggcaagcaa gccgcagctg actctgatgt cgcggtgctg 1200
 ttcgtcgggc tgccggaccg ttacgaatcg gaaggctacg atcggacgca tctgaatttg 1260
 ccggctaacc acatcgaact gatcagcggc atcgcacccg ttacgccgaa cgtcgttgtg 1320
 atcttgagca acggttctcc cgtcgttatg ccgtggctgg gtcatgcgaa gggcgtgctc 1380
 gaagcttacc tggcggctca ggctcgggc ggagcagatc cggacctgtt gttcggcgac 1440
 gccaatccga gcggcaagct ggccgagacg ttcccgcata gcctgaagca caatccgtcc 1500
 catccttttt atcctggcga gggcgatcgg acggaatacc ggaagggcat tttgtcgg 1560
 tatcgctatt tcgacgcgaa ggatatagag ccgctgtttc cgttcggaca cggcttaagc 1620
 tatacggcgt tttcctattc cggattgaag ctggacaaaa gcgagatgac agaccgggac 1680
 atcgtgcaag tcccgctcaa cgtgaagaac acggggggac ggttcggcaa ggaaccgtt 1740
 cagctttacg tccacagtcg gaattccagc gtcatcgtc cggaaaaaga gctgaaaggc 1800
 tttgcgaagg tatcgttaaa cccggaggaa gaacagacgg ttacgttcgc gcttgataaa 1860
 cgaagctttg cctattacaa cgcggaattg aaagagtggc atgctgaaac gggcgaatat 1920
 gaaatattga tcggcagctc ttcgcgcat atcgcgcttc ggacggcatt gacggtccag 1980

tccacgaccg aaatcgtccc aacatttcat cggaatacga cactcggaga gctgatggaa 2040
aatccggcaa cgctcccgat tcttgccac ttgcagagca tggcgccgca acagcaggcg 2100
caatcggact cgggtgcccc agacatgatg atggcgatga tgcgatacat gccgctgccc 2160
gcgctgcttc cctttaccgg cggcgcgatg acggaagaga cgcttggcat gttgctggag 2220
cagtttaate aggccgttcg cggcgaaaag aatcaacctc atgcaagcga ggggaagtct 2280
gcggcttita acgaatactc gacgctgggc gacctcttgg ctcacgaagc agctgttgct 2340
gtattagaaa agcatctccc cgcatatcgc acgaatccga tgatcagcat ggggaaagga 2400
ctcactctca agcaactggc cggcattccg caagcgaata tacccgagga gttaatctct 2460
acaattgtga ccgacttgag tgtagtcaga ggataa 2496

<;210>; 2

<;211>; 831

<;212>; PRT

<;213>; Paenibacillus sp.

<;400>; 2

Val	Ala	Gln	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys	Ser	Gly							
					5					10					15						
Glu	Ser	Phe	Trp	Arg	Thr	Lys	Ala	Ile	Asp	Arg	Leu	Gly	Ile	Pro							
						20				25				30							
Ser	Ile	Met	Met	Thr	Asp	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Arg	Lys	Gln	Ala							
						35				40				45							
Gly	Glu	Ala	Asp	His	Leu	Gly	Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Pro	Ala	Thr							
						50				55				60							
Cys	Phe	Pro	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Ser	Ser	Trp	Asp	Arg	Glu							
						65				70				75							
Leu	Val	Arg	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	Ala							
						80				85				90							
Glu	Asn	Val	Ser	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Asn	Ile	Lys	Arg							
						95				100				105							
Ser	Pro	Leu	Cys	Gly	Arg	Asn	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Asp	Pro							
						110				115				120							
Tyr	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	His	Ile	Ala	Gly	Val	Gln							
						125				130				135							
Ser	Gln	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	His	Phe	Ala	Val	Asn	Asn							
						140				145				150							
Gln	Glu	His	Arg	Arg	Met	Thr	Thr	Asp	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Arg							
						155				160				165							
Thr	Leu	Arg	Glu	Ile	Tyr	Leu	Thr	Gly	Phe	Glu	Ile	Ala	Val	Lys							
						170				175				180							
Lys	Ser	Gln	Pro	Trp	Thr	Val	Met	Ser	Ala	Tyr	Asn	Arg	Met	Asn							
						185				190				195							
Gly	Thr	Tyr	Cys	Ser	Glu	Asn	Glu	Thr	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu							
						200				205				210							
Lys	Glu	Glu	Trp	Gly	His	Glu	Gly	Ile	Val	Val	Ser	Asp	Trp	Gly							
						215				220				225							
Ala	Val	Asn	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Met	Glu	Leu							
						230				235				240							
Glu	Met	Pro	Ser	Ser	His	Gly	Ile	Gly	Gln	Arg	Lys	Ile	Val	Ala							
						245				250				255							
Ala	Val	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Val	Glu	Ala	Leu	Asp	Arg	Ala							
						260				265				270							

Val Thr Arg Leu Leu Thr Val Ile Phe Lys Ala Val Asp Ser Arg			
	275	280	285
Lys Thr Asp Ala Thr Tyr Asp Lys Glu Ala His His Leu Leu Ala			
	290	295	300
Arg Glu Ile Ala Arg Glu Ser Met Val Leu Leu Lys Asn Glu Gly			
	305	310	315
Asn Leu Leu Pro Leu Ala Lys Thr Gly Lys Leu Ala Ile Ile Gly			
	320	325	330
Ala Met Ala Glu Gln Val Arg Tyr Gln Gly Gly Gly Ser Ser His			
	335	340	345
Ile Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ser Ile Arg Asp Glu Ile Glu Lys			
	350	355	360
Ser Ala Arg Ser Ala Glu Ile Arg Tyr Ser Lys Gly Tyr Leu Leu			
	365	370	375
Glu Ser Asp Glu Ser Asp Glu Ser Leu Leu Asn Glu Ala Lys Gln			
	380	385	390
Ala Ala Ala Asp Ser Asp Val Ala Val Leu Phe Val Gly Leu Pro			
	395	400	405
Asp Arg Tyr Glu Ser Glu Gly Tyr Asp Arg Thr His Leu Asn Leu			
	410	415	420
Pro Ala Asn His Ile Glu Leu Ile Glu Arg Ile Ala Ser Val Gln			
	425	430	435
Pro Asn Val Val Val Ile Leu Ser Asn Gly Ser Pro Val Val Met			
	440	445	450
Pro Trp Leu Gly His Ala Lys Ala Val Leu Glu Ala Tyr Leu Gly			
	455	460	465
Gly Gln Ala Ala Gly Gly Ala Ile Ala Asp Leu Leu Phe Gly Asp			
	470	475	480
Ala Asn Pro Ser Gly Lys Leu Ala Glu Thr Phe Pro His Ser Leu			
	485	490	495
Lys His Asn Pro Ser His Pro Phe Tyr Pro Gly Glu Gly Asp Arg			
	500	505	510
Thr Glu Tyr Arg Glu Gly Ile Phe Val Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp			
	515	520	525
Ala Lys Asp Ile Glu Pro Leu Phe Pro Phe Gly His Gly Leu Ser			
	530	535	540
Tyr Thr Ala Phe Ser Tyr Ser Gly Leu Lys Leu Asp Lys Ser Glu			
	545	550	555
Met Thr Asp Arg Asp Ile Val Gln Val Arg Val Asn Val Lys Asn			
	560	565	570
Thr Gly Gly Arg Phe Gly Lys Glu Thr Val Gln Leu Tyr Val His			
	575	580	585
Ser Arg Asn Ser Ser Val Ile Arg Pro Glu Lys Glu Leu Lys Gly			
	590	600	600
Phe Ala Lys Val Ser Leu Asn Pro Glu Glu Glu Gln Thr Val Thr			
	605	610	615
Phe Ala Leu Asp Lys Arg Ser Phe Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Leu			
	620	625	630
Lys Glu Trp His Ala Glu Thr Gly Glu Tyr Glu Ile Leu Ile Gly			
	635	640	645

Ser Ser Ser Arg Asp Ile Ala Leu Arg Thr Ala Leu Thr Val Gln
 650 655 660
 Ser Thr Thr Glu Ile Val Pro Thr Phe His Arg Asn Thr Thr Leu
 665 670 675
 Gly Glu Leu Met Glu Asn Pro Ala Thr Leu Pro Ile Leu Ala His
 680 685 690
 Leu Gln Ser Met Ala Pro Gln Gln Gln Ala Gln Ser Asp Ser Val
 695 700 705
 Ser Pro Asp Met Met Met Ala Met Met Arg Tyr Met Pro Leu Arg
 710 715 720
 Ala Leu Leu Pro Phe Thr Gly Gly Ala Met Thr Glu Glu Thr Leu
 725 730 735
 Gly Met Leu Leu Glu Gln Phe Asn Gln Ala Val Arg Gly Glu Lys
 740 745 750
 Asn Gln Pro His Ala Ser Glu Gly Ser Ser Ala Ala Phe Asn Glu
 755 760 765
 Tyr Ser Thr Leu Gly Asp Leu Leu Ala His Glu Ala Ala Val Ala
 770 775 780
 Val Leu Glu Lys His Leu Pro Gly Ile Ser Thr Asn Pro Met Ile
 785 790 795
 Ser Met Gly Lys Gly Leu Thr Leu Lys Gln Leu Ala Gly Ile Pro
 800 805 810
 Gln Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Ile Ser Thr Ile Val Thr Asp
 815 820 825
 Leu Ser Val Val Arg Gly
 830

<;210>; 3

<;211>; 4101

<;212>; DNA

<;213>; Paramecium sp.

<;400>; 3

atgaggatag gcctgaatat atcctttcag aaagcgttga gtgcggtatt ggttttaacg 60
 gtcgtgctag gactttggag cgttatcgt cctgttgta gcgctgcggc cgctaataaa 120
 ttacggtaa cctttgattc caatggatgc tcgataacgg caccagcagc ggatacggtt 180
 aacggaagc tagcttcgat tcctttctt gcaaggaag gttatacatt tgaaggatgg 240
 tatgaaagca agaactctgc cattaacgca acagccatta acagcaacac cgtgttcacc 300
 aagaacacaa cagtatatgc catttggcaa gcggactatg ccaagctggc aacaaaatat 360
 aaggatcagg aagtaacatt atcctacgct ccctcttcgg gactcaagct gatcaaggaa 420
 gacgggaccg cattaaccaa agccgaaatt tcggcctatg accaatcctt tccgatcttt 480
 aaagatctga ataaaaacgg taaattggac ccttatgaag attggcggct gccctataaa 540
 gagcgtgctc tgaatttggc gtcgctgatg gccggcgcaa gcgataacgt cgaacaaatt 600
 gcgggactga tgctgtacag cgcccattat ggcgtaacat ccgcatgcc gaccgatgcg 660
 cagaagcaat acctcgacgc cgaccatttg cgccatgttc tggtcacgac aagctcgtcg 720
 ccggaatga atgcgaaatg gaataataac gtacaagctt ttacggaaag cacctcattc 780
 ggcatctctg ccaataactc ttcgatccg cgccattcag ccaacacgac atccggagtg 840
 gaatactacg tggagaatgc gggcgtgtct gcatggccga cctcgtctgg gctagcggcg 900
 acttttaagt tcgatacgat gaagcaattt ggtaaaaatc cctcgattga atatcgctcg 960
 ctggcatat cgaccgcgct ttcacctcaa atcgatattg ctacggatcc tcgctggggc 1020
 cggtttaacg gcacattcgg agaagacccc aagctcgcac ccgctatggc aagagcttat 1080
 gtagacggtt ttcagacgac ctatgcagac gggacgagca atacgccgtt cgccggaggc 1140

tggggcatgg acagcgtcaa tgcgatgat aagcattggc cgggcggcgg cgccggagaa 1200
 ggcggacggg atgcgatta tgattacggc aagtatgccg tgtaccggg agataat 1260
 gaagcgcat taatccgtt cgtagacggc tctctgagtc tatccgacgg tacgggaatg 1320
 gcaacggcag ttatgcccta ttacaccatt tcgtatatgc aaacgcctgg aagcgaacct 1380
 aacagctcca atcttccggg ggcaaagctg aatatggcga atgcctataa tgattacatg 1440
 atcaatggcg ttctgctga cgcttatcaa ttgaaggcg tcgtaacgac ggattggaac 1500
 gtatcggtc caaagactgc acccggcggc ggttttgaca gcgacattcc gggcatgatc 1560
 tgggggccgg acgaccatta cggattaacg ggatttacga tggacgatat ggccgtaaga 1620
 gcgcgcctgc ttcttgatgc cgggtgctgat caattcgggg gacttaacac gaatgcgcca 1680
 atcgtaacgg cttacaacaa cgcaacgggc gaagataagg agaggctgct ggcacagctt 1740
 caagtagcg cctatcggct tctgatgaac gtcttcagaa cggggttatt cgaagatccg 1800
 tatctggacc cggctgagag caaagccacg gtcggccaag aagcgttcat ggctgccggc 1860
 tacaaagcgc agttggaatc gatggtattg ctaaaggata aaaacagcat ctgacctgta 1920
 tcgaccaata aaaaggtata tgcgcccgga gcggtgcca ataccgttac ttgctgaag 1980
 gcatacttcg gcagtgaaaa cgtaattacg gaagcagcca acgcaaatgc ggccgattat 2040
 gcgattgtgt tcatgaactc cgtctctgca ggcggcgggt caaggaatgc ttcgagcat 2100
 atcaacagct atacgccgat taatctggac tttaaagctt ataccgcgac aaacgcgcgc 2160
 gaaacgagca ttgccggtta cccgctaaga gaaattccgg atgatttcac ctctgcggtt 2220
 ataggaatgg agaactgttc ctacaggggc ctactacca atattccgc tgctgccgca 2280
 acgatcaaca gcaacatagc cgccccaag gccagcggaa aaccggtcat tcttccgtt 2340
 aatatgtcca accctatggt catgggagag gttgagcctc atgcggatgt aatgctcgtc 2400
 aacttcggag ctcaaaaatc cgccatactg gatatgctta cgggctctac tcgctacggc 2460
 aagcaaggcg gtccatcctc ggctgtctat cctaccggca tgctgccaat gcaattgcct 2520
 aaagatatgg atgaagtcca gctgcaatat gaagatgtcc ctccgcatat ggtcagctac 2580
 acggacagcc agggaaatgt ttacgacttt ggctttggac tgacctggaa ggacggattg 2640
 aagaggattg atgcatcggt aaatcccgtt tatactcctt tcgttgccgg aaatacggtg 2700
 ccgatgactc atcccgttaa tatggcacc aatgaaaaca gcccttatct gattgccaat 2760
 cgggcaaaag tgaatttga ttccggctat aaggatcgg cagccgataa ggaaaatgca 2820
 aaaatcacca aaatagtaaa taaaggttca accgtaactc ctgccgaacc gccatcccgc 2880
 gccggacaag cattcgcggg ctggtataac ggaaccgaca aatttgattt ctccaaccg 2940
 attactgaag atatcgttct tacagcaaaa tggggtgaag aaggagcggc tccgacgatc 3000
 acggctccag cctccgtcgt ggtcgacagc gacttcgatc ttcacattgg cattaaggc 3060
 atcgaggaag ggtttgactc cctggcggta gtcgtgaatt atgatccgga gcaggtcgag 3120
 ttgacactg taagcgatgc ggaaggcgca ctgagcttga gtgagcaagc ggtcgtctcg 3180
 ctgcttccg atcttcacgt tctcgaaca ggcgtcaagc ccgacgcggg acaaatctg 3240
 attatcctgt caacgacagg tcaactggtc gagctggacg gcgatctgct ggttctccat 3300
 ggcaaggcca gagctggcgc tgcagcaggc acgactatta tagctttaag cgattttgaa 3360
 gtatcggcta acggctcctc ccaatcgctg aatcggatg gtagtctggt cgccattca 3420
 attcgtttgg ctgatcatgc ggcgtggca tcggcgatca gcgaagccga gcagctgctt 3480
 gccaggctg tgcagggctc gcagccgggt cagtaccggg ctggcaccaa agcggcgtg 3540
 cggcttgccg ttaatcaggc gattcggtc agggataacg ctccggcgat aatgaacag 3600
 attgctcaag cggcgggtgc gctcaacaat gccattaaac tattcaagag ctgtgtgaa 3660
 ccggatcctt ctccctcggc agacaagatt gcgttgaatg cggcgatcgc ggccgcgag 3720
 acgaagctgg gtcaggcgaa ggaaggcacg aaggtaggtc aatatccgc atcgccatc 3780
 gctgcgctga aagcggctgt tcaaacggct aacgcagtga agaattgatc gacggcatcg 3840
 caatatccg ttgatcaagc gacggcaaaa ttaaaccagg cggttgccga attcaccgcg 3900
 aagatgatta cgctgttcc cggtaaacg ggagtgcgc tgagcgactt gtctatttg 3960
 gcgaagtact acggcgtaaa atcgaccgat ccggaatgga gcaatgtcga gaaggcagac 4020
 ctcttcgaca gcggtgaaat tacgattcgc gagctggcgg caattgcaag aatgatgtc 4080
 gacaactggc tggatcaata a 4101

<;210>; 4
 <;211>; 1366
 <;212>; PRT
 <;213>; Paramecium sp.
 <;400>; 4

Met Arg Ile Gly Leu Asn Ile Ser Phe Gln Lys Ala Leu Ser Ala
 5 10 15
 Val Leu Val Leu Thr Val Val Leu Gly Leu Trp Ser Gly Tyr Arg
 20 25 30
 Pro Val Val Ser Ala Ala Ala Ala Asn Glu Phe Thr Val Thr Phe
 35 40 45
 Asp Ser Asn Gly Cys Ser Ile Thr Ala Pro Ala Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Asn Gly Lys Leu Ala Ser Ile Pro Leu Leu Ala Arg Glu Gly Tyr
 65 70 75
 Thr Phe Glu Gly Trp Tyr Glu Ser Lys Asn Pro Ala Ile Thr Ala
 80 85 90
 Thr Ala Ile Asn Ser Asn Thr Val Phe Thr Lys Asn Thr Thr Val
 95 100 105
 Tyr Ala Ile Trp Gln Ala Asp Tyr Ala Lys Leu Ala Thr Lys Tyr
 110 115 120
 Lys Asp Gln Glu Val Thr Leu Ser Tyr Ala Pro Ser Ser Gly Val
 125 130 135
 Lys Leu Ile Lys Glu Asp Gly Thr Ala Leu Thr Lys Ala Glu Ile
 140 145 150
 Ser Ala Tyr Asp Gln Ser Phe Pro Ile Phe Lys Asp Leu Asn Lys
 155 160 165
 Asn Gly Lys Leu Asp Pro Tyr Glu Asp Trp Arg Leu Pro Tyr Lys
 170 175 180
 Glu Arg Ala Leu Asn Leu Ala Ser Leu Met Ala Gly Ala Ser Asp
 185 190 195
 Asn Val Glu Gln Ile Ala Gly Leu Met Leu Tyr Ser Ala His Tyr
 200 205 210
 Gly Val Thr Ser Ala Met Pro Thr Asp Ala Gln Lys Gln Tyr Leu
 215 220 225
 Asp Ala Asp His Leu Arg His Val Leu Val Thr Thr Ser Ser Ser
 230 235 240
 Pro Glu Met Asn Ala Lys Trp Asn Asn Asn Val Gln Ala Phe Thr
 245 250 255
 Glu Ser Thr Ser Phe Gly Ile Pro Ala Asn Asn Ser Ser Asp Pro
 260 265 270
 Arg His Ser Ala Asn Thr Thr Ser Gly Val Glu Tyr Tyr Val Glu
 275 280 285
 Asn Ala Gly Val Ser Ala Trp Pro Thr Ser Leu Gly Leu Ala Ala
 290 295 300
 Thr Phe Asn Val Asp Thr Met Lys Gln Phe Gly Lys Ile Ala Ser
 305 310 315
 Ile Glu Tyr Arg Ser Leu Gly Ile Ser Thr Ala Leu Ser Pro Gln
 320 325 330
 Ile Asp Ile Ala Thr Asp Pro Arg Trp Gly Arg Phe Asn Gly Thr

	335	340	345
Phe Gly Glu Asp	Pro Lys Leu Ala	Ser Ala Met Ala	Arg Ala Tyr
	350	355	360
Val Asp Gly Phe	Gln Thr Thr Tyr	Ala Asp Gly Thr	Ser Asn Thr
	365	370	375
Pro Val Ala Gly	Gly Trp Gly Met	Asp Ser Val Asn	Ala Met Met
	380	385	390
Lys His Trp Pro	Gly Gly Gly Ala	Gly Glu Gly Gly	Arg Asp Ala
	395	400	405
His Tyr Asp Tyr	Gly Lys Tyr Ala	Val Tyr Pro Gly	Asp Asn Phe
	410	415	420
Glu Ala His Leu	Ile Pro Phe Val	Asp Gly Ser Leu	Ser Leu Ser
	425	430	435
Asp Gly Thr Gly	Met Ala Thr Ala	Val Met Pro Tyr	Tyr Thr Ile
	440	445	450
Ser Tyr Met Gln	Thr Pro Gly Ser	Glu Pro Asn Ser	Ser Asn Leu
	455	460	465
Pro Gly Ala Lys	Leu Asn Met Ala	Asn Ala Tyr Asn	Asp Tyr Met
	470	475	480
Ile Asn Gly Val	Leu Arg Asp Ala	Tyr Gln Phe Glu	Gly Val Val
	485	490	495
Thr Thr Asp Trp	Asn Val Ile Gly	Pro Lys Thr Ala	Pro Gly Gly
	500	505	510
Gly Phe Asp Ser	Asp Ile Pro Gly	Met Ile Trp Gly	Pro Asp Asp
	515	520	525
His Tyr Gly Leu	Thr Gly Phe Thr	Met Asp Asp Met	Ala Val Arg
	530	535	540
Ala Arg Leu Leu	Leu Asp Ala Gly	Val Asp Gln Phe	Gly Gly Leu
	545	550	555
Asn Thr Asn Ala	Pro Ile Val Thr	Ala Tyr Asn Asn	Ala Thr Gly
	560	565	570
Glu Asp Lys Glu	Arg Leu Leu Ala	Gln Leu Gln Val	Ser Ala Tyr
	575	580	585
Arg Leu Leu Met	Asn Val Phe Arg	Thr Gly Leu Phe	Glu Asp Pro
	590	595	600
Tyr Leu Asp Pro	Ala Glu Ser Lys	Ala Thr Val Gly	Gln Glu Ala
	605	610	615
Phe Met Ala Ala	Gly Tyr Lys Ala	Gln Leu Glu Ser	Met Val Leu
	620	625	630
Leu Lys Asp Lys	Asn Ser Ile Leu	Pro Val Ser Thr	Asn Lys Lys
	635	640	645
Val Tyr Ala Pro	Gly Ala Asp Ala	Asn Thr Val Thr	Leu Leu Lys
	650	655	660
Ala Tyr Phe Gly	Ser Glu Asn Val	Ile Thr Glu Ala	Ala Asn Ala
	665	670	675
Asn Ala Ala Asp	Tyr Ala Ile Val	Phe Met Asn Ser	Val Ser Ala
	680	685	690
Gly Gly Gly Ser	Arg Asn Ala Ser	Gln His Ile Asn	Ser Tyr Thr
	695	700	705
Pro Ile Asn Leu	Asp Phe Lys Ala	Tyr Thr Ala Thr	Asn Ala Arg

	710	715	720
Glu Thr Ser Ile	Ala Gly Tyr Pro	Leu Arg Glu Ile	Pro Asp Asp
	725	730	735
Phe Thr Ser Ala	Val Ile Gly Met	Glu Asn Arg Ser	Tyr Arg Gly
	740	745	750
Leu Thr Thr Asn	Ile Ser Ala Ala	Ala Ala Thr Ile	Asn Ser Asn
	755	760	765
Ile Ala Ala Ala	Lys Ala Ser Gly	Lys Pro Val Ile	Leu Ser Val
	770	775	780
Asn Met Ser Asn	Pro Met Val Met	Gly Glu Val Glu	Pro His Ala
	785	790	795
Asp Val Met Leu	Val Asn Phe Gly	Ala Gln Lys Ser	Ala Ile Leu
	800	805	810
Asp Met Leu Thr	Gly Ser Thr Arg	Tyr Gly Lys Gln	Gly Gly Pro
	815	820	825
Ser Ser Ala Val	Tyr Pro Thr Gly	Met Leu Pro Met	Gln Leu Pro
	830	835	840
Lys Asp Met Asp	Glu Val Glu Leu	Gln Tyr Glu Asp	Val Pro Arg
	845	850	855
Asp Met Val Ser	Tyr Thr Asp Ser	Gln Gly Asn Val	Tyr Asp Phe
	860	865	870
Gly Phe Gly Leu	Thr Trp Lys Asp	Gly Leu Lys Arg	Ile Asp Ala
	875	880	885
Ser Val Asn Pro	Gly Tyr Thr Pro	Phe Val Ala Gly	Asn Thr Val
	890	895	900
Pro Met Thr His	Pro Val Asn Met	Gly Thr Asn Glu	Asn Ser Pro
	905	910	915
Tyr Leu Ile Ala	Asn Arg Ala Lys	Val Lys Phe Asp	Phe Gly Tyr
	920	925	930
Lys Glu Ser Ala	Ala Asp Lys Glu	Asn Ala Lys Ile	Thr Lys Ile
	935	940	945
Val Asn Lys Gly	Ser Thr Val Thr	Pro Ala Glu Pro	Pro Ser Arg
	950	955	960
Ala Gly Gln Ala	Phe Ala Gly Trp	Tyr Asn Gly Thr	Asp Lys Phe
	965	970	975
Asp Phe Ser Asn	Pro Ile Thr Glu	Asp Ile Val Leu	Thr Ala Lys
	980	985	990
Trp Gly Glu Glu	Gly Ala Ala Pro	Thr Ile Thr Ala	Pro Ala Ser
	995	1000	1005
Val Val Val Gly	Gln Asp Phe Asp	Leu His Ile Gly	Ile Lys Gly
	1010	1015	1020
Ile Glu Glu Gly	Phe Asp Ser Leu	Ala Val Val Val	Asn Tyr Asp
	1025	1030	1035
Pro Glu Gln Val	Glu Phe Asp Thr	Val Ser Asp Ala	Glu Gly Ala
	1040	1045	1050
Leu Ser Leu Ser	Glu Gln Ala Val	Ala Ser Leu Arg	Ser Asp Leu
	1055	1060	1065
His Val Leu Gly	Thr Gly Val Lys	Pro Asp Ala Gly	Gln Ile Leu
	1070	1075	1080
Ile Ile Leu Ser	Thr Thr Gly Gln	Leu Val Glu Leu	Asp Gly Asp

	1085	1090	1095
Leu Leu Val	Leu His Gly Lys Ala Arg	Ala Gly Ala Ala Ala	Gly
	1100	1105	1110
Thr Thr Ile Ile	Ala Leu Ser Asp Phe	Glu Val Ser Ala Asn	Gly
	1115	1120	1125
Ser Ser Gln Ser	Leu Asn Thr Asp Gly	Ser Ser Val Ala Ile	Gln
	1130	1135	1140
Ile Arg Leu Ala	Asp His Ala Ala Leu	Ala Ser Ala Ile Ser	Glu
	1145	1150	1155
Ala Glu Gln Leu	Leu Ala Gln Ala Val	Glu Gly Ser Gln Pro	Gly
	1160	1165	1170
Gln Tyr Pro Ala	Gly Thr Lys Ala Ala	Leu Arg Leu Ala Val	Asn
	1175	1180	1185
Gln Ala Ile Ala	Val Arg Asp Asn Ala	Ser Ala Ile Asn Glu	Gln
	1190	1195	1200
Ile Ala Gln Ala	Ala Val Ser Leu Asn	Asn Ala Ile Lys Leu	Phe
	1205	1210	1215
Lys Ser Leu Val	Asn Pro Asp Pro Ser	Pro Ser Ala Asp Lys	Ile
	1220	1225	1230
Ala Leu Asn Ala	Ala Ile Ala Ala Ala	Gln Thr Lys Leu Gly	Gln
	1235	1240	1245
Ala Lys Glu Gly	Thr Lys Val Gly Gln	Tyr Ser Ala Ser Ala	Ile
	1250	1255	1260
Ala Ala Leu Lys	Ala Ala Val Gln Thr	Ala Asn Ala Val Lys	Asn
	1265	1270	1275
Asp Ser Thr Ala	Ser Gln Tyr Ser Val	Asp Gln Ala Thr Ala	Lys
	1280	1285	1290
Leu Asn Glu Ala	Val Ala Glu Phe Thr	Ala Lys Met Ile Thr	Leu
	1295	1300	1305
Val Pro Gly Gln	Thr Gly Val Thr Leu	Ser Asp Leu Ser Tyr	Leu
	1310	1315	1320
Ala Lys Tyr Tyr	Gly Val Lys Ser Thr	Asp Pro Glu Trp Ser	Asn
	1325	1330	1335
Val Glu Lys Ala	Asp Leu Phe Asp Ser	Gly Glu Ile Thr Ile	Arg
	1340	1345	1350
Glu Leu Ala Ala	Ile Ala Arg Met Ile	Val Asp Asn Trp Leu	Asp
	1355	1360	1365

Gln

1366

<;210>; 5

<;211>; 1716

<;212>; DNA

<;213>; Paenibacillus sp.

<;400>; 5

```

gtggtaatt tacgagcgaa accatztat ctggatgatg atgccgtgat ttgggtgcaa 60
agcacattag aaaaaatgga tatacagacc aaggttggcc aattgttttg tgaattgtg 120
tgggacaagc cgggcatgga catagacagt ctgtttactg atatcgaacc gggcggaatt 180
atgtttcgtc ctgatacagg ggccaacatt caaaaatcgg ccaggatgtg gcagcagaag 240
gctcaaattc cgctgttaat tgccggtaat ctcgaacgtg gcggcagcgg tggaaacggt 300
gggttaagg acgggaccta ctttggttcg cccatgcaag ttgctgtac cgatgatgaa 360

```

gagaacggtt ataggcttgg gttaattgca tgcaggaag gggcggtgc aggggtaaac 420
 tggacattcg aacctatcat cgatattgac tataattttc ataatccaat tacgaatgtt 480
 cggacgttcg gcagtgattt aaatcgtata ctccggatgg ccaaaggtta catgcgaggg 540
 gcttatgagt gcggagtggc cgtatcgatc aagcattggc cgggagacgg agttgatttt 600
 cgcgatcagc atttgctggc cagtgttaac agtatgtcgg tagaagaatg gaatgcatca 660
 tttggttggc tatataaaga aatgatcgat gccggcgcca atacgttgat ggcctcccat 720
 attaaattgc cggcgctactc tccgaaattg cgcccgggaa ttaaggatga agagatcatg 780
 cctgcctcat tggctcccga attgcatcat caattattgc gtgagcagtt aggatttaac 840
 ggcctcatcg tcagcgtatg taccagatg gctggattta cggtatcgat ggaacgcgaa 900
 aaagcgggtc ctgccgcat agcccgggga tgcgacatgt tttgtttac aattaatcac 960
 agggaagacg ttcaatacat gttaaggggt gtcgagcaag gtatcattag ccaggaaga 1020
 ttaaatgaag cggttaccg tattctggcg cttaaagcat ctctgggct gcatagaaag 1080
 cagcacgaac ataacctgt tccctggact gatgctttgc aactgctgct gtgcgacca 1140
 catgtgagtt gggccaaaga atgctcagac caagctatca cgctgattaa ggatagagag 1200
 caactattgc ctctttcgac cgaaaggcac aagcgattc tattgcaaac gattacgaat 1260
 gagcctacag atgaacaagg ttttactgcc gaatcattgc agttcaagcg cttgcttga 1320
 caatcaggat ttgagattac tgacttcaga tctgaagaga tgcctggggg ttacagggg 1380
 aaaatatcaa tcagtgaatt gaagcaaca acggatctta ttgtatatta tgtaaatatg 1420
 agagtggcca gcaatcagaa tagtgtacga ttgtcttggg cggacttttt gggcgaagac 1500
 tcgcctaagt atgcgaaaga tatccccgct gtctttattt ccgcatccaa tccttatcat 1560
 ctgatagatg taccgatggt atcgacttat attaacgcat acagttcaaa tcaatatggt 1620
 gtagaagctc tgggtgataa attgcttggg aagtcggagt ttaaaggaat tagtcctgct 1680
 gatccatttt gcggattgtg ggatgccggg ctctga 1716

<;210>; 6

<;211>; 571

<;212>; PRT

<;213>; *Paenibacillus* sp.

<;400>; 6

Val	Val	Asn	Leu	Arg	Ala	Lys	Pro	Phe	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asp	Ala
			5						10					15
Val	Ile	Trp	Val	Gln	Ser	Thr	Leu	Glu	Lys	Met	Asp	Ile	Arg	Ala
			20						25					30
Lys	Val	Gly	Gln	Leu	Phe	Cys	Glu	Ile	Val	Trp	Asp	Lys	Pro	Gly
			35						40					45
Met	Asp	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe	Thr	Asp	Ile	Glu	Pro	Gly	Gly	Ile
			50						55					60
Met	Phe	Arg	Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Asn	Ile	Gln	Lys	Ser	Ala	Arg
			65						70					75
Tyr	Val	Gln	Gln	Lys	Ala	Gln	Ile	Pro	Leu	Leu	Ile	Ala	Gly	Asn
			80						85					90
Leu	Glu	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Phe	Lys	Asp	Gly
			95						100					105
Thr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Pro	Met	Gln	Val	Ala	Ala	Thr	Asp	Asp	Glu
			110						115					120
Glu	Asn	Gly	Tyr	Arg	Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Cys	Arg	Glu	Gly	Ala
			125						130					135
Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Trp	Thr	Phe	Glu	Pro	Ile	Ile	Asp	Ile	Asp
			140						145					150
Tyr	Asn	Phe	His	Asn	Pro	Ile	Thr	Asn	Val	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser
			155						160					165

Asp Leu Asn Arg Ile Leu Arg Met Ala Lys Gly Tyr Met Arg Gly			
	170	175	180
Ala Tyr Glu Cys Gly Val Ala Val Ser Ile Lys His Trp Pro Gly			
	185	190	195
Asp Gly Val Asp Phe Arg Asp Gln His Leu Leu Ala Ser Val Asn			
	200	205	210
Ser Met Ser Val Glu Glu Trp Asn Ala Ser Phe Gly Trp Leu Tyr			
	215	220	225
Lys Glu Met Ile Asp Ala Gly Ala Asn Thr Leu Met Ala Ser His			
	230	235	240
Ile Lys Leu Pro Ala Tyr Ser Arg Lys Leu Arg Pro Gly Ile Lys			
	245	250	255
Asp Glu Glu Ile Met Pro Ala Ser Leu Ala Pro Glu Leu His His			
	260	265	270
Gln Leu Leu Arg Glu Gln Leu Gly Phe Asn Gly Leu Ile Val Ser			
	275	280	285
Asp Ala Thr Gln Met Ala Gly Phe Thr Val Ser Met Glu Arg Glu			
	290	295	300
Lys Ala Val Pro Ala Ala Ile Ala Ala Gly Cys Asp Met Phe Leu			
	305	310	315
Phe Thr Ile Asn His Arg Glu Asp Val Gln Tyr Met Leu Arg Gly			
	320	325	330
Val Glu Gln Gly Ile Ile Ser Gln Glu Arg Leu Asn Glu Ala Val			
	335	340	345
Thr Arg Ile Leu Ala Leu Lys Ala Ser Leu Gly Leu His Arg Lys			
	350	355	360
Gln His Glu His Asn Leu Val Pro Gly Thr Asp Ala Leu Gln Leu			
	365	370	375
Leu Leu Cys Asp Gln His Val Ser Trp Ala Lys Glu Cys Ala Asp			
	380	385	390
Gln Ala Ile Thr Leu Ile Lys Asp Arg Glu Gln Leu Leu Pro Leu			
	395	400	405
Ser Thr Glu Arg His Lys Arg Ile Leu Leu Gln Thr Ile Thr Asn			
	410	415	420
Glu Pro Thr Asp Glu Gln Gly Phe Thr Ala Glu Ser Leu Gln Phe			
	425	430	435
Lys Arg Leu Leu Glu Gln Ser Gly Phe Glu Ile Thr Asp Phe Arg			
	440	445	450
Ser Glu Glu Met Pro Gly Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ser Ile Ser			
	455	460	465
Glu Leu Lys Gln Gln Thr Asp Leu Ile Val Tyr Tyr Val Asn Met			
	470	475	480
Arg Val Ala Ser Asn Gln Asn Ser Val Arg Leu Ser Trp Ala Asp			
	485	490	495
Phe Leu Gly Glu Asp Ser Pro Lys Tyr Ala Lys Asp Ile Pro Val			
	500	505	510
Val Phe Ile Ser Ala Ser Asn Pro Tyr His Leu Ile Asp Val Pro			
	515	520	525
Met Val Ser Thr Tyr Ile Asn Ala Tyr Ser Ser Asn Gln Tyr Val			
	530	535	540

Val Glu Ala Leu Val Asp Lys Leu Leu Gly Lys Ser Glu Phe Lys
 545 550 555
 Gly Ile Ser Pro Val Asp Pro Phe Cys Gly Leu Trp Asp Ala Gly
 560 565 570

Leu

571

<;210>; 7

<;211>; 2937

<;212>; DNA

<;213>; Paenibacillus sp.

<;400>; 7

atgatgagct ttattcctga aagtgccagc gcctcaacaa gtcagccttc aatfttgcca 60
 aagcctgtaa gctatacagt gggatccggg caatttgttt taacaaagaa cgcttccatc 120
 ttgtagccg gcaataacgt aggagaaacg gatgagctgt tcaacattgg acaagccctc 180
 gccaaaaaac tgaatgcatc gaccgggtat accatcagtg tcgtcaaatc aaaccagccg 240
 acggctgtaa gtatttattt gactacagtt ggcgaaatg ccgcccctggg caatgaaggg 300
 tatgatttaa tcacgacttc caatcaggtt acgcttactg caataaacc ggaaggagtc 360
 tttagaggca atcaaacctt attgcagctc ttgccggcgg gtattgaaaa gaacaccgtt 420
 gtttccggcg tgcaatgggt aatccccat tccaatatta gcgacaagcc cgaatatgaa 480
 tatcgcggac ttatgcttga tgtggctcga cacttcttta ccgtggatga agttaaactg 540
 cagattgata tggcctcgcg gtataagatc acaaaatttc atatgattt gctgacgat 600
 cagggtggc gtattgaaat taaatcatgg cctgatctca tagagatcgg aagcaaggga 660
 caggtaggcg gcggtcccgg cggatattat acgcaggagc agttcaaaga tattgtcagc 720
 tatgcggctg aacgatacat tgaagtattt ccggaatcg atatgcccgg tcatacgaat 780
 gccgctttag ctcttatgg tgaacttaat cctgatggaa aaagaaaagc tatgcccacc 840
 gatacggctg taggtacag cacgctcatg cctcgcgccg agattacgta tcaatttgtt 900
 gaagatgtca tcagcgagct tggcgaata tcgccttcgc cttatattca tctgggtggc 960
 gatgaatcta acgcaacgtc ggctgccgac tatgattatt tttttggcag agttacggct 1020
 attgctaaca gttacggcaa gaaagtcgtt ggctgggacc cgtccgatac gtcaagcggg 1080
 gcaactagcg attctgttct gcagaactgg acttgacgag cctcaaccgg aactgcggca 1140
 aaagcaaaag ggatgaagg catcgtatct cctgcaaatg cttatcttga catgaaatac 1200
 tacagtgatt cgccaattgg ttacaatgg agaggatttg tcaatacaaa cagagcttat 1260
 aattgggata cgaccgattg catcaaggga gcgaatattt acggagttga aagtacatta 1320
 tggacagaaa cctttgtaac acaagatcat ttggattata tgctctatcc gaaattatta 1380
 tcaaatgctg aagtgcgctg gactgcccgg ggagatcgaa actgggatga ttttaagaa 1440
 aggctgatcg aacatacacc aagattgcaa aataaaggaa ttaaattttt tgccgaccct 1500
 attgtgtggg agcttccgat tgtccagatt aattcagaat ggaagatgga tgaaggaacc 1560
 ggcaccgctg tgaaggacac ttccggttat ttaaaccgaa ctttagttgg cggcgcaaag 1620
 tggacagcgg gcaacaagg aaatggggtg agctttgatg gaagctcggg ctacataaat 1680
 ttagcgggtc aggatataac agggaaactg accgcagcag tatgggttta cggccagcca 1740
 aatacaacga ataataaac gctgctgagc ggcacaactt cagcaatcaa gatcaaccag 1800
 tataataaaa caggtaaaat cgggattacc atttacggta cgaaagacta tacgtacaat 1860
 tatagcattc catccaataa atggactcat ctgacgttcg taggcacaag cacggggact 1920
 gcgctttatg aaaacggcgt gctgaaagaa acaatcgccg caaaaatgaa tggccaatg 1980
 gctttgggtg gagcgaaaa aacgggagga tccggagatt taacctctta tttcagagga 2040
 agtctggatg aattgaaaat attcaacaga gcgctaagcg caagcgaggt tgttgaattg 2100
 gcaaaatcgc cggcgccgaa ggcgtcgtc acaggtcctc aatcgggcga tcccgtcaa 2160
 tccttcgatg taaaaatggg gttgagcgac gtttcccaa gcgaattcgg acaaatgtat 2220
 gctcaagact ggacgattaa ctatgattcg gcgaagtgc agttagattc gattacatcg 2280
 ctgcaagata agtttcaagt gatcgaccaa aaggagtgg cgccgggaca aatccggatt 2340

gtggctgcca atgcagctgc gaaccaagga gtgactccgc aaggcgattt gttcgcattc 2400
 aaatttacag ttaaagcggg aaccgatgtc aagacgacaa tttcggcaga ccatattggt 2460
 attgccaacg cacaggggaa agaattggag atcgcggggg ccactcacga gatccaggtc 2520
 agcatcccag tagacaaatc gcaattgaat gtactgattg cgaacgctca agccaagcat 2580
 gatgcggcgg tgaagggaaa tgaagacggg ttgtacgccg caggttccaa agcgcaattg 2640
 caaacggcta ttcatcacgc caaagcggta gcagacaatt cgaatgcatc tcaacaacag 2700
 gtggatagtg cgaatccgc attggaagag gccgttcaag tatttgaag caagaaaata 2760
 tctgcagacg taaacggaga tggcaggtc tctattggag atttggaat cattgcgggt 2820
 gcttacggca aagaggaagg tcaggctggc tgaataaaa aagcggatgt gaatcacgac 2880
 ggcaaggttg acattataga ccttacaatc gtagccaaag cgatcttgca gatataa 2937

<;210>; 8

<;211>; 978

<;212>; PRT

<;213>; *Paenibacillus* sp.

<;400>; 8

Met	Met	Ser	Phe	Ile	Pro	Glu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Ser	Gln
				5					10					15
Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Ser	Gly
				20					25					30
Gln	Phe	Val	Leu	Thr	Lys	Asn	Ala	Ser	Ile	Phe	Val	Ala	Gly	Asn
				35					40					45
Asn	Val	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	Leu	Phe	Asn	Ile	Gly	Gln	Ala	Leu
				50					55					60
Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Ala	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Ile	Ser	Val	Val
				65					70					75
Lys	Ser	Asn	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Ser	Ile	Tyr	Leu	Thr	Thr	Val
				80					85					90
Gly	Gly	Asn	Ala	Ala	Leu	Gly	Asn	Glu	Gly	Tyr	Asp	Leu	Ile	Thr
				95					100					105
Thr	Ser	Asn	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asn	Lys	Pro	Glu	Gly	Val
				110					115					120
Phe	Arg	Gly	Asn	Gln	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Ala	Gly	Ile
				125					130					135
Glu	Lys	Asn	Thr	Val	Val	Ser	Gly	Val	Gln	Trp	Val	Ile	Pro	His
				140					145					150
Ser	Asn	Ile	Ser	Asp	Lys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met
				155					160					165
Leu	Asp	Val	Ala	Arg	His	Phe	Phe	Thr	Val	Asp	Glu	Val	Lys	Arg
				170					175					180
Gln	Ile	Asp	Leu	Ala	Ser	Gln	Tyr	Lys	Ile	Asn	Lys	Phe	His	Met
				185					190					195
His	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Gly	Trp	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Ser	Trp
				200					205					210
Pro	Asp	Leu	Ile	Glu	Ile	Gly	Ser	Lys	Gly	Gln	Val	Gly	Gly	Gly
				215					220					225
Pro	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Gln	Glu	Gln	Phe	Lys	Asp	Ile	Val	Ser
				230					235					240
Tyr	Ala	Ala	Glu	Arg	Tyr	Ile	Glu	Val	Ile	Pro	Glu	Ile	Asp	Met
				240					245					255
Pro	Gly	His	Thr	Asn	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asn

	260	265	270
Pro Asp Gly Lys Arg Lys Ala Met Arg Thr Asp Thr Ala Val Gly			
	275	280	285
Tyr Ser Thr Leu Met Pro Arg Ala Glu Ile Thr Tyr Gln Phe Val			
	290	295	300
Glu Asp Val Ile Ser Glu Leu Ala Ala Ile Ser Pro Ser Pro Tyr			
	305	310	315
Ile His Leu Gly Gly Asp Glu Ser Asn Ala Thr Ser Ala Ala Asp			
	320	325	330
Tyr Asp Tyr Phe Phe Gly Arg Val Thr Ala Ile Ala Asn Ser Tyr			
	335	340	345
Gly Lys Lys Val Val Gly Trp Asp Pro Ser Asp Thr Ser Ser Gly			
	350	355	360
Ala Thr Ser Asp Ser Val Leu Gln Asn Trp Thr Cys Ser Ala Ser			
	365	370	375
Thr Gly Thr Ala Ala Lys Ala Lys Gly Met Lys Val Ile Val Ser			
	380	385	390
Pro Ala Asn Ala Tyr Leu Asp Met Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Pro			
	395	400	405
Ile Gly Leu Gln Trp Arg Gly Phe Val Asn Thr Asn Arg Ala Tyr			
	410	415	420
Asn Trp Asp Pro Thr Asp Cys Ile Lys Gly Ala Asn Ile Tyr Gly			
	425	430	435
Val Glu Ser Thr Leu Trp Thr Glu Thr Phe Val Thr Gln Asp His			
	440	445	450
Leu Asp Tyr Met Leu Tyr Pro Lys Leu Leu Ser Asn Ala Glu Val			
	455	460	465
Gly Trp Thr Ala Arg Gly Asp Arg Asn Trp Asp Asp Phe Lys Glu			
	470	475	480
Arg Leu Ile Glu His Thr Pro Arg Leu Gln Asn Lys Gly Ile Lys			
	485	490	495
Phe Phe Ala Asp Pro Ile Val Trp Glu Leu Pro Ile Val Gln Ile			
	500	505	510
Asn Ser Glu Trp Lys Met Asp Glu Gly Thr Gly Thr Val Val Lys			
	525	520	525
Asp Thr Ser Gly Tyr Leu Asn Gly Thr Leu Val Gly Gly Ala Lys			
	530	535	540
Trp Thr Ala Gly Lys Gln Gly Asn Gly Val Ser Phe Asp Gly Ser			
	545	550	555
Ser Gly Tyr Ile Asn Leu Gly Gly Gln Asp Ile Thr Gly Asn Trp			
	560	565	570
Thr Ala Ala Val Trp Val Tyr Gly Gln Pro Asn Thr Thr Asn Asn			
	575	580	585
Glu Thr Leu Leu Ser Gly Thr Thr Ser Ala Ile Lys Ile Asn Gln			
	590	595	600
Tyr Asn Lys Thr Gly Lys Val Gly Ile Thr Ile Tyr Gly Thr Lys			
	605	610	615
Asp Tyr Thr Tyr Asn Tyr Ser Ile Pro Ser Asn Lys Trp Thr His			
	620	625	630
Leu Thr Phe Val Gly Thr Ser Thr Gly Thr Ala Leu Tyr Glu Asn			

	635	640	645
Gly Val Leu Lys	Glu Thr Ile Ala Ala Lys Met Asn Gly Pro Met		
	650	655	660
Ala Leu Val Gly	Ala Glu Lys Thr Gly Gly Ser Gly Asp Leu Thr		
	665	670	675
Ser Tyr Phe Arg	Gly Ser Leu Asp Glu Leu Lys Ile Phe Asn Arg		
	680	685	690
Ala Leu Ser Ala	Ser Glu Val Val Glu Leu Ala Lys Ser Pro Ala		
	695	700	705
Pro Lys Ala Ser	Leu Thr Gly Pro Gln Ser Ala Asn Pro Gly Gln		
	710	715	720
Ser Phe Asp Val	Lys Met Gly Leu Ser Asp Val Ser Pro Ser Glu		
	725	730	735
Phe Gly Gln Met	Tyr Ala Gln Asp Trp Thr Ile Asn Tyr Asp Ser		
	740	745	750
Ala Lys Leu Gln	Leu Asp Ser Ile Thr Ser Leu Gln Asp Lys Phe		
	755	760	765
Gln Val Ile Asp	Gln Lys Glu Leu Ala Pro Gly Gln Ile Arg Ile		
	770	775	780
Val Ala Ala Asn	Ala Ala Ala Asn Gln Gly Val Thr Pro Gln Gly		
	785	790	795
Asp Leu Phe Ala	Phe Lys Phe Thr Val Lys Ala Gly Thr Asp Val		
	800	805	810
Lys Thr Thr Ile	Ser Ala Asp His Ile Val Ile Gly Asn Ala Gln		
	815	820	825
Gly Lys Glu Leu	Glu Ile Ala Gly Ala Thr His Glu Ile Gln Val		
	830	835	840
Ser Ile Pro Val	Asp Lys Ser Gln Leu Asn Val Leu Ile Ala Asn		
	845	850	855
Ala Gln Ala Lys	His Asp Ala Ala Val Glu Gly Asn Glu Asp Gly		
	860	865	870
Leu Tyr Ala Ala	Gly Ser Lys Ala Gln Leu Gln Thr Ala Ile His		
	875	880	885
Thr Ala Lys Ala	Val Ala Asp Asn Ser Asn Ala Ser Gln Gln Gln		
	890	895	900
Val Asp Ser Ala	Lys Ser Ala Leu Glu Glu Ala Val Gln Val Phe		
	905	910	915
Glu Ser Lys Lys	Ile Ser Ala Asp Val Asn Gly Asp Gly Gln Val		
	920	925	930
Ser Ile Gly Asp	Leu Ala Ile Ile Ala Gly Ala Tyr Gly Lys Glu		
	935	940	945
Glu Gly Gln Ala	Gly Trp Asn Lys Lys Ala Asp Val Asn His Asp		
	950	955	960
Gly Lys Val Asp	Ile Ile Asp Leu Thr Ile Val Ala Lys Ala Ile		
	965	970	975
Leu Gln Ile			
	978		

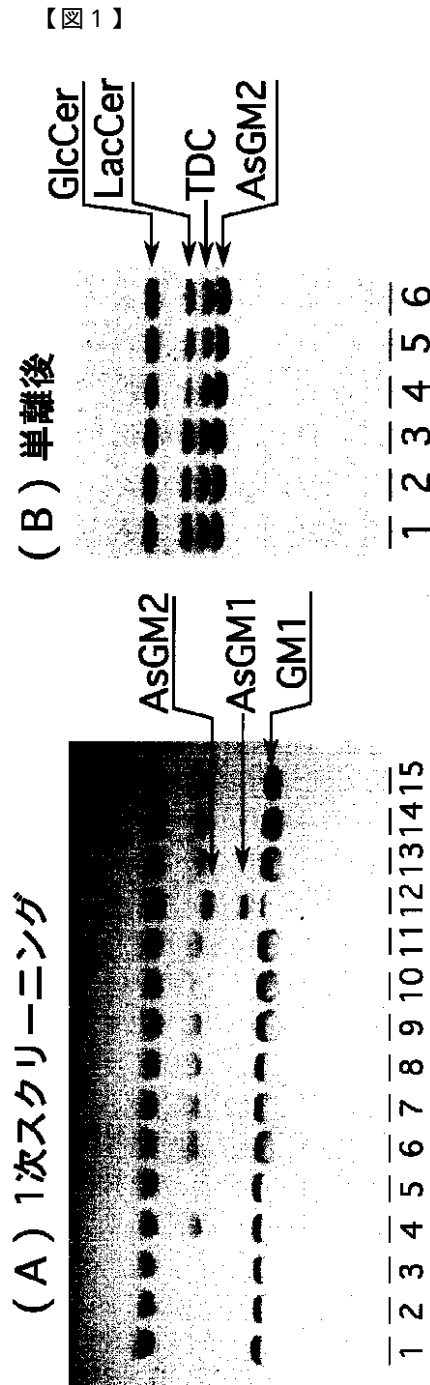
【図面の簡単な説明】

【図1】 ガングリオシド分解酵素生産菌の1次スクリーニングを示す薄層クロマトグラフ。

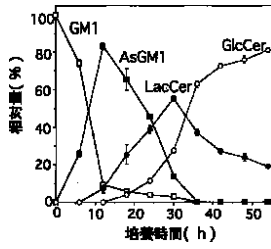
【図2】 TS12株によるGM1の分解様式を示す薄層クロマトグラフ。

【図3】 TS12株のNBD-GM1の分解様式を示す

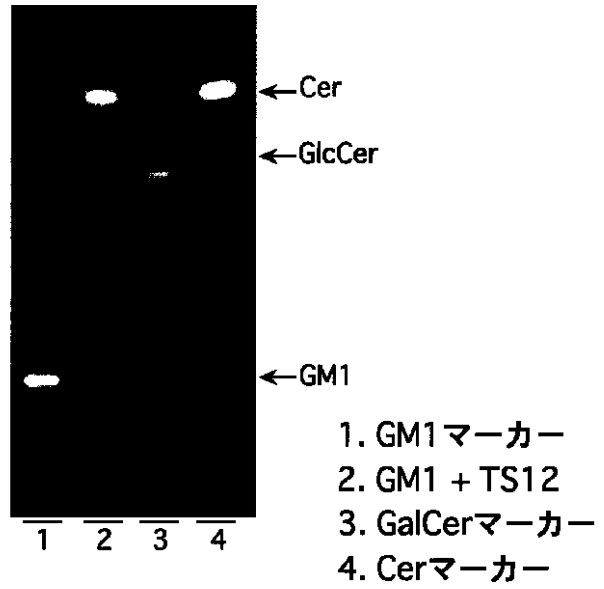
示すグラフ。



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.7
C 1 2 R 1:01)

識別記号

F I

テームコード(参考)

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA12 CA04 DA05 DA06
EA04 FA02 GA11 HA03
4B050 CC01 CC03 DD02 LL05
4B064 AF21 CA02 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01Y AA26X AB01 BA01
CA16 CA19 CA44