

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2995289号

(45)発行日 平成11年(1999)12月27日

(24)登録日 平成11年(1999)10月29日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
1/21		1/21
// (C 1 2 N 1/21		
C 1 2 R 1:19)		

請求項の数3 (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平9-221193

(22)出願日 平成9年(1997)8月4日

(65)公開番号 特開平11-46773

(43)公開日 平成11年(1999)2月23日

審査請求日 平成9年(1997)8月4日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年2月17日
農林水産技術会議事務局研究開発課食品総合研究所発行
の「糖質の構造改変による高機能性素材の開発に関する
総合研究 研究成果検討会議資料」に発表

微生物の受託番号 F E R M B P - 6 0 3 3

(73)特許権者 591031360
農林水産省食品総合研究所長
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72)発明者 林 清
茨城県土浦市乙戸南1丁目5-3

(72)発明者 リュウ アイミン
茨城県つくば市観音台2-1-2 農林
水産省食品総合研究所内

(72)発明者 リー ヘビアオ
茨城県つくば市観音台2-1-2 農林
水産省食品総合研究所内

(72)発明者 原口 和朋
茨城県つくば市吾妻1丁目1-1-603
-417

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

審査官 齋藤 真由美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子。

【請求項2】 請求項1記載のセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子を含むプラスミドベクター。

【請求項3】 請求項2記載のプラスミドベクターで形質転換された形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドベクター及び形質転換体に関する。セロピオースフォスフォリラーゼ (E C 2 . 4 . 1 . 2 0) は、セロピオースを加リン酸分解する酵素であり、セロピオースとリン酸を

原料としてグルコース - 1 - リン酸とグルコースが得られる。また、キトピオースを原料にしてグルコサミン - 1 - リン酸を、ラクトースを原料にしてガラクトース - 1 - リン酸を合成することができる。この酵素は、上記の反応の逆反応、すなわちグルコース - 1 - リン酸とグルコースからセロピオースを合成する反応なども進行させることができる。このように、リン酸糖や各種2糖類の合成に利用される酵素である。

【0002】

【従来の技術】上記したように、セロピオースフォスフォリラーゼは、各種のリン酸糖の合成反応やその逆反応による2糖類の合成に関与する酵素である。逆反応では、グルコースの他に2 - アミノ - 2 - デオキシ - D - グルコース、マンノース、2 - アミノ - 2 - デオキシ - D - マンノース、2 - デオキシ - D - グルコース、6 -

デオキシ-D-グルコース、D-キシロース等の糖類を使用して様々なヘテロ2糖類を合成することができる。これらのリン酸糖や2糖類は、食品用素材、医薬品用素材などとして、今後の開発が期待される有用な物質である。しかしながら、従来はセロピオースフォスフォリラーゼとしては、セルビブリオ (*Cellvibrio*) 属及びクロストリジウム (*Clostridium*) 属微生物菌体から抽出したものが粗酵素あるいは精製酵素として利用されているにすぎず、該酵素を安定的に生産して工業的利用の向上を図ることは行われていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、セロピオースフォスフォリラーゼの一層の活用を図るため、該酵素の遺伝子をクローニングすることによって、遺伝子の構造を解明し、遺伝子を発現させて該酵素の工業的な生産に寄与することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、セロピオースフォスフォリラーゼの構造遺伝子を解明するために研究を重ねた結果、該酵素の生産能を有するセルビブリオ属微生物からセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子のクローニングに成功し、本発明を完成した。

【0005】請求項1記載の本発明は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子である。請求項2記載の本発明は、請求項1記載のセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子を含むプラスミドベクターである。請求項3記載の本発明は、請求項2記載のプラスミドベクターで形質転換された形質転換体である。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明者らは、セロピオースフォスフォリラーゼ生産能を有するセルビブリオ属由来の細菌から抽出したセロピオースフォスフォリラーゼを高度に精製し、そのN末端のアミノ酸配列を決定した。さらに、このセロピオースフォスフォリラーゼを酵素分解してペプチドフラグメントを調製し、それらのアミノ酸配列を決定した。次いで、それらのアミノ酸配列から確認できた塩基配列を基にしてプライマーを作製した(配列表の配列番号13及び14参照)。これを用いて、セルビブリオ属菌株から抽出したゲノムDNAを鋳型として行ったポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)により、DNA塩基配列を有する820bpの明瞭なバンドを得た。

【0007】得られたバンド(PCR産物)をクローニングし、DNAシーケンサーで分析してDNA塩基配列を解読した(配列表の配列番号15参照)。このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、先に得られたペプチドフラグメント(配列表の配列番号3~7参照)に相当するアミノ酸配列が認められたことから、これらのペプチドフラグメントが、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【0008】そこで、このPCR産物をプローブとして、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子のクローニングを実施した。まず、セルビブリオ属の細菌から抽出したゲノムDNAを酵素分解後、ラムダファージに *in vitro* パッケージングし、ファージライブラリーを作成した。このファージライブラリーの中から、前記のPCR産物をプローブとして、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子をもつファージをスクリーニングし、得られた陽性ファージから該遺伝子を抽出した。さらに、このファージから遺伝子を抽出し、制限酵素で分解し、得られたDNA断片についてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、この3.1KbpのDNA断片に、目的とするアミノペプチダーゼ遺伝子の存在を確認した。上記のセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子を有するフラグメントをサブクローニングして、プラスミドを作製した。このプラスミドを用いて、常法により大腸菌に形質転換し、形質転換体を得た。

【0009】以下に、本発明を詳しく説明する。前記したように、本発明のセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子は、セロピオースフォスフォリラーゼ生産能を有するセルビブリオ属微生物に由来するものである。このようなセロピオースフォスフォリラーゼ生産能を有するセルビブリオ属微生物の菌株としては、セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*) ATCC 13127 株等がある。

【0010】セロピオースフォスフォリラーゼは、上記微生物菌体から得ることができる。具体的には、上記の菌株を常法に従い栄養培地で培養後、培養物から菌体を分離した後、該菌体を常法により破砕、遠心分離してセロピオースフォスフォリラーゼ画分を得る。次に、カラムクロマトグラフィー、FPLC、HPLC等の精製手段を用いることにより、高度に精製したセロピオースフォスフォリラーゼを得ることができる。

【0011】次に、この精製したセロピオースフォスフォリラーゼのN末端のアミノ酸配列を決定した。配列の決定には、プロテインシーケンサー477A型(パーキンエルマー社製)を用いた。決定したN末端のアミノ酸配列は、配列表の配列番号2に示す通りである。さらに、このセロピオースフォスフォリラーゼを酵素分解して、ペプチドフラグメントを調製し、それらのアミノ酸配列を決定した(配列表の配列番号3~12参照)。

【0012】解読できたアミノ酸配列から塩基配列を解読し、これをもとに作製したプライマー(配列番号13および配列番号14参照)を用いて、セルビブリオ属菌株から抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCR反応を行った。その結果、DNA塩基配列を有する820bpの明瞭なバンドを得た。得られたバンド(PCR産物)をクローニングし、DNAシーケンサーで分析してDNA塩基配列を解読した(配列表の配列番号15参照)。このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、先に得られたペプチドフラグメント(配列表の配列

番号3~7参照)に相当するアミノ酸配列が認められたことから、これらのペプチドフラグメントが、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【0013】そこで、このPCR産物をプローブとして、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子のクローニングを実施した。まず、セルビブリオ属の細菌からDNAを抽出し、制限酵素で切断して得た画分を、ラムダファージに *in vitro* パッケージングし、ファージライブラリーを作成した。ファージライブラリーの中から、前記のPCR産物をプローブとして用いて、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子をもつファージをスクリーニングし、陽性ファージを得た。

【0014】この陽性ファージから該遺伝子を抽出し、制限酵素を作用させて得られた部分分解物を、アガロースゲル電気泳動で分離後、サザンハイブリダイゼーション(「クローニングとシーケンシング」、渡辺監修、農村文化社、1989年、157頁)を行った。その結果、3.1KbpのDNA断片に目的とするセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子の存在を確認した。本発明のセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子は、配列表の配列番号1記載の塩基配列を有する。本発明に係るセロピオースフォスフォリラーゼは、新規なアミノ酸配列を有する酵素であり、これと65%以上の相同性が認められる蛋白質は見当たらなかった。

【0015】次に、この3.1KbpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動で調製し、DNAライゲーションキット(宝酒造株式会社製)を用いて、予め脱リン酸処理しておいたプラスミドにサブクローニングし、プラスミドpUC-2を調製した。さらに、このプラスミドを、大腸菌に形質転換した。形質転換された大腸菌(*E. coli* pUC-2)は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM BP-6033である。なお、プラスミドpUC-2にはセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子が含まれている。

【0016】セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子の発現は、以上のようにして得た形質転換体である大腸菌を培養し、その大腸菌及び培養上清中のセロピオースフォスフォリラーゼを測定して確認することができる(*Journal of Biochemistry*, 112巻, 40-44頁, 1992年)。また、この形質転換体を栄養培地に20~37で1~3日間培養し、得られた菌体を破碎したあと、固液分離して得た上清を常法により精製してセロピオースフォスフォリラーゼを得ることができる。

【0017】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

実施例1

セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*) ATCC 13127株を栄養培地に培養したのち、培養物から菌体を分

離した。次いで、該菌体を常法により破碎した後、遠心分離を行い破碎液を得、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを活用し、高度に精製したセロピオースフォスフォリラーゼを得た。

【0018】この精製セロピオースフォスフォリラーゼについて、プロテインシーケンサー477A型(パーキンエルマー社製)により、そのN末端のアミノ酸配列を決定した。決定した配列を配列表の配列番号2に示す。さらに、このセロピオースフォスフォリラーゼをリシルエンドペプチダーゼ(メルク社製)で分解してペプチドフラグメントを調製し、10種類のペプチドフラグメントのアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列を配列表の配列番号3~12に示す。

【0019】解読できたアミノ酸配列の中から、コドンの縮重の少ない領域を選び出し、その領域について6箇所のフォワードプライマーおよび6箇所のリバースプライマーを作成した。これらを組み合わせ、セルビブリオ・ギルバス ATCC 13127株のゲノムDNAを鋳型とし、PCR反応により増幅させた。その結果、これらのプライマーの組合せのうち、配列表の配列番号13に記載したフォワードプライマーと、配列表の配列番号14に記載したリバースプライマーとを用いて行ったPCR反応により、820bpの明瞭なバンドが得られた。

【0020】得られたバンドをクローニングし、DNAシーケンサーで分析したところ、配列表15に記載のDNA塩基配列が得られた。このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、先に得られたペプチドフラグメントのうち、配列表の配列番号3~7に記載のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列が認められた。このことから、これらのペプチドフラグメントは、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子の一部であることが判明した。そこで、このPCR産物をプローブとして、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子のクローニングを実施した。

【0021】一方、セルビブリオ・ギルバス ATCC 13127株から、斉藤の方法(蛋白質核酸酵素、11巻、446頁)によりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを制限酵素 *Sau* III AI で切断して部分分解し、超遠心分離することにより約20Kbpの画分を得た。この画分を、ギガパックIIゴールド(ストラタジーン社製)を用いて、ラムダファージに *in vitro* パッケージングし、ファージライブラリーを作成した。

【0022】ここで、前記のプローブを用いて、常法(「クローニングとシーケンシング」、渡辺監修、農村文化社、1989年、134頁)によりファージライブラリーからセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子をもつファージをスクリーニングした。その結果、5個の陽性ファージを得た。さらに、このファージから遺伝子を抽出し、制限酵素 *Sac* I及び*Pst* Iで部分分解し、得られた制限酵素分解物をアガロースゲル電気泳動で分離後、

サザンハイブリダイゼーション(「クローニングとシークエンス」、渡辺監修、農村文化社、1989年、157頁)を行った。その結果、3.1KbpのDNA断片に、目的とするセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子の存在を確認した。

【0023】次に、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第2版" 6.3章 Vo1. 1 (1989)に記載された方法に従い、この3.1Kbpのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により調製した。一方、プラスミドpUC-18を制限酵素 Sac I及びPst Iで分解し、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸処理した。この脱リン酸処理プラスミドに、DNAライゲーションキット(宝酒造株式会社製)を用いて、先の3.1Kbpのフラグメントを常法(「クローニングとシークエンス」、渡辺監修、農村文化社、1989年、134頁記載の方法)によりサブクローニングして、プラスミドpUC-2を調製した。

【0024】さらに、このプラスミドを用いてSambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第2版" 1.74章 Vo1. 1 (1989)に記載された方法に従い、大腸菌に形質転換した。形質転換された大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERMBP-6033である。なお、プラスミドpUC-2にはセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子が含まれている。

【0025】以上のようにして得た形質転換体から、プラスミドpUC-2を多量に調製し、dローダミン・ターミネーター・サイクルシーケンシング・キット(パーキンエルマー社製)を用いて塩基配列を解読した。解読した塩基配列の情報をつなぎ合わせるにより、セロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子を構成した。該遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、配列表の配列番号1に示す通りである。

【0026】この配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列からなるセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子を、先に判明しているアミノ酸配列と比較した。その結果、セロピオースフォスフォリラーゼのN末端のアミノ酸配列(配列表の配列番号2参照)は、配列番号1に示したアミノ酸配列中の1~4番目の配列と一致した。さらに、セロピオースフォスフォリラーゼ由来のペプチドフラグメントの配列(配列表の配列番号3、4、5、

配列

GAGCTCGGCC CTGATGTAC GGTCCGGAGAG CAGCACGGC CCACGGTAGT GCCCCGGACG	60
GGTGTCCGGG GCCGTCCGCC CACGCCCGTC CACGCTCCTC CCACACCGTT CCCACACCCC	120
TGTGCGAGCG TCGCGCAGCC CGCCCGGGG GCGCGGCCGG AGGGTGC GCA CGGACGTGCG	180
ACCTGCGCCC GTTCTCGTCG GGACCCGCGG CGGCTATGAT CCCTCTCGTG AGGCGCGTGG	240
GAGCGCTCTC GCACCGACCA TGAGCCGCGT CAGAGCCTCG ACGCCGACCC GCACGGACGC	300
GGACGGCCGA CCGGGGGGCC GGGCGCGACA CAACCCGAGC ACCCGAGGGG CACCACCG	358
ATG CGG TAC GGC CAT TTC GAC GAC GCG GCG CGC GAG TAC GTC ATC ACG	406

6、7、8、9、10、11及び12参照)は、それぞれ配列番号1に示したアミノ酸配列中の90~114番目、115~131番目、132~142番目、189~219番目、235~252番目、278~288番目、289~319番目、411~424番目、551~557番目及び590~618番目の配列と一致した。

【0027】また、活性型セロピオースフォスフォリラーゼの分子量を、島津製作所、レーザーイオン化 TOF-MS KOMPACT MALDI III 型で測定したところ、91,000ダルトンであり、本遺伝子でコードされる蛋白の分子量90,813と良く一致していた。

【0028】以上の結果より、塩基配列中にセロピオースフォスフォリラーゼ遺伝子を見出した。すなわち、セロピオースフォスフォリラーゼの構造遺伝子は塩基配列中の359番目以降2827番目までの間に存在することが確認された。

【0029】

【発明の効果】本発明によれば、セロピオースフォスフォリラーゼの遺伝子が提供される。これを発現させることにより得られる酵素は、加リン酸反応あるいはその逆反応を進行させて、食品加工及び医薬品工業の分野において有用な各種リン酸糖やヘテロ2糖類を効率よく製造することができる。

【0030】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3157

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*)

株名：ATCC 13127

直接の起源

プラスミド名：pUC-2

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：359..2824

特徴を決定した方法：E

CCC GAC GAG GAG AAG TGG GCC GAC GAC GCC CAC CAG GTC GTC AAC AAG 1222
 Pro Asp Glu Glu Lys Trp Ala Asp Asp Ala His Gln Val Val Asn Lys
 275 280 285

GCG CCC GCG CAC GCG CTG CTG GGC CGG TTC GCG ACG AGC GAG CAG GTC 1270
 Ala Pro Ala His Ala Leu Leu Gly Arg Phe Ala Thr Ser Glu Gln Val
 290 295 300

GAC GCC GCC CTG GAG GCG CTG AAC TCC TAC TGG ACG AAC CTG CTC TCG 1318
 Asp Ala Ala Leu Glu Ala Leu Asn Ser Tyr Trp Thr Asn Leu Leu Ser
 305 310 315 320

ACG TAC TCG GTG TCG AGC ACC GAC GAG AAG CTC GAC CGG ATG GTC AAC 1366
 Thr Tyr Ser Val Ser Ser Thr Asp Glu Lys Leu Asp Arg Met Val Asn
 325 330 335

ATC TGG AAC CAG TAC CAG TGC ATG GTC ACG TTC AAC ATG TCG CGC TCG 1414
 Ile Trp Asn Gln Tyr Gln Cys Met Val Thr Phe Asn Met Ser Arg Ser
 340 345 350

GCG TCG TTC TTC GAG ACG GGC ATC GGC CGC GGG ATG GGC TTC CGC GAC 1462
 Ala Ser Phe Phe Glu Thr Gly Ile Gly Arg Gly Met Gly Phe Arg Asp
 355 360 365

TCC AAC CAG GAC CTC CTG GGC TTC GTG CAC CTG ATC CCG GAG CGC GCG 1510
 Ser Asn Gln Asp Leu Leu Gly Phe Val His Leu Ile Pro Glu Arg Ala
 370 375 380

CGC GAG CGG ATC ATC GAC ATC GCC TCG ACG CAG TTC GCG GAC GGC TCG 1558
 Arg Glu Arg Ile Ile Asp Ile Ala Ser Thr Gln Phe Ala Asp Gly Ser
 385 390 395 400

GCG TAC CAC CAG TAC CAG CCG CTC ACG AAG CGC GGG AAC AAC GAC ATC 1606
 Ala Tyr His Gln Tyr Gln Pro Leu Thr Lys Arg Gly Asn Asn Asp Ile
 405 410 415

GGC TCG GGC TTC AAC GAC GAC CCG CTG TGG CTC ATC GCG GGC GTG GCG 1654
 Gly Ser Gly Phe Asn Asp Asp Pro Leu Trp Leu Ile Ala Gly Val Ala
 420 425 430

GCG TAC ATC AAG GAG TCC GGC GAC TGG GGC ATC CTC GAC GAG CCC GTG 1702
 Ala Tyr Ile Lys Glu Ser Gly Asp Trp Gly Ile Leu Asp Glu Pro Val
 435 440 445

CCG TTC GAC AAC GAG CCC GGC TCC GAG GTC CCG CTG TTC GAG CAC CTG 1750
 Pro Phe Asp Asn Glu Pro Gly Ser Glu Val Pro Leu Phe Glu His Leu
 450 455 460

ACG CGC TCC TTC CAG TTC ACG GTG CAG AAC CGC GGC CCG CAC GGC CTG 1798
 Thr Arg Ser Phe Gln Phe Thr Val Gln Asn Arg Gly Pro His Gly Leu
 465 470 475 480

CCG CTC ATC GGC CGT GCC GAC TGG AAC GAC TGC CTC AAC CTC AAC TGC 1846
 Pro Leu Ile Gly Arg Ala Asp Trp Asn Asp Cys Leu Asn Leu Asn Cys
 485 490 495

TTC TCG ACG ACC CCG GGC GAG TCG TTC CAG ACG ACC GAG AAC CAG GCG 1894
 Phe Ser Thr Thr Pro Gly Glu Ser Phe Gln Thr Thr Glu Asn Gln Ala
 500 505 510

GGC GGC GTC GCG GAG TCC GTG TTC ATC GCG GCG CAG TTC GTG CTC TAC 1942
 Gly Gly Val Ala Glu Ser Val Phe Ile Ala Ala Gln Phe Val Leu Tyr
 515 520 525

GGC GCG GAG TAC GCC ACG CTC GCG GAG CGT CGC GGC CTC GCG GAC GTC 1990
 Gly Ala Glu Tyr Ala Thr Leu Ala Glu Arg Arg Gly Leu Ala Asp Val

530	535	540	
GCC ACC GAG GCG CGC AAG TAC GTC GAC GAG GTG CGT GCC GCG GTG CTC			2038
Ala Thr Glu Ala Arg Lys Tyr Val Asp Glu Val Arg Ala Ala Val Leu			
545	550	555	560
GAG CAC GGC TGG GAC GGC CAG TGG TTC CTG CGT GCC TAC GAC TAC TAC			2086
Glu His Gly Trp Asp Gly Gln Trp Phe Leu Arg Ala Tyr Asp Tyr Tyr			
	565	570	575
GGC AAC CCG GTC GGC ACG GAC GCC AAG CCC GAG GGC AAG ATC TGG ATC			2134
Gly Asn Pro Val Gly Thr Asp Ala Lys Pro Glu Gly Lys Ile Trp Ile			
	580	585	590
GAG CCG CAG GGC TTC GCC GTC ATG GCG GGC ATC GGC GTC GGC GAG GGC			2182
Glu Pro Gln Gly Phe Ala Val Met Ala Gly Ile Gly Val Gly Glu Gly			
	595	600	605
CCG GAC GAC GCG GAC GCG CCG GCC GTC AAG GCG CTC GAC TCC GTG AAC			2230
Pro Asp Asp Ala Asp Ala Pro Ala Val Lys Ala Leu Asp Ser Val Asn			
	610	615	620
GAG ATG CTC GGC ACG CCG CAC GGC CTG GTG CTG CAG TAC CCG GCG TAC			2278
Glu Met Leu Gly Thr Pro His Gly Leu Val Leu Gln Tyr Pro Ala Tyr			
	625	630	635
ACG ACG TAC CAG ATC GAG CTC GGC GAG GTC TCC ACG TAC CCG CCC GGC			2326
Thr Thr Tyr Gln Ile Glu Leu Gly Glu Val Ser Thr Tyr Pro Pro Gly			
	645	650	655
TAC AAG GAG AAC GGC GGC ATC TTC TGC CAC AAC AAC CCC TGG GTG ATC			2374
Tyr Lys Glu Asn Gly Gly Ile Phe Cys His Asn Asn Pro Trp Val Ile			
	660	665	670
ATC GCC GAG ACG GTC GTG GGG CGC GGT GCG CAG GCG TTC GAC TAC TAC			2422
Ile Ala Glu Thr Val Val Gly Arg Gly Ala Gln Ala Phe Asp Tyr Tyr			
	675	680	685
AAG CGG ATC ACC CCC GCG TAC CGC GAG GAC ATC TCC GAC ACG CAC AAG			2470
Lys Arg Ile Thr Pro Ala Tyr Arg Glu Asp Ile Ser Asp Thr His Lys			
	690	695	700
CTC GAG CCG TAC GTG TAC GCG CAG ATG ATC GCG GGC AAG GAG GCG GTG			2518
Leu Glu Pro Tyr Val Tyr Ala Gln Met Ile Ala Gly Lys Glu Ala Val			
	705	710	715
CGC GCC GGC GAG GCG AAG AAC TCG TGG CTC ACC GGA ACG GCG GCG TGG			2566
Arg Ala Gly Glu Ala Lys Asn Ser Trp Leu Thr Gly Thr Ala Ala Trp			
	725	730	735
AAC TTC GTC GCG GTG TCC CAG TAC CTG CTG GGC GTG CGG CCC GAC TAC			2614
Asn Phe Val Ala Val Ser Gln Tyr Leu Leu Gly Val Arg Pro Asp Tyr			
	740	745	750
GAC GGC CTC GTG GTC GAC CCG CAG ATC GGT CCG GAC GTC CCC TCG TAC			2662
Asp Gly Leu Val Val Asp Pro Gln Ile Gly Pro Asp Val Pro Ser Tyr			
	755	760	765
ACG GTC ACC CGC GTG GCC CGC GGC GCG ACG TAC GAG ATC ACG GTG ACC			2710
Thr Val Thr Arg Val Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Glu Ile Thr Val Thr			
	770	775	780
AAC TCG GGC GCC CCG GGC GCG CGT GCG TCG CTC ACG GTC GAC GGC GCG			2758
Asn Ser Gly Ala Pro Gly Ala Arg Ala Ser Leu Thr Val Asp Gly Ala			
	785	790	795
CCC GTC GAC GGC CGC ACG GTC CCC TAC GCC CCG GCC GGC TCG ACC GTC			2806

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

配列

Val Thr Val Thr Asn Thr Ser Asp Ala Pro Lys
1 5 10

【0035】配列番号：6

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

配列

Thr Glu Tyr Arg Glu Arg Arg Asp His Tyr Ala Val Phe Gly Val Asn
1 5 10 15
Thr Arg Ala Asp Gly Phe Asp Thr Asp Arg Asp Thr Phe Val Gly
20 25 30

【0036】配列番号：7

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ser Ala Asp Ser Val Ala Ser Gly Trp Tyr Pro Ile Gly Ser His Ser
1 5 10 15
Val Ala

【0037】配列番号：8

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (Cellvibrio gilvus)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

配列

Trp Ala Asp Asp Ala His Gln Val Val Asn Lys
1 5 10

配列

Ala Pro Ala His Ala Leu Leu Gly Arg Phe Ala Thr Ser Glu Gln Val
1 5 10 15
Asp Ala Ala Leu Glu Ala Leu Asn Ser Tyr Trp Thr Asn Leu Leu
20 25 30

【0039】配列番号：10

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (Cellvibrio gilvus)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (Cellvibrio gilvus)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

【0038】配列番号：9

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (Cellvibrio gilvus)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (Cellvibrio gilvus)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

Arg Gly Asn Asn Asp Ile Gly Ser Gly Phe Asn Asp Asp Pro
 1 5 10

【0040】配列番号：11

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

配列

Tyr Val Asp Glu Val Arg Ala

1 5

【0041】配列番号：12

配列の長さ：29

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物配列

Ile Trp Ile Glu Pro Gln Gly Phe Ala Val Met Ala Gly Ile Gly Val
 1 5 10 15
 Gly Glu Gly Pro Asp Asp Ala Asp Ala Pro Ala Val Lys
 20 25

【0042】配列番号：13

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（アミノ酸配列から作成）

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

配列

GARTAYG TSA TYACSAC 17

【0043】配列番号：14

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（アミノ酸配列から作成）

配列

GAGTACGTCA TCACGACGCC TCACACCCCC TACCCGTGGA TCAACTACCT CGGGTCGGAG 60
 CAGTTCTTCT CGCTGCTCTC CCACCAGGCC GCGGCTACT CGTTCTACCG CGACGCCAAG 120
 ATGCGCGGGC TCACGCGCTA CCGCTACAAC AACATCCCCG CGGACGCGGG CGGCCGGTAC 180
 CTGTACGTCA ACGACGGCGG CGACGTGTGG ACCCCGTCGT GGCTGCCGGT CAAGGCCGGAC 240
 CTGGACCACT TCGAGGCGCG CCACGGCCTC GGCTACTCGC GCATCACGGG CGAGCCGAAC 300
 GGCCTGAAGG TCGAGACGCT CTTCTTCGTC CCGCTCGGCG AGAACGCCGA GGTGCAGAAG 360
 GTCACCGTCA CCAACACGTC CGACGCCCGG AAGACGGCGA CGCTGTTCTC GTTCGTCGAG 420
 TTCTGCCTGT GGAACGCGCA GGACGACCAG ACGAACTACC AGCGCAACCT GTCGATCGGC 480
 GAGGTCGAGG TCGAGCAGGA CGGCCCGCAC GGCTCGGCGA TCTACCACAA GACCGAGTAC 540

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*)

株名：ATCC 13127

直接の起源

Cellvibrio gilvus が生産した酵素の分解物

配列

ACCTGRTGBG CRTCRTC 17

【0044】配列番号：15

配列の長さ：821

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

起源

生物名：セルビブリオ・ギルバス (*Cellvibrio gilvus*)

株名：ATCC 13127

直接の起源

PCR反応物

CGCGAGCGCC GCGACCACTA CGCCGTGTTT GCGTGAACA CCCGCGCGGA CGGCTTCGAC 600
ACGGACCGCG ACACGTTTCGT GGGCGCGTAC AACTCGCTGG GCGAGGCGTC CGTCCCAGCGC 660
GCCGGGAAGT CCGCGGACTC GGTGCGGTCG GGCTGGTACC CGATCGGCTC GCACTCCGTC 720
GCCGTGACGC TGCAGCCCGG CGAGTCCCGC GACCTCGTCT ACGTGCTGGG CTACCTGGAG 780
AACCCGACG AGGAGAAGTG GGCCGACGAC GCCCACCAGG T 821

フロントページの続き

(72)発明者 北村 義明

茨城県つくば市吾妻2丁目1-2-704

- 401

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 1/38

BIOSIS(DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ(G

ENETYX)

WPI(DIALOG)