

(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

特開平11-46773

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月23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 0 7 K 7/06		C 0 7 K 7/06
7/08		7/08
14/195		14/195

Z N A A

審査請求 有 請求項の数 3 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願平9-221193</p> <p>(22) 出願日 平成9年(1997) 8月4日</p> <p>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 研究成果討論会議資料」に発表</p>	<p>(71) 出願人 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</p> <p>(72) 発明者 林 清 茨城県土浦市乙戸南1丁目5-3</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(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) 【要約】

【課題】 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。

【解決手段】 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、該遺伝子を含むプラスミドベクター並びに該プラスミドベクターで形質転換された形質転換体。

【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 (EC 2.4.1.20) 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

ロ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 820 bp 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 シークエンサーで分析して 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 3.1 Kbp 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碎、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。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 シークエ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ス」、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ケンス」、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ケンス」、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" 1.7 4 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 FERM B P - 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ことで、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 ~ 42 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、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-M S 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：3 5 9 .. 2 8 2 4

特徴を決定した方法：E

配列

```

GAGCTCGGCC CTGATGTCAC GGTCCGAGAG CAGCACGGGC CCACGGTAGT GCCCCGGACG   60
GGTGTCCGGG GCCGTCCGCC CACGCCCGTC CACGCTCCTC CCACACCGTT CCCACACCCC   120
TGTGCGAGCG TCGCGCAGCC CGCCCGGGGC GCCCGGCCGG AGGGTGCACA CGGACGTGCG   180
ACCTGCGCCC GTTCTCGTCG GGACCCGCGG CGGCTATGAT CCCTCTCGTG AGGCGCCTGG   240
GAGCGTCTC GCACCGACCA TGAGCCGCGT CAGAGCCTCG ACGCCGACCC GCACGGACGC   300
GGACGCCCGA CCGGGGGGCC GGGCCGACCA CAACCCGAGC ACCCGAGGGG CACCACCG   358
ATG CGG TAC GGC CAT TTC GAC GAC GCG GCG CGC GAG TAC GTC ATC ACG   406
Met Arg Tyr Gly His Phe Asp Asp Ala Ala Arg Glu Tyr Val Ile Thr
  1             5             10            15
ACG CCT CAC ACC CCC TAC CCG TGG ATC AAC TAC CTC GGG TCG GAG CAG   454
Thr Pro His Thr Pro Tyr Pro Trp Ile Asn Tyr Leu Gly Ser Glu Gln
  20            25            30
TTC TTC TCG CTG CTC TCC CAC CAG GCC GGC GGC TAC TCG TTC TAC CGC   502
Phe Phe Ser Leu Leu Ser His Gln Ala Gly Gly Tyr Ser Phe Tyr Arg
  35            40            45
GAC GCC AAG ATG CGG CGG CTC ACG CGC TAC CGC TAC AAC AAC ATC CCC   550
Asp Ala Lys Met Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Arg Tyr Asn Asn Ile Pro
  50            55            60
GCG GAC GCG GGC GGC CGG TAC CTG TAC GTC AAC GAC GGC GGC GAC GTG   598
Ala Asp Ala Gly Gly Arg Tyr Leu Tyr Val Asn Asp Gly Gly Asp Val
  65            70            75            80
TGG ACC CCG TCG TGG CTG CCG GTC AAG GCG GAC CTG GAC CAC TTC GAG   646
Trp Thr Pro Ser Trp Leu Pro Val Lys Ala Asp Leu Asp His Phe Glu
  85            90            95
GCG CGC CAC GGC CTC GGC TAC TCG CGC ATC ACG GGC GAG CGC AAC GGC   694
Ala Arg His Gly Leu Gly Tyr Ser Arg Ile Thr Gly Glu Arg Asn Gly
  100           105           110
CTG AAG GTC GAG ACG CTC TTC TTC GTC CCG CTC GGC GAG AAC GCC GAG   742
Leu Lys Val Glu Thr Leu Phe Phe Val Pro Leu Gly Glu Asn Ala Glu
  115           120           125
GTG CAG AAG GTC ACC GTC ACC AAC ACG TCC GAC GCC CCG AAG ACG GCG   790
Val Gln Lys Val Thr Val Thr Asn Thr Ser Asp Ala Pro Lys Thr Ala
  130           135           140
ACG CTG TTC TCG TTC GTC GAG TTC TGC CTG TGG AAC GCG CAG GAC GAC   838
Thr Leu Phe Ser Phe Val Glu Phe Cys Leu Trp Asn Ala Gln Asp Asp
  145           150           155           160
CAG ACG AAC TAC CAG CGC AAC CTG TCG ATC GGC GAG GTC GAG GTC GAG   886
Gln Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Leu Ser Ile Gly Glu Val Glu Val Glu
  165           170           175
CAG GAC GGC CCG CAC GGC TCG GCG ATC TAC CAC AAG ACC GAG TAC CGC   934
Gln Asp Gly Pro His Gly Ser Ala Ile Tyr His Lys Thr Glu Tyr Arg
  180           185           190

```

GAG CGC CGC GAC CAC TAC GCC GTG TTC GGC GTG AAC ACC CGC GCG GAC 982
 Glu Arg Arg Asp His Tyr Ala Val Phe Gly Val Asn Thr Arg Ala Asp
 195 200 205
 GGC TTC GAC ACG GAC CGC GAC ACG TTC GTG GGC GCG TAC AAC TCG CTG 1030
 Gly Phe Asp Thr Asp Arg Asp Thr Phe Val Gly Ala Tyr Asn Ser Leu
 210 215 220
 GGC GAG GCG TCC GTC CCG CGC GCC GGG AAG TCC GCG GAC TCG GTC GCG 1078
 Gly Glu Ala Ser Val Pro Arg Ala Gly Lys Ser Ala Asp Ser Val Ala
 225 230 235 240
 TCG GGC TGG TAC CCG ATC GGC TCG CAC TCC GTC GCC GTG ACG CTG CAG 1126
 Ser Gly Trp Tyr Pro Ile Gly Ser His Ser Val Ala Val Thr Leu Gln
 245 250 255
 CCC GGC GAG TCC CGC GAC CTC GTC TAC GTG CTG GGC TAC CTG GAG AAC 1174
 Pro Gly Glu Ser Arg Asp Leu Val Tyr Val Leu Gly Tyr Leu Glu Asn
 260 265 270
 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 CCG 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
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
785 790 795 800
CCC GTC GAC GGC CGC ACG GTC CCC TAC GCC CCG GCC GGC TCG ACC GTC 2806
Pro Val Asp Gly Arg Thr Val Pro Tyr Ala Pro Ala Gly Ser Thr Val
805 810 815
CGC GTC GAG GTG ACC GTC TGACCCGCGG GTCCGACGGC TGACGTCATG 2854
Arg Val Glu Val Thr Val
820
ACGATGGTCC AGGAGATCGA GACGCCCGCG CCGGCGGCC CTGCCGGCGC GGGGGTCGCG 2914
CCCAGCGCG TCGTGACGCT GCGCTCCGGT GCGTGGGAGC TCGACGTGCT CCCGCGCACC 2974
GGGGCGGCC TCGGCGGTGG CCGCATCCGC ACCTCGGACG GCGTGTGGCG CGACCTGTG 3034
CGCCCCGACGC GCCGACCGT CCTGGGCGAC CCGGAGAAGT GCTCGTCGTT CCCGATGGTG 3094
CCGTGGTCCA ACCGCATCCG CGACGGCGTG CTCGCCCTCG GCGGGCGCTC GTGGCAGCTG 3154
CAG 3157

【 0 0 3 1 】 配列番号 : 2

配列の長さ : 4 0

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 : N末端フラグメント

配列

Met Arg Tyr Gly His Phe Asp Asp Ala Ala Arg Glu Tyr Val Ile Thr
1 5 10 15
Thr Pro His Thr Pro Tyr Pro Trp Ile Asn Tyr Leu Gly Ser Glu Gln
20 25 30
Phe Phe Ser Leu Leu Ser His Gln
35 40

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

【 0 0 3 2 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 2 5

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

Ala Asp Leu Asp His Phe Glu Ala Arg His Gly Leu Gly Tyr Ser Arg
1 5 10 15
Ile Thr Gly Glu Arg Asn Gly Leu Lys
20 25

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

【 0 0 3 3 】配列番号： 4

配列の長さ： 1 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

配列

Val Glu Thr Leu Phe Phe Val Pro Leu Gly Glu Asn Ala Glu Val Gln

1

5

10

15

Lys

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

【 0 0 3 4 】配列番号： 5

配列の長さ： 1 1

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

Val Thr Val Thr Asn Thr Ser Asp Ala Pro Lys

1

5

10

配列の長さ： 3 1

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

【 0 0 3 5 】配列番号： 6

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

【 0 0 3 6 】配列番号： 7

配列の長さ： 1 8

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

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

【 0 0 3 7 】配列番号： 8

配列の長さ： 1 1

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

【 0 0 3 8 】配列番号： 9

配列の長さ： 3 1

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

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

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

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

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

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

ACCTGRTGBG CRTCRTC 17

GARTAYG TSA TYACSAC 17

【0043】配列番号：14

【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
P C R 反応物

配列

```

GAGTACGTCA TCACGACGCC TCACACCCCC TACCCGTGGA TCAACTACCT CGGGTCGGAG 60
CAGTTCTTCT CGCTGCTCTC CCACCAGGCC GCGGGCTACT CGTTCTACCG CGACGCCAAG 120
ATGCGGCGGC TCACGCGCTA CCGCTACAAC AACATCCCCG CGGACGCGGG CGGCCGGTAC 180
CTGTACGTCA ACGACGGCGG CGACGTGTGG ACCCCGTGCT GGCTGCCGGT CAAGGCGGAC 240
CTGGACCACT TCGAGGCGCG CCACGGCCTC GGCTACTCGC GCATCACGGG CGAGCGCAAC 300
GGCCTGAAGG TCGAGACGCT CTTCTTCGTC CCGCTCGGCG AGAACGCCGA GGTGCAGAAG 360
GTCACCGTCA CCAACACGTC CGACGCCCGG AAGACGGCGA CGCTGTTCTC GTTCGTGCGAG 420
TTCTGCCTGT GGAACGCGCA GGACGACCAG ACGAACTACC AGCGCAACCT GTCGATCGGC 480
GAGGTCGAGG TCGAGCAGGA CGGCCCGCAC GGCTCGGCGA TCTACCACAA GACCGAGTAC 540
CGCGAGCGCC GCGACCACTA CGCCGTGTTT GGCGTGAACA CCCGCGCGGA CGGCTTCGAC 600
ACGGACCGCG ACACGTTTCGT GGGCGCGTAC AACTCGCTGG GCGAGGCGTC CGTCCCAGCG 660
GCCGGGAAGT CCGCGGACTC GGTGCGGTCG GGCTGGTACC CGATCGGCTC GCACTCCGTC 720
GCCGTGACGC TGCAGCCCGG CGAGTCCCGC GACCTCGTCT ACGTGCTGGG CTACCTGGAG 780
AACCCCGACG AGGAGAAGTG GGCCGACGAC GCCCACCAGG T 821

```

フロントページの続き

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

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

(72) 発明者 北村 義明
茨城県つくば市吾妻 2 丁目 1 - 2 - 704 -
401