

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3030349号

(P 3 0 3 0 3 4 9)

(45)発行日 平成12年4月10日(2000.4.10)

(24)登録日 平成12年2月10日(2000.2.10)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00
1/21		1/21
9/42		9/42
//(C12N 1/21		
C12R 1:19)		

請求項の数 6 (全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9 - 206740

(22)出願日 平成9年7月31日(1997.7.31)

(65)公開番号 特開平11 - 46764

(43)公開日 平成11年2月23日(1999.2.23)

審査請求日 平成9年8月15日(1997.8.15)

特許法第30条第1項適用申請有り *Z o o l o g i c a l S c i e n c e , V o l . 1 4 , N o . 1 , (F e b r u a r y 1 9 9 7) , p . 8 3 - 9 3*

(73)特許権者 391030284
農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長
茨城県つくば市大わし1 - 2

(73)特許権者 000195568
生物系特定産業技術研究推進機構
埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2

(72)発明者 野田 博明
茨城県つくば市並木2 - 10 - 209 - 301

(72)発明者 渡辺 裕文
茨城県つくば市松代4 - 25 - 404 - 306

(72)発明者 徳田 岳
茨城県つくば市天久保2 - 4 - 19 フィ
ールドハイツA - 201

(74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔 (外1名)

審査官 斎藤 真由美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】昆虫由来のセルラーゼ遺伝子

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)又は(b)のセルラーゼ活性を有する組換えタンパク質。

(a)配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、セルラーゼ酵素活性を有するタンパク質。

【請求項2】以下の(a)又は(b)のセルラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、セルラーゼ酵素活性を有するタンパク質。

2

【請求項3】DNAが配列番号1又は2で表されるものである請求項2記載のDNA。

【請求項4】請求項2又は3記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項5】請求項4記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項6】請求項5記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から請求項1記載のセルラーゼ活性を有する組換えタンパク質を採取することを特徴とする該組換えタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は昆虫が生産し、その体内でセルロースを消化するために働くセルラーゼ、その遺伝子及び前記セルラーゼの製造方法に関する。

10

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】木材などのセルロースを食べている昆虫は体内にセルロース消化酵素（セルラーゼ）を持っており、セルロースを消化してエネルギー源としている。これらのセルラーゼは消化管内に共生する微生物が生産していると考えられており、昆虫自身がセルラーゼを作っているという示唆はあったが、動物からセルラーゼの遺伝子は取り出されていなかった。一方、細菌や糸状菌などからはセルラーゼ遺伝子が取り出されているが、分子量が大きく、活性ドメインの他に吸着ドメインおよびそれらをつなぐドメインからなることが判明している。これまでセルラーゼを昆虫から単離した例は極めて少なく、その理化学的性状についても、徘徊性のゴキブリ (*Panesthia cribrata*) のエンド - 1, 4 - グルカナナーゼなどについて調べられているだけで、遺伝子についてはまったく判っていない。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、昆虫からのセルラーゼの精製法を確立し、その酵素学的特徴を明らかにし、さらにその遺伝子を取り出し、さらにその遺伝子を用いて遺伝子工学的手法により上記酵素を製造する方法を提供することにある。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は下記の酵素化学的性質を有する昆虫由来のセルラーゼにある。

基質特異性：昆虫の唾腺または腸で作られ、餌として取り込まれたセルロースを分解する。

分子量：40,000-50,000

熱安定性： ~ 60

至適 pH：5.0 ~ 6.0

カルボキシメチルセルロースに対する比活性：70 ~ 1300 ユニット / mg

上記昆虫としてはヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) 又はタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis*) などが挙げられる。

【 0 0 0 5 】さらに、本発明は以下の (a) 又は (b) のセルラーゼ活性を有する組換えタンパク質にある。

(a) 配列番号 1 又は 2 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、セルラーゼ酵素活性を有するタンパク質。

【 0 0 0 6 】さらに、本発明は以下の (a) 又は (b) のセルラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA にある。

(a) 配列番号 1 又は 2 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のア

ミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、セルラーゼ酵素活性を有するタンパク質。そして、上記 DNA としては、例えば配列番号 1 又は 2 で表されるものが挙げられる。

【 0 0 0 7 】さらに、本発明は、上記 DNA を含む組換えベクターである。さらに、本発明は、上記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。さらに、本発明は、上記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から請求項 3 記載のセルラーゼ活性を有する組換えタンパク質を採取することを特徴とする該組換えタンパク質の製造方法である。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

1) 昆虫セルラーゼタンパク質の分離・精製

昆虫からの酵素タンパク質の分離には、一般のタンパク質の分離、精製に用いられる様々な方法が適用できる。本発明においては、シロアリを磨碎し、そのアセトン沈殿分画をクロマトグラフィーを用いて、単一のピークにまで精製できる。例えば、ゲル濾過とハイドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィーを行いほぼ純粋なセルラーゼを得ることができる。このセルラーゼの酵素学的性状は、精製した酵素を用いて、後に述べる活性の測定法によって調査できる。そして、至適 pH、至適温度、温度耐性、基質特性などが調べられる。なお、本発明で対象とした昆虫は下等シロアリであるヤマトシロアリおよび高等シロアリであるタカサゴシロアリである。

2) 昆虫セルラーゼ遺伝子のクローニング

昆虫セルラーゼ遺伝子のクローニングは、昆虫からクロマトグラフィーなどによって、効率的にセルラーゼ (エンド - 1, 4 - グルカナナーゼ) を精製し、その抗体を作成して、ファージに組み込んだ cDNA を探し出すか、またはその N 末端のアミノ酸配列をエドマン法で解読し、PCR 法によって cDNA を手に入れた後、プラスミドに組み込んで形質転換体を作成することによって達成できる。

【 0 0 1 0 】この酵素蛋白質の遺伝子 (cDNA) 塩基配列を決定する方法は、種々の分子生物学的な手法を適用できる。例えば、この精製酵素を電気泳動に掛け、ナイロンメンブレンなどに移し取り、そのメンブレンをプロテインシーケンサーにかけて、酵素の N 末端のアミノ酸配列を決定する。そして、そのアミノ酸配列から PCR 用のプライマーを作り、mRNA を鋳型として cDNA の 5' 末端と 3' 末端を含む複数の PCR 断片を手に入れ、公知のプラスミド (例えば、Stratagene 社製の pBluescript II、pUC18 等) にクローニングして、DNA シーケンサー (例えば、ABI 社製の 373A、373S 等) で cDNA の全長の塩基配列を決定できる。

【 0 0 1 1 】このようにして決定されるセルラーゼの遺伝子およびこの遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を配列番号 1 と 2 に示すが、本質的に本発明の遺伝子が

セルラーゼを発現しセルロース分解活性を有する限り、また、本発明のタンパク質がセルラーゼ活性を有する限り、当該タンパク質に含まれるアミノ酸配列、又は当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じてもよいことを意味する。

【 0 0 1 2 】従って、例えば配列番号 1 と 2 で表されるアミノ酸配列に含まれる第 1 番目のメチオニン (Met) が欠失しているものなども、このアミノ酸配列の変化によるタンパク質に含まれる。また、本発明のタンパク質に含まれるアミノ酸をコードする塩基配列のほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体も本発明の遺伝子に含まれる。

【 0 0 1 3 】なお、上記変異は、公知の突然変異誘発キット (Takara社製など) を用いることにより容易に導入することができる。また、上記塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成、PCR、又は該塩基配列を有する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。一方、上記遺伝子 DNA 断片を保持するためのベクターについては公知のプラスミドベクター (例えば Stratagene 社製の pBluescript II、pUC18 等) を用いることができる。

【 0 0 1 4 】 3) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組み換えベクターを、適合する宿主中に導入することにより得られる。宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等の細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母、SF9、SF21 等の昆虫細胞、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞などが挙げられる。

【 0 0 1 5 】大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換え体 DNA が該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、本発明の DNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、例えば pET3、pET11 (Stratagene社製)、pMAL (New England Biolabs社) 等が挙げられる。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、T₇ プロモーター、trp プロモーター、lac プロモーター、P_L プロモーター、P_R プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組み換え体 DNA の導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【 0 0 1 6 】酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えば pYEUra3、YEp13、YCp50 等が挙げられる。プロモーターとしては、例えば gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター等が挙げられる。酵母への組み換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等

が挙げられる。

【 0 0 1 7 】昆虫細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えば pBacPAK8 (Clontec 社)、pBlueBac (Invitrogen 社製) 等が用いられる。昆虫細胞への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リポフェクション法等が挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えば pMAM (Clontec 社製)、pcDNA (Invitrogen 社製) 等が用いられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

【 0 0 1 8 】 4) 昆虫セルラーゼ遺伝子の発現タンパク質の精製

本発明のタンパク質は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養物中および形質転換体中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物および形質転換体から該ポリペプチドを採取することにより製造することができる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【 0 0 1 9 】大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【 0 0 2 0 】培養は、通常振盪培養などの好気的条件下、25~37 で行う。培養中は、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (IPTG)、インドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加することができる。

【 0 0 2 1 】昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としてはグレース培地又はこの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば RPMI - 1640、DMEM 培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 0 2 2 】本発明のタンパク質の精製は昆虫からの分離・精製と同様に行うことができる。例えば本発明の遺伝子を保有する大腸菌等のクローンについて、アンピシリンなどの抗生物質を含む LB 培地などの振盪培養を行う。得られる培養物を遠心して細胞を回収し、ソニケーターにて細胞を破碎した後、ゲル濾過等を単独で又は適宜組み合わせることによって精製が行われる。得られた精製物質が目的のタンパク質であることの確認は、通常の方法、例えば SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウエスタンブロットング等の他に、セルラーゼ活

性の測定によっても行える。

【 0 0 2 3 】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕

1) タカサゴシロアリのセルラーゼの調製と活性の測定
約20頭のシロアリから消化管と唾腺を解剖により取り出し、消化管の場合は前腸、中腸、後腸などにわけて、10マイクロリットルの緩衝液(0.1M酢酸ナトリウム、pH5.5)で磨砕し、約20,000gで20分遠心した。上清を600マイクロリットルの緩衝液で希釈し、酵素液とした。エンド-1,4-グルカナーゼの活性は、2.0%ソディウム・カルボキシメチルセルロース(CMC)200マイクロリットル(緩衝液に溶かす)に、酵素液25マイクロリットルを加え、37で30分インキュベートした後、テトラゾリウム・ブルー(Sigma)で、発色程度を測定した。そのときの蛋白量は、紫外線の280と260nmの吸収を利用して、牛胎児血清を用いて標準線を作成しておき、標準線から決定した。これにより、活性の高い部位を知ることができ、次の精製操作の参考になる。

【 0 0 2 4 】 2) カラムクロマトグラフィーによる酵素の分離・精製

約15gのシロアリを蒸留水150ミリリットルで磨砕し、24,000gで30分遠心して上清を回収した。硫酸アンモニウムを加えて35~70%濃度での沈殿物を遠心して回収した。この沈殿物を30ミリリットルの0.3M酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.0)に溶かし、カラムクロマトグラフィーにかけた。サンプルの濃縮は限外濾過膜(アミコン製モデル8010,8050など)を用いて行った。

【 0 0 2 5 】 Sephacryl S-200HR(Pharmacia)をつめたカラム(26x900mm)にサンプルをのせ、0.3M酢酸アンモニウム緩衝液を流した(1分当たり1.0ミリリットル)。活性のあった分画は濃縮して、次にHiLoad 16/60 Superdex-75(Pharmacia)のカラムで精製した(1分あ

たり0.6ミリリットル)。さらに、同様に、hydroxyapatite(Bio-Rad)のカラム(10x50mm)を用いて、20mMから1Mリン酸緩衝液(pH5.5)へ勾配をかえて流して(1分当たり0.2ミリリットル)活性分画を回収した。もう一度hydroxyapatiteカラムで精製を繰り返せばさらに純度を上げることができた。精製した酵素は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行って、良く精製されていることを確認した。

【 0 0 2 6 】 3) 酵素の酵素化学的性質の調査

10 精製された酵素を用いて、至適温度を調べるには、酢酸ナトリウム緩衝液などに溶かした2%CMC溶液の中に酵素をいれ、20から70くらいまで5間隔でそれぞれのサンプルを5分間保持したのち、37で5分間テトラゾリウムで発色させ、活性を測った。至適pHは、pH域によって用いる緩衝液を変え、同様に37で活性を測った。

【 0 0 2 7 】 酵素の基質特異性(cellopentaose, cello tetraose, cellotriose, cellobiose)を調査するには、60mMの基質溶液10マイクロリットルに酵素液を10マイクロリットル加え、37でインキュベートした。分解産物を薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開して、発色剤(アニリン、ディフェニルアミン、アセトン、H3PO4)を吹き付け、熱して検出した。その結果、本酵素はcellopentaoseやcello tetraoseをより良く分解することが判った。

【 0 0 2 8 】 本酵素の比活性は基質としてカルボキシメチルセルロースを用いて測定した結果、70~1300ユニット/mg(ユニット:1分あたりにグルコース相当の還元糖を1マイクロモル生成する酵素量)であった。分子量はポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)の泳動度から推定した。ヤマトシロアリ及びタカサゴシロアリのセルラーゼ(エンド-1,4-グルカナーゼ)についての酵素化学的性質は表1に示す通りである。

【 0 0 2 9 】

【表 1】

	ヤマトシロアリ YEG1	タカサゴシロアリ YEG2	
分子量(KDa)	約 42.0	41.0	47.0
活性(units/mg)	73.6	83.4	1200
至適 pH	6.0	6.0	5.8
至適温度(°C)	50	50	65
温度耐性(°C)	~ 40	~ 40	~ 60
Km値(mg/ml)	1.8	1.5	8.7
Vmax(units/mg)	527	540	2222

【 0 0 3 0 】 〔実施例 2〕 遺伝子のクローニングと塩基配列の解析(タカサゴシロアリのセルラーゼの例)

精製した酵素をポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動し、PVDF膜にブロッキング装置(TransBlott SD,Bio-Rad)で写し取った後、クマジーブルーで染色し、乾燥後染色部分を切り取り、アミノ酸シーケンサー(LF-3000, Beckman)で酵素蛋白質のN末端のアミノ酸配列を調べた。解読されたアミノ酸配列部分(約30アミノ酸)

だけを増幅できるPCRプライマー対(縮合プライマー)を作成した。

【 0 0 3 1 】 RT-PCRを行うために、mRNA抽出キット(Pharmacia Biotech)を用いてシロアリのメッセンジャーRNAを中腸から抽出した。逆転写酵素をもちいてオリゴdTのプライマーでcDNAを合成し(421時間)、次にこの反応液をPCRに用いた。PCRの条件は94 30秒、51 1分、72 2分で30サイクルと

した。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で確認後、ベクター (pBluescript II) につなぎ、大腸菌を用いてクローニングを行った。ベクターのインサートの塩基配列を解読し、まずN末端の塩基配列の一部 (両プライマーに挟まれた部分の数十塩基) を明らかにした。さらに、この塩基配列に基づき、cDNAのその部分から5'側と3'側をそれぞれ増幅するためのプライマーを作成して Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いて、2種類のPCR産物を得た。このPCR産物をそれぞれプラスミドにクローニングし、数本づつ塩基配列を解読した。

【0032】得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列について、ヤマトシロアリ (YEG2) は配列番号1に、タカサゴシロアリは配列番号2にそれぞれ示す。これら塩基配列および推定されるアミノ酸配列から相同なものを、インターネットを利用してデータベースの中から探し出した。

【0033】〔実施例3〕形質転換体の作製及びセルラーゼ遺伝子の発現

得られたcDNAのタンパク質をコードしている部分のうち、シグナルペプチドに相当する部分を除いたDNA部分をPCRによって増幅した。このDNAをpBluescript IIのマルチクローニングサイトに、タンパク質への翻訳の読み枠が合うように結合した。大腸菌にこのプラスミドを入れ、IPTGを加えたLB培地で大腸菌を培養し、セルラーゼ遺伝子を発現させた。

【0034】大腸菌の中で作られたタンパク質がセルラーゼ活性を持つことは、アクリルアミドゲルで泳動したタンパク質の活性を見ることによって確かめた。すなわち、大腸菌を37℃でOD 660=1.0まで培養し (約5時間)、菌体をリゾチームを含む緩衝液中で消化し、得ら

れたタンパク質をCMC (カルボキシメチルセルロース) を含むポリアクリルアミドゲルで泳動し、コンゴレッドで染色した。目的のタンパク質が泳動されている部分は、セルラーゼ活性によってCMCが分解されたため、周囲よりも薄く染まった。

【0035】

【発明の効果】本発明により新規な昆虫由来のセルラーゼ、その遺伝子が提供された。そして、この遺伝子を用いて遺伝子工学的手法により昆虫由来のセルラーゼを大量に製造することができる。また、本発明によるセルラーゼ単独またはすでに知られているセルラーゼと組み合わせることにより、セルロースの分解をより効率的に行うことができる。

【0036】

【配列表】

配列番号：1
 配列の長さ：1495
 配列の形：核酸
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA to mRNA
 起原
 生物名：ヤマトシロアリ (Reticulitermes speratus)
 配列の特徴
 特徴を表す記号：signature
 存在位置：16...63
 特徴を決定した方法：E
 特徴を表す記号：peptide
 存在位置：64...1353
 特徴を決定した方法：E

配列

```

CCACTACCAG CCACC ATG AAG GTC TTC GTT TGT CTT CTG TCT GCA CTC GCG 51
                Met Lys Val Phe Val Cys Leu Leu Ser Ala Leu Ala
                    -15                -10                -5
CTT TGC CAA GCT GCT TAC GAC TAT AAG ACA GTA CTA AGC AAT TCG CTA 99
Leu Cys Gln Ala Ala Tyr Asp Tyr Lys Thr Val Leu Ser Asn Ser Leu
                1                5                10
CTT TTC TAC GAG GCT CAG CGA TCG GGA AAA TTG CCG TCT GAT CAG AAG 147
Leu Phe Tyr Glu Ala Gln Arg Ser Gly Lys Leu Pro Ser Asp Gln Lys
                15                20                25
GTC ACG TGG AGG ATT CCG CCC TTA ACG ACA AGG GCC AGA AGG CGA GGA 195
Val Thr Trp Arg Ile Pro Pro Leu Thr Thr Arg Ala Arg Arg Arg Gly
                30                35                40
CTG ACA GGA GGA TAC TAT GAC GCT GGT GAT TTT GTG AAG TTC GGC TCC 243
Leu Thr Gly Gly Tyr Tyr Asp Ala Gly Asp Phe Val Lys Phe Gly Ser
25                50                55                60
CCT ATG GCG TAC ACA GTC ACC GTC CTG GCT TGG GGT GTT ATA GAC TAC 291
Pro Met Ala Tyr Thr Val Thr Val Leu Ala Trp Gly Val Ile Asp Tyr
                65                70                75

```

11	12		
GAA TCA GCG TAT TCT GCA GCA GGA GCT CTG GAT AGT GGT CGC AAG GCT	339		
Glu Ser Ala Tyr Ser Ala Ala Gly Ala Leu Asp Ser Gly Arg Lys Ala			
80	85	90	
CTT AAA TAT GGC ACG GAC TAC TTC CTC AAG GCG CAC ACG GCC GCG AAC	387		
Leu Lys Tyr Gly Thr Asp Tyr Phe Leu Lys Ala His Thr Ala Ala Asn			
95	100	105	
GAA TTC TAC GGA CAA GTG GGC CAG GGA GAT GTC GAC CAC GCC TAC TGG	435		
Glu Phe Tyr Gly Gln Val Gly Gln Gly Asp Val Asp His Ala Tyr Trp			
110	115	120	
GGA CGT CCA GAA GAC ATG ACG ATG TCC AGA CCT GCC TAC AAG ATC GAC	483		
Gly Arg Pro Glu Asp Met Thr Met Ser Arg Pro Ala Tyr Lys Ile Asp			
125	130	135	140
ACG TCG AAA CCA GGG TCT GAC CTG GCC GCC GAG ACA GCC GCC GCC CTC	531		
Thr Ser Lys Pro Gly Ser Asp Leu Ala Ala Glu Thr Ala Ala Ala Leu			
145	150	155	
GCT GCA ACT GCC ATC GCC TAC AAG AGT GCT GAC GCC ACT TAT TCC AAC	579		
Ala Ala Thr Ala Ile Ala Tyr Lys Ser Ala Asp Ala Thr Tyr Ser Asn			
160	165	170	
AAC TTG ATC ACC CAC GCC AAG CAG CTT TTC GAC TTC GCC AAC AAT TAT	627		
20			
Asn Leu Ile Thr His Ala Lys Gln Leu Phe Asp Phe Ala Asn Asn Tyr			
175	180	185	
CGC GGC AAA TAC AGT GAT TCA ATC ACC GAC GCG CAG AAT TTC TAC GCG	675		
Arg Gly Lys Tyr Ser Asp Ser Ile Thr Asp Ala Gln Asn Phe Tyr Ala			
190	195	200	
TCC GGA GAC TAC AAG GAC GAG TTA GTA TGG GCA GCC GCA TGG CTC TAC	723		
Ser Gly Asp Tyr Lys Asp Glu Leu Val Trp Ala Ala Ala Trp Leu Tyr			
205	210	215	220
AGA GCG ACC AAC GAC AAC ACC TAT CTG ACC AAA GCT GAA TCG CTA TAC	771		
Arg Ala Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Thr Lys Ala Glu Ser Leu Tyr			
225	230	235	
AAC GAA TTC GGC CTC GGA AAC TGG AAC GGT GCC TTC AAC TGG GAT AAC	819		
Asn Glu Phe Gly Leu Gly Asn Trp Asn Gly Ala Phe Asn Trp Asp Asn			
240	245	250	
AAG ATC TCC GGT GTA CAG GTT CTA CTG GCC AAG CTC ACA AGC AAG CAG	867		
Lys Ile Ser Gly Val Gln Val Leu Leu Ala Lys Leu Thr Ser Lys Gln			
255	260	265	
GCA TAC AAG GAC AAG GTA CAA GGC TAC GTC GAT TAC TTG ATT TCG TCT	915		
Ala Tyr Lys Asp Lys Val Gln Gly Tyr Val Asp Tyr Leu Ile Ser Ser			
270	275	280	
CAG AAG AAG ACA CCC AAG GGT CTC GTA TAC ATC GAC CAG TGG GGT ACC	963		
Gln Lys Lys Thr Pro Lys Gly Leu Val Tyr Ile Asp Gln Trp Gly Thr			
285	290	295	300
CTG CGA CAT GCT GCC AAT TCT GCT CTC ATT GCT CTG CAG GCA GCC GAC	1011		
Leu Arg His Ala Ala Asn Ser Ala Leu Ile Ala Leu Gln Ala Ala Asp			
305	310	315	
CTG GGT ATC AAT GCT GCT ACT TAT CGC GCG TAT GCC AAG AAG CAG ATC	1059		
Leu Gly Ile Asn Ala Ala Thr Tyr Arg Ala Tyr Ala Lys Lys Gln Ile			
320	325	330	
GAT TAC GCA TTA GGT GAT GGA GGT CGC AGC TAC GTC ATA GGA TTT GGT	1107		

13 14

Asp Tyr Ala Leu Gly Asp Gly Gly Arg Ser Tyr Val Ile Gly Phe Gly
 335 340 345

ACT AAC CCA CCC GTA CGC CCT CAC CAC AGA TCC AGC TCG TGC CCT GAC 1155
 Thr Asn Pro Pro Val Arg Pro His His Arg Ser Ser Ser Cys Pro Asp
 350 355 360

GCA CCA GCC GTA TGT GAC TGG AAC ACG TAC AAC AGC GCC GGC CCC AAT 1203
 Ala Pro Ala Val Cys Asp Trp Asn Thr Tyr Asn Ser Ala Gly Pro Asn
 365 370 375 380

GCT CAC GTA CTC ACC GGA GCC TTG GTC GGT GGT CCA GAT AGC AAC GAT 1251
 Ala His Val Leu Thr Gly Ala Leu Val Gly Gly Pro Asp Ser Asn Asp
 385 390 395

AGC TAC ACG GAC GCT CGC AGC GAT TAC ATC TCC AAC GAA GTG GCC ACA 1299
 Ser Tyr Thr Asp Ala Arg Ser Asp Tyr Ile Ser Asn Glu Val Ala Thr
 400 405 410

GAT TAC AAC GCT GGC TTC CAA TCA GCT GTC GCT GGT CTC CTC AAG GCT 1347
 Asp Tyr Asn Ala Gly Phe Gln Ser Ala Val Ala Gly Leu Leu Lys Ala
 415 420 425

GGC GTG TAA CCGCACACAG CACTCAATGT CTCTTGTCC ACTGGACATG TGTACAATT 1405
 Gly Val
 430

TGACAACGAA AATGTAATAT TCTTCAGAAA AGTTCAATAA AAGTTTAAAT TTCAACACAA 1465
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1495

【 0 0 3 7 】 配列番号 : 2

t a k a s a g o e n s i s)

配列の長さ :

配列の特徴

配列の形 : 核酸

特徴を表す記号 : s i g p e p t i d e

鎖の数 : 二本鎖

存在位置 : 1 0 3 . . 1 5 0

トポロジー : 直鎖状

特徴を決定した方法 : E

配列の種類 : c D N A t o m R N A

特徴を表す記号 : p e p t i d e

起原

存在位置 : 1 5 1 . . 1 4 4 6

生物名 : タカサゴシロアリ (N a s u t i t e r m e s 30 特徴を決定した方法 : E

配列

ATCAGATTGA GAGTCTCTCT CCTGTTGTGC AGCCGATCAG TATAAATCGG CGGGACGGTC 60
 CTACCAAAAC AACTTCACGG CCTGCAACCA ATACCAGCCA GC ATG AGG GTC TTC 114
 Met Arg Val Phe
 -15

CTT TGT CTT CTG TCT GCG CTA GCG CTT TGC CAA GCT GCT TAC GAC TAC 162
 Leu Cys Leu Leu Ser Ala Leu Ala Leu Cys Gln Ala Ala Tyr Asp Tyr
 -10 -5 1

AAG CAA GTA CTG CGC GAT TCC CTA CTG TTC TAC GAG GCT CAA CGA TCG 210
 Lys Gln Val Leu Arg Asp Ser Leu Leu Phe Tyr Glu Ala Gln Arg Ser
 5 10 15 20

GGA AGG TTG CCC GCT GAT CAG AAA GTC ACA TGG AGA AAG GAT TCC GCC 258
 Gly Arg Leu Pro Ala Asp Gln Lys Val Thr Trp Arg Lys Asp Ser Ala
 25 30 35

CTA AAC GAC CAA GGA GAC CAG GGC CAG GAC CTA ACA GGA GGA TAC TTT 306
 Leu Asn Asp Gln Gly Asp Gln Gly Gln Asp Leu Thr Gly Gly Tyr Phe
 40 45 50

GAC GCT GGT GAT TTT GTG AAA TTC GGC TTT CCA ATG GCG TAC ACA GCC 354

Asp Ala Gly Asp Phe Val Lys Phe Gly Phe Pro Met Ala Tyr Thr Ala

15	55	60	65	16
ACC GTC CTG GCT TGG GGC CTG ATC GAC TTT GAA GCG GGC TAC TCT TCA				402
Thr Val Leu Ala Trp Gly Leu Ile Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Ser Ser				
70	75	80		
GCA GGA GCT CTG GAT GAT GGT CGC AAA GCT GTT AAA TGG GCC ACA GAC				450
Ala Gly Ala Leu Asp Asp Gly Arg Lys Ala Val Lys Trp Ala Thr Asp				
85	90	95	100	
TAT TTC ATC AAG GCG CAC ACG TCC CAA AAT GAA TTC TAC GGA CAA GTG				498
Tyr Phe Ile Lys Ala His Thr Ser Gln Asn Glu Phe Tyr Gly Gln Val				
105	110	115		
GGC CAG GGA GAT GCG GAC CAC GCC TTC TGG GGA CGT CCA GAA GAC ATG				546
Gly Gln Gly Asp Ala Asp His Ala Phe Trp Gly Arg Pro Glu Asp Met				
120	125	130		
ACA ATG GCA AGA CCT GCC TAC AAG ATC GAC ACG TCT AGA CCA GGG TCG				594
Thr Met Ala Arg Pro Ala Tyr Lys Ile Asp Thr Ser Arg Pro Gly Ser				
135	140	145		
GAT CTG GCC GGC GAA ACA GCC GCC GCC CTC GCT GCA GCT TCC ATC GTG				642
Asp Leu Ala Gly Glu Thr Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Ile Val				
150	155	160		
TTC AGG AAT GTC GAC GGC ACT TAT TCC AAC AAC CTG CTC ACA CAC GCC				690
Phe Arg Asn Val Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Asn Leu Leu Thr His Ala				
165	170	175	180	
AGG CAG CTT TTC GAC TTC GCC AAC AAT TAT CGC GGC AAA TAC AGT GAC				738
Arg Gln Leu Phe Asp Phe Ala Asn Asn Tyr Arg Gly Lys Tyr Ser Asp				
185	190	195		
TCA ATC ACC GAC GCC AGG AAT TTC TAC GCG TCC GCG GAC TAC AGG GAT				786
Ser Ile Thr Asp Ala Arg Asn Phe Tyr Ala Ser Ala Asp Tyr Arg Asp				
200	205	210		
GAA TTA GTA TGG GCA GCC GCA TGG CTC TAC AGG GCA ACC AAC GAC AAC				834
Glu Leu Val Trp Ala Ala Ala Trp Leu Tyr Arg Ala Thr Asn Asp Asn				
215	220	225		
ACC TAC CTC AAC ACC GCT GAA TCG CTA TAT GAT GAA TTC GGT CTC CAG				882
Thr Tyr Leu Asn Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Asp Glu Phe Gly Leu Gln				
230	235	240		
AAC TGG GGT GGT GGC CTT AAC TGG GAT AGC AAA GTG TCC GGT GTA CAG				930
Asn Trp Gly Gly Gly Leu Asn Trp Asp Ser Lys Val Ser Gly Val Gln				
245	250	255	260	
GTT CTA CTG GCC AAA CTC ACA AAC AAG CAA GCG TAC AAG GAC ACG GTA				978
Val Leu Leu Ala Lys Leu Thr Asn Lys Gln Ala Tyr Lys Asp Thr Val				
265	270	275		
CAA TCA TAC GTG AAT TAC CTA ATT AAC AAC CAG CAG AAG ACA CCC AAG				1026
Gln Ser Tyr Val Asn Tyr Leu Ile Asn Asn Gln Gln Lys Thr Pro Lys				
280	285	290		
GGT CTT CTT TAC ATC GGA CAT GTG GGG AAC CTG CGA CAT GCT GCA AAC				1074
Gly Leu Leu Tyr Ile Gly His Val Gly Asn Leu Arg His Ala Ala Asn				
295	300	305		
GCT GCC TTC ATT ATG CTT GAG GCT GCG GAG CTG GGT TTG AGT GCT TCT				1122
Ala Ala Phe Ile Met Leu Glu Ala Ala Glu Leu Gly Leu Ser Ala Ser				
310	315	320		
AGT TAT CGC CAG TTT GCC CAG ACG CAG ATC GAT TAC GCA TTG GGT GAC				1170

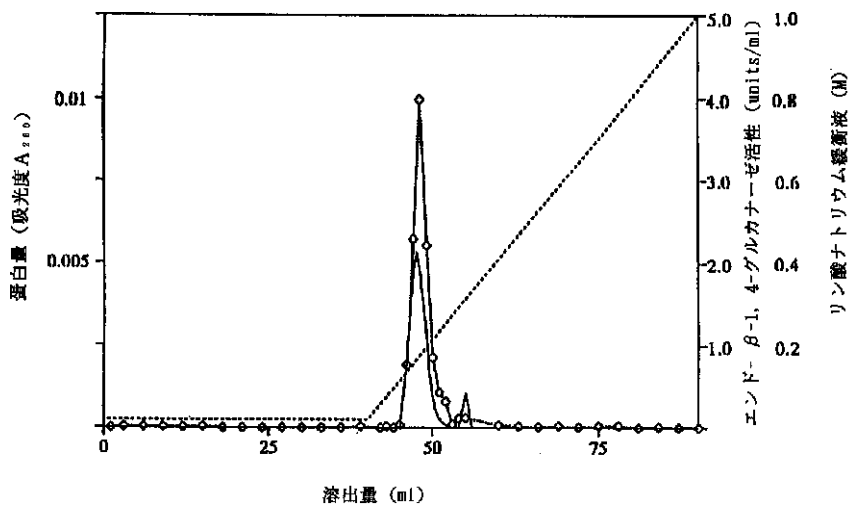
17
 Ser Tyr Arg Gln Phe Ala Gln Thr Gln Ile Asp Tyr Ala Leu Gly Asp
 325 330 335 340
 GGT GGG CGC AGC TTC GTG TGT GGA TTT GGC AGT AAC CCA CCT ACC CGC 1218
 Gly Gly Arg Ser Phe Val Cys Gly Phe Gly Ser Asn Pro Pro Thr Arg
 345 350 355
 CCT CAC CAT AGA TCT AGT TCG TGC CCA CCC GCG CCG GCC ACA TGT GAC 1266
 Pro His His Arg Ser Ser Ser Cys Pro Pro Ala Pro Ala Thr Cys Asp
 360 365 370
 TGG AAC ACA TTC AAC AGT CCA GAT CCA AAC TAC CAC GTA CTC AGT GGA 1314
 Trp Asn Thr Phe Asn Ser Pro Asp Pro Asn Tyr His Val Leu Ser Gly
 375 380 385
 GCT TTG GTG GGC GGT CCA GAT CAG AAC GAC AAC TAC GTG GAC GAT CGC 1362
 Ala Leu Val Gly Gly Pro Asp Gln Asn Asp Asn Tyr Val Asp Asp Arg
 390 395 400
 AGC GAT TAC GTC CAC AAC GAA GTT GCC ACA GAT TAC AAC GCA GGC TTC 1410
 Ser Asp Tyr Val His Asn Glu Val Ala Thr Asp Tyr Asn Ala Gly Phe
 405 410 415 420
 CAA TCA GCT CTC GCC GCT CTC GTC GCG TTG GGT TAT TAA ACTCACAAAA CA 1461
 Gln Ser Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Leu Gly Tyr
 425 430
 TTCAAATTGT CCGTCTGCTG TGAGTGTGTA CAAAATAATA TAAACAATGT AACATTGTCC 1521
 TTAGCAGTGA AAATAAAATC TTTGTATGCA GATACGTTTG TAGACGACGT TCAGTACTGC 1581
 ATACAGGGCT GAAATTGCAA TGTATAATCC TAGAAATCGA AATGGATGTT GAAATAAACT 1641
 ACAATATTAC AACTGAGTAC ACAGTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 1695

【図面の簡単な説明】

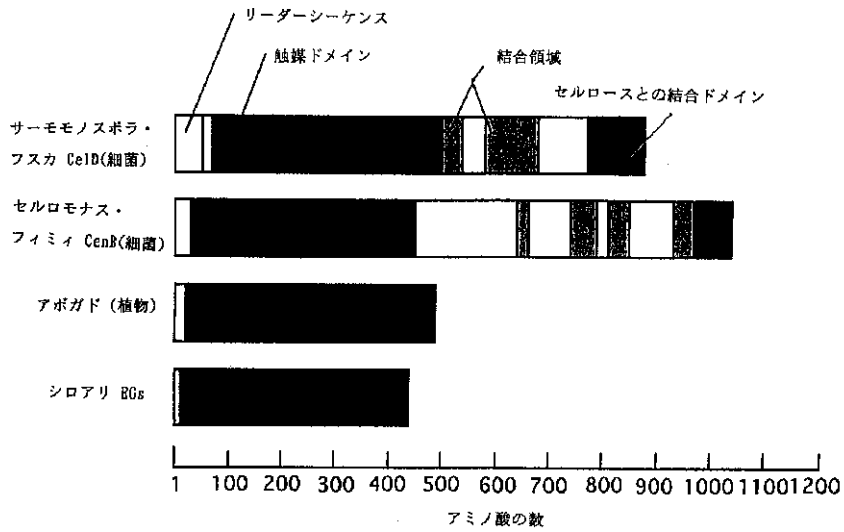
【図 1】タカサゴシロアリのセルラーゼ（エンド - 1, 4 - グルカナーゼ）のハイドロキシアパタイトカラムによる分析結果を示す説明図。

【図 2】シロアリのセルラーゼ（エンド - 1, 4 - グルカナーゼ）の構造（一番下）を細菌（上から 2 種）、植物（上から 3 番目）のものと比較した図。

【図 1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ 識別記号 F I
(C 1 2 N 9/42
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 15/09 Z N A
C 1 2 R 1:91)

(58) 調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12N 1/00 - 1/38
C12N 9/00 - 9/99
BIOSIS (DIALOG)
GenBank / EMBL / DDBJ /
(GENETYX)
WPI (DIALOG)