

(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2000-232885
(P2000-232885A)

(43) 公開日 平成12年8月29日 (2000.8.29)

(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 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/195		C 0 7 K 14/195	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
9/48		9/48	4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平11-34231

(22) 出願日 平成11年2月12日 (1999.2.12)

(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

(72) 発明者 林 清

茨城県土浦市乙戸南1丁目5-3

(72) 発明者 ラジャンデルナス・パニカール

茨城県つくば市二の宮1-24-8 パルシ
ヤスつくば1-303

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子、該遺伝子を含むベクター並びに形質転換体

(57) 【要約】

【課題】 ペプチド性の苦味除去・低減作用を有し、ペプチドやアミノ酸を主成分とする調味液の製造等、食品産業上有用なアミノペプチダーゼの遺伝的情報および大量発現システムを提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子、プラスミドおよび形質転換大腸菌 (FERM P-17178)、ならびに、配列表の配列番号4記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼの遺伝子、プラスミドおよび形質転換大腸菌。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子。

【請求項 2】 請求項 1 記載のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 3】 請求項 2 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERMP - 17178)。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼの遺伝子。

【請求項 5】 請求項 4 記載のアミノペプチダーゼ遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 6】 請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドベクター並びに形質転換体に関する。アミノペプチダーゼは、タンパク質やペプチドの N 末端側に作用し、アミノ酸単位で加水分解する酵素であり、ペプチドやアミノ酸を主成分とする調味液の製造等に活用されている。また、一部のものは、ペプチド性の苦味を除去・低減する作用を有している。この発明は、アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子に関するものであり、本酵素を活用することにより、苦味を低減ないし消滅することができるので、食品分野における活用が期待される。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】近年、調味液やカルシウム吸収促進作用を持つカゼイン分解物など、タンパク質の加水分解物を含む素材が開発され、各種食品分野で利用されている。しかし、これらのタンパク質分解物を含有する素材は、苦味を呈するものも多い。そのため、商品化に困難をきたす原因となることもある。これには、タンパク質が酵素等によって分解された際に生じる疎水性アミノ酸に富む苦味ペプチドが関与していることが多い。

【0003】この苦味ペプチドをタンパク質分解酵素で分解すれば、苦味は低減あるいは消滅させることができる。しかしながら、タンパク質を分解する酵素のうち、N 末端からアミノ酸を分解するアミノペプチダーゼに関しては、市販されているものが少なく、実用化も限られている。また、フラボバクテリウム属微生物に由来するアミノペプチダーゼの遺伝子を単離したという報告もなされていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アミノペプチダーゼを食品加工の分野等に活用するために、フラボバクテリウム属微生物からのアミノペプチダーゼ遺伝子のクローニングを計画し、本遺伝子のクローニングと大量生産に成功し、本発明を完成させた。

【0005】すなわち、請求項 1 記載の本発明は、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子である。請求項 2 記載の本発明は、請求項 1 記載のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子を含むプラスミドである。請求項 3 記載の本発明は、請求項 2 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERMP - 17178) である。

【0006】請求項 4 記載の本発明は、配列表の配列番号 2 記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼの遺伝子である。請求項 5 記載の本発明は、請求項 4 記載のアミノペプチダーゼ遺伝子を含むプラスミドである。請求項 6 記載の本発明は、請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌である。

【0007】

【発明の実施の形態】以下において本発明を詳しく説明する。本発明者らは、以下のようにして本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子を解明することに成功した。

【0008】(1) アミノペプチダーゼ遺伝子の部分塩基配列の決定

本発明者らは、高いアミノペプチダーゼ活性を有するフラボバクテリウム属の細菌の 1 種、フラボバクテリウム・ブレブ (*Flabovacterium breve*) T - 382 株を用いて以下の操作を行った。なお、本発明に使用できる微生物は、フラボバクテリウム属に属するものであればよく、上記の T - 382 株に限定されない。

【0009】フラボバクテリウム・ブレブ T - 382 株を常法により栄養培地で培養したのち、培養物から菌体を除去して得られた培養上清から、高度に精製したアミノペプチダーゼを得た。精製手段は、イオン交換クロマトグラフィーなどの既知の方法を適用することができる。ついで、常法により、この精製酵素の N 末端のアミノ酸配列を決定し (配列表の配列番号 3 に記載)、該配列をもとにフォーワードプライマー (配列表の配列番号 4 に記載) 及びリバースプライマー (配列表の配列番号 5 に記載) を作成した。

【0010】これらのプライマー (配列表の配列番号 4 および 5 参照) と、フラボバクテリウム・ブレブ T - 382 株から斉藤の方法 (蛋白質核酸酵素, 第 11 巻, 446 頁) により抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR 反応により増幅させた。その結果、800 bp の明瞭なバンドが得られた。該バンドの DNA 塩基配列を解読し、その塩基配列の情報をつなぎ合わせて、プライマー部分以外に新たな DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 6 に記載) が得られた。この 715 bp 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 N 末端のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 3 に記載) の 21 番目からの配列が認められることから、アミノペプチダーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【0011】(2) 5' 及び 3' 側未知領域の塩基配列の決定

上記(1)において得られた塩基配列は、アミノペプチダーゼ遺伝子の一部であることから、未解明の部分についても塩基配列の特定を試みた。この実験を行うにあたり、本発明者らは、Genomics、25号、674頁、1995年に記載されたサーマル・アシンメトリック・インターレースドPCR(TAIL-PCR)を利用した。

【0012】TAIL-PCRとは、既知の配列に特異的なプライマーと非特異的プライマーとを組合せて使用することにより、既知の配列に隣接する未知DNA配列を特異的に増幅する方法である。すなわち、鋳型DNAへのアニーリング温度が異なる2種類のオリゴヌクレオチドである特異的プライマー及び非特異的プライマーを用意し、PCRのアニーリング温度を变化的に制御することにより、非特異的産物の増幅を抑制し、目的配列を優先的に増幅するものである。前記(1)で得られた715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の情報をもとに、3つのフォワードプライマー(配列表の配列番号7~9に記載)、3つのリバースプライマー(配列表の配列番号10~12に記載)を化学合成した。また、未知領域に非特異的に結合する混合プライマー(配列表の配列番号13に記載)を化学合成した。

【0013】まず、3つのフォワードプライマーのそれぞれ(配列表の配列番号7~9に記載)と混合プライマー(配列表の配列番号13に記載)との組み合わせを用い、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としたTAIL-PCRを行った。増幅したDNA断片のDNA塩基配列を解読し、解読した塩基配列の情報をつなぎ合わせたところ、プライマー部分以外に新たな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。その結果、前記(1)で得られた715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の一部(139番目から238番目のアミノ酸)が認められた。このことから、得られたDNA塩基配列(配列表の配列番号14に記載)は、アミノペプチダーゼ遺伝子の3'下流部分であることが判明した。

【0014】また、同様に、3つのリバースプライマーのそれぞれ(配列表の配列番号10~12に記載)と混合プライマー(配列表の配列番号13に記載)との組合せを用いて、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としたTAIL-PCRを行った。増幅したDNA断片のDNA塩基配列を解読し、得られた塩基配列の情報をつなぎ合わせたところ、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列(配列表の配列番号15に記載)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、715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の一部(1番目から66番目のアミノ酸)が認められることから、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の5'上流

部分であることが判明した。

【0015】なお、本発明者らは、上記配列の解明に際してTAIL-PCRを用いたが、他の方法によることもできる。例えば、フラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムライブラリーから標識したプローブを用いてスクリーニングする方法が挙げられる。すなわち、フラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを適当な制限酵素で断片化した後、ファージベクターに組み込み、ゲノムライブラリーを作成する。続いて、このゲノムライブラリーの中から、天然酵素のアミノ酸配列を基に化学合成したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするクローンをスクリーニングすることによって、上記配列を得ることができる。

【0016】(3)請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の全塩基配列の決定

上記(1)及び(2)で得られたDNA塩基配列の情報から、最終的に、アミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子のDNA塩基配列を決定した(配列表の配列番号1に記載)。すなわち、これが請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子である。請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子は、全長2521bpからなり、497個のアミノ酸をコードする。

【0017】この配列、とりわけ構造遺伝子部分の塩基配列が正しいことを確認するため、以下の操作を行った。まず、上記(2)で得られた3'下流および5'上流のDNA塩基配列(配列表の配列番号14と15に記載)の情報を基に化学合成したフォワードプライマー(配列表の配列番号16に記載)とリバースプライマー(配列表の配列番号17に記載)とを用いて、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としたPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片の塩基配列を解読し、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子(配列表の配列番号1に記載)の190~2282番目が正しいことを再確認した。

【0018】請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子のうち、活性型酵素をコードする遺伝子の部分を特定するために、まず、前記(1)で解明した活性型酵素のN末端のアミノ酸配列(配列表の配列番号3参照)との比較を行った。その結果、請求項1記載の本発明のアミノ酸配列(配列表の配列番号1参照)のうち、1039番目以降の部分に活性型アミノペプチダーゼの遺伝子を有することが明らかとなった。

【0019】続いて、活性型アミノペプチダーゼの遺伝子のC末端側を特定した。その際、C末端側はホモロジー検索の結果から推定される部位とした。得られた塩基配列は、配列表の配列番号2に示す通りであり、全長912bpからなり、304個のアミノ酸をコードする。すなわち、これが請求項4記載の本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子である。

【0020】請求項4記載の本発明のアミノペプチダー

ゼ遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質の分子量は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定したところ、34,000 ダルトンであり、本遺伝子でコードされる蛋白の分子量 33,914 と良く一致していた。

【0021】なお、請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子および請求項4記載の本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子は、本発明者らが先に解明したアエロモナス属微生物由来のアミノペプチダーゼ（特開平8-173168号公報）とは全く異なる塩基配列を有するものである。本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子は、新規な塩基配列を有する遺伝子であり、National Center for Biotechnology Information のpsi-BLAST によるホモロジー検索の結果、平成11年2月9日現在、これと40%以上の相同性が認められる遺伝子は見当たらなかった。

【0022】(4) 酵素遺伝子の大腸菌における発現 請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子のプラスミドへのクローニングと発現を実施した。まず、プラスミド pQE60 を制限酵素により分解した。次に、この制限酵素切断プラスミドとDNAの塩基配列が合致するよう、請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体をコードする遺伝子のDNA塩基配列を基に作成したフォワードプライマー（配列表の配列番号18に記載）とリバースプライマー（配列表の配列番号19に記載）を用い、フラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としてPCR法により、アミノペプチダーゼ前駆体をコードするDNAを増幅した。

【0023】増幅されたDNA断片を制限酵素で分解し、これを先に精製した制限酵素分解したプラスミドと混合し、定法によりライゲーション反応を行い、プラスミド pFBAPNMC を調製した。これが請求項2記載の本発明のプラスミドである。この請求項2記載の本発明のプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌が請求項3記載の本発明の形質転換された大腸菌である。この形質転換された大腸菌は、工業技術院生命工学工業研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-17178である。

【0024】請求項3記載の形質転換された大腸菌から発現するタンパク質は、後述の実施例に示すように、アミノペプチダーゼ活性を示すことが明らかである。すなわち、請求項1記載の本発明の前駆体遺伝子から得られる前駆体アミノペプチダーゼが、該前駆体を活性型に変換する酵素によるプロセッシングを受けて活性型のアミノペプチダーゼとなること、また、請求項4記載の本発明の遺伝子がコードする活性型アミノペプチダーゼは、プロセッシングを受けることなく高いアミノペプチダーゼ活性を発現することが明らかとなった。

【0025】次に、請求項4記載の本発明のアミノペ

チダーゼ遺伝子のプラスミドへのクローニングと発現を実施した。まず、寄託した大腸菌（FERM P-17178）から得られるプラスミド pFBAPNMC を鋳型とし、二つのプライマー（配列表の配列番号20と21）を用いて、PCR法によりアミノペプチダーゼをコードするDNAを増幅した。なお、本発明者らは、上記PCRの鋳型にプラスミド pFBAPNMC を用いたが、フラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを用いることもできる。増幅されたDNA断片を制限酵素分解し、これを先述の前駆体の場合に用いたのと同様の制限酵素分解プラスミドと混合し、常法によりライゲーション反応を行ってプラスミド pFBAPM を調製した。得られたプラスミドが請求項5記載の本発明のプラスミドである。

【0026】このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換して得られる形質転換大腸菌が、請求項6記載の本発明の形質転換体である。この形質転換体からは、微量ではあるがアミノペプチダーゼ活性を有することが確認されている。

【0027】以上に説明したように、本発明は、フラボバクテリウム・ブレブT-382株由来のアミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子並びにそれらの大量発現系を提供するものである。アミノペプチダーゼは、調味液の製造等に活用される他、苦味を低減あるいは消滅する作用を有する。本発明により、このアミノペプチダーゼの遺伝情報が提供され、該酵素の大量生産に有用である。

【0028】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例1

(1) 部分塩基配列の決定

フラボバクテリウム・ブレブ (*Flavobacterium breve*) T-382株を栄養培地に培養したのち、菌体を除去して得られた培養上清から、イオン交換クロマトグラフィーを活用して高度に精製したアミノペプチダーゼを得た。この精製酵素を用いて、プロテインシーケンサー G1005A型（ヒューレットパッカード社製）により、そのN末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号3に記載）を決定した。

【0029】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、1箇所のフォワードプライマー（配列表の配列番号4に記載）を化学合成した。リバースプライマー（配列表の配列番号5に記載）は、N末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号3に記載）のホモロジー検索の結果から、データベースを活用してアミノ酸配列のアライメントを作成し、保存されているアミノ酸配列領域を見だし、そのアミノ酸配列領域の情報を基にして作成した。

【0030】フラボバクテリウム・ブレブT-382株

から、斉藤の方法(蛋白質核酸酵素, 第11巻、446頁)によりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、先の二つのプライマー(配列表の配列番号4と5)を用いてPCR反応により増幅させた。その結果、800bpの明瞭なバンドが得られた。

【0031】得られたバンドをクローニングし、dロードミン・ターミネーター・サイクルシークエンシング・キット(パーキンエルマー社製)を用いてDNA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て、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)が得られた。この715bp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N末端のアミノ酸配列(配列表の配列番号3に記載)の21番目以降の配列が認められることから、アミノペプチダーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【0032】(2)5'及び3'側未知領域の塩基配列の決定

次に、Genomics、25号、674頁、1995年に記載されたサマル・アシンメトリック・インターレースドPCR(TAIL-PCR)を実施するために、次のプライマーを用意した。上記(1)で得られた715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の情報をもとに、フォワードプライマー1(配列表の配列番号7に記載)、フォワードプライマー2(配列表の配列番号8に記載)、フォワードプライマー3(配列表の配列番号9に記載)、リバースプライマー1(配列表の配列番号10に記載)、リバースプライマー2(配列表の配列番号11に記載)、リバースプライマー3(配列表の配列番号12に記載)を化学合成した。また、未知領域に非特異的に結合する混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)を化学合成した。

【0033】先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型とし、化学合成したフォワードプライマー1(配列表の配列番号7に記載)と混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)とを用い、1回目のTAIL-PCRを行った。TAIL-PCRの温度条件は、97-1分間、98-1分間を1サイクル、98-30秒間、56-15秒間、72-30秒間を5サイクル、98-30秒間、30-3分間、30から72まで3分間で昇温、72-1分間を1サイクル、98-30秒間、58-15秒間、72-30秒間、98-30秒間、58-15秒間、72-30秒間、98-30秒間、38-15秒間、72-30秒間を15サイクル、72-5分間を1サイクルとした。

【0034】続いて、1回目のTAIL-PCR産物を鋳型とし、先に化学合成したフォワードプライマー2(配列表の配列番号8に記載)と混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)を用いて2回目のTAIL-PCRを行った。

【0035】さらに、2回目のTAIL-PCR産物を鋳型とし、先に化学合成したフォワードプライマー3(配列表の配列番号9に記載)と混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)を用い、3回目のTAIL-PCRを行い、増幅したDNA断片のDNA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て、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列(配列表の配列番号14に記載)が得られた。

【0036】このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、前記(1)で得られた715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の一部(139番目から238番目のアミノ酸配列)が認められた。このことから、得られたDNA塩基配列(配列表の配列番号14に記載)は、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の3'下流部分であることが判明した。

【0037】また、同様に、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型とし、先に化学合成したリバースプライマー1(配列表の配列番号10に記載)と混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)を用い、1回目のTAIL-PCRを行った。

【0038】続いて、1回目のTAIL-PCR産物を鋳型とし、先に化学合成したリバースプライマー2(配列表の配列番号11に記載)と混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)を用い、2回目のTAIL-PCRを行った。

【0039】さらに、2回目のTAIL-PCR産物を鋳型とし、先に化学合成したリバースプライマー3(配列表の配列番号12に記載)と混合プライマー1(配列表の配列番号13に記載)を用い、3回目のTAIL-PCRを行い、増幅したDNA断片のDNA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て、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列(配列表の配列番号15に記載)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715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の一部(1番目から64番目のアミノ酸)が認められることから、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の5'上流部分であることが判明した。

【0040】(3)アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の全塩基配列の決定

次に、TAIL-PCRにより明らかになったDNA塩基配列(配列表の配列番号14と15に記載)の情報と、先のアミノ酸配列情報を基に作成したプライマーから得られたDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の情報から、最終的に、アミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子のDNA塩基配列を決定した(配列表の配列番号1)。

【0041】この配列、とりわけ構造遺伝子部分の塩基配列が正しいことを確認するため、以下の操作を行っ

た。まず、フォワードプライマー4（配列表の配列番号16に記載）とリバースプライマー4（配列表の配列番号17に記載）を化学合成し、これらのプライマーを用いて、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としたPCRによりDNA断片を増幅した。そのDNA断片の塩基配列を解読したところ、決定したアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子のDNA塩基配列（配列表の配列番号1）のうちの、190番目～2282番目の部分の塩基配列が確認された。

【0042】一方、前記（1）でアミノペプチダーゼ活性型酵素のN末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号3参照）を解読しており、そのアミノ酸配列は配列番号1に示したアミノ酸配列中の113番目以降の配列と一致したことから、前駆体遺伝子の塩基配列中の1039番目以降に活性型アミノペプチダーゼ遺伝子を見いだした。

【0043】活性型酵素の遺伝子は、アミノペプチダーゼのN末端アミノ酸配列をもとに、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子から構成し、配列表の配列番号2に示した。その際、C末端側はホモロジー検索の結果から推定される領域とした。活性型酵素の分子量は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定したところ、34,000ダルトンであり、本遺伝子でコードされる蛋白の分子量33,914と良く一致していた。

【0044】（4）酵素遺伝子の大腸菌における発現次に、アミノペプチダーゼとその前駆体遺伝子のプラスミドへのクローニングと発現を実施した。まず、プラスミドpQE60を制限酵素Nco I とBam HIで分解した（A）。次に、この制限酵素切断プラスミド（A）とDNAの塩基配列が合致するよう、アミノペプチダーゼ前駆体をコードするDNA塩基配列を基に、フォワードプライマー5（配列表の配列番号18に記載）とリバースプライマー5（配列表の配列番号19に記載）を化学合成した。

【0045】フラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型とし、両プライマーを用いて、PCR法によりアミノペプチダーゼ前駆体をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNA断片を、制限酵素Nco I とBam HIで分解した（B）。制限酵素分解したプラスミド（A）と制限酵素分解したDNA断片（B）とを混合し、常法によりライゲーション反応を行い、プラスミドpFBAPNMCを調製した。得られたプラスミド

を用い大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌を液体培養し、これを遠心処理し上澄を得た（C）。一方、菌体を超音波破碎し、遠心により可溶性画分を得た（D）。

【0046】得られる上澄（C）と可溶性画分（D）には、アミノペプチダーゼ前駆体が含まれることから、前駆体を活性型に変換する酵素で上澄（C）と可溶性画分（D）を処理し、それらのアミノペプチダーゼ活性を測定した。すなわち、アミノペプチダーゼ前駆体にプロセッシング酵素を与えた後、20mMトリスバッファー（pH8.5）中で30、1時間反応させ、アミノペプチダーゼ前駆体を活性型に変換した。その結果、上澄（C）と可溶性画分（D）は、それぞれ50単位/mL、40単位/mLのアミノペプチダーゼ活性が得られた。

【0047】次に、プラスミドpFBAPNMCを鋳型とし、二つのプライマー（配列表の配列番号20と21）を用いてPCR法により、活性型アミノペプチダーゼをコードするDNAを増幅した。増幅されたDNA断片を、制限酵素Nco I とBam HIで分解した（E）。制限酵素分解DNA断片（E）と、先に調製した制限酵素分解プラスミド（A）とを混合し、常法によりライゲーション反応を行い、プラスミドpFBAPMを調製した。

【0048】得られたプラスミドを用い大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌を液体培養し、これを遠心処理し上澄を得た（F）。一方、菌体を超音波破碎し、遠心により可溶性画分を得た（G）。上澄（F）と可溶性画分（G）のアミノペプチダーゼ活性を測定したところ、それぞれ極微量（1単位/mL程度）の活性が得られた。また、大腸菌体内において発現した大半の酵素は封入体を形成した。

【0049】（5）まとめ

以上の実施例から、フラボバクテリウム・ブレブT-382株由来のアミノペプチダーゼ前駆体および活性型アミノペプチダーゼをクローニングし、形質転換した大腸菌からアミノペプチダーゼを得ることができた。

【0050】

【発明の効果】本発明によれば、アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子が提供される。これを発現させて得られるアミノペプチダーゼは、調味料の製造や脱苦味等に有用であることから、本発明の遺伝子は食品産業等の分野における活用が期待される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; Director of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

<;120>; Gene of aminopeptidase precursor, and vector containing said gene and transformat

<;130>; P111018K

<;160>; 24

```

<;210>; 1
<;211>; 2521
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 1
cgcaaaaatt taagaatgag aaagataaat cagaagattt gaagaaaata aaaccttcga 60
taatgtagtg caaccgactc gcaagaaac cataaatgct tttcatttga aaggaaaatg 120
gcgcgaaaag ttttcaaaa acgataatcc aattgttttg gaattgggtt gtggaaaagg 180
cgaatatact gttgcatagg cgcgtcgaga tgcccatcgt aattttatag gtgttgatat 240
aaaaggtgca cgattttggc gaggtgcaaa aactgccatc gaagaaggat tgaataatgt 300
tggttttata cgtacacaaa ttgaattgat tgatcatttg tttgaccaa acgagggtgga 360
cgaaatttgg attacttttc cagatccaca aatcaaatat agacgtacca aacaccgttt 420
gactcaccca gattttttga atcgatatgc taaaatttta aaaccagaag gaactgttaa 480
tttgaaaacc gattcagaat ttttcatagg ctatacacat ggtgttatac agcttttagg 540
tcacaaagtt ttgaaatcat cacatgacgt ttaccatcca gatcgtgctg atatacctgc 600
agttgtaact gaggtgcaaa ctttttacga atcaaaatit ttacaagaaa ataaaaaat 660
tacgtacatt agtttttcat taacacctta aaaatcaaga aa atg ctt ctg aac 714
                                     Met Leu Leu Asn
                                     1
aaa att tta cta ctt tca ctt tct cta tta aat gtt ggt ctc ttt gca 762
Lys Ile Leu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Leu Asn Val Gly Leu Phe Ala
   5                10                15                20
caa cat tcg cac aaa cta cca aaa gat act ccc aaa agt tac ttt tat 810
Gln His Ser His Lys Leu Pro Lys Asp Thr Pro Lys Ser Tyr Phe Tyr
                25                30                35
gca acg atg aat gct gat cag gcc gat aaa tta aag gtt tta cat ccc 858
Ala Thr Met Asn Ala Asp Gln Ala Asp Lys Leu Lys Val Leu His Pro
                40                45                50
aat gat gtt aaa att tta gcc atc aac aaa aat gaa gct gta gtc aac 906
Asn Asp Val Lys Ile Leu Ala Ile Asn Lys Asn Glu Ala Val Val Asn
                55                60                65
atg agc aat tat gct gct gca gat tta cat caa ttt gta ttg tcg cat 954
Met Ser Asn Tyr Ala Ala Ala Asp Leu His Gln Phe Val Leu Ser His
                70                75                80
ggt cca ggt ttt ata ctt cat acg gat gaa aaa atc gct aaa aat tat 1002
Gly Pro Gly Phe Ile Leu His Thr Asp Glu Lys Ile Ala Lys Asn Tyr
                85                90                95                100
tta caa aga cca caa acc aaa act tca agt gtt ctt gat ttt aac att 1050
Leu Gln Arg Pro Gln Thr Lys Thr Ser Ser Val Leu Asp Phe Asn Ile
                105                110                115
agc gaa gat gaa att gta aaa gat tac atc aca caa gtt aaa gaa gga 1098
Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln Val Lys Glu Gly
                120                125                130
aat ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att cat aca cga ttt 1146
Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile His Thr Arg Phe
                135                140                145
cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac atc aaa aat ttg 1194
His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr Ile Lys Asn Leu
                150                155                160
tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat ttg aaa gtc gag 1242

```

Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp Leu Lys Val Glu
 165 170 175 180
 ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt att ttc acg atc 1290
 Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val Ile Phe Thr Ile
 185 190 195
 gaa ggc aac gaa gaa gca gat gaa tac atc att att ggc ggt cat gcc 1338
 Glu Gly Asn Glu Glu Ala Asp Glu Tyr Ile Ile Ile Gly Gly His Ala
 200 205 210
 gac agt att gtg agt tca tct tgg ggc gga aat tac gaa ttg cgt tca 1386
 Asp Ser Ile Val Ser Ser Ser Trp Gly Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Ser
 215 220 225
 cct gga gct gat gat aat gcg agt gga att gcc acc gtt aca gaa gcg 1434
 Pro Gly Ala Asp Asp Asn Ala Ser Gly Ile Ala Thr Val Thr Glu Ala
 230 235 240
 ttg aga ata ttg gta gaa aat agt ttt cgt ccc aaa aaa acc att cag 1482
 Leu Arg Ile Leu Val Glu Asn Ser Phe Arg Pro Lys Lys Thr Ile Gln
 245 250 255 260
 att atg gcc tat gca gcc gaa gaa gtt gga ttg gtg gga tct aat gaa 1530
 Ile Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Val Gly Ser Asn Glu
 265 270 275
 atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt atg gac gtc aaa gca tat gta 1578
 Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly Met Asp Val Lys Ala Tyr Val
 280 285 290
 caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt tct cca aat gat gtt tac atc 1626
 Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly Ser Pro Asn Asp Val Tyr Ile
 295 300 305
 act aca gat tca tac aat tca aat gac cta aat tta ttt ttg gtc gaa 1674
 Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp Leu Asn Leu Phe Leu Val Glu
 310 315 320
 tta atg gaa cat tac aat gct tct gga gat cat tct ttt act tat ggt 1722
 Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly Asp His Ser Phe Thr Tyr Gly
 325 330 335 340
 tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct gat cat gca tcg tgg gca aac 1770
 Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala Ser Trp Ala Asn
 345 350 355
 aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc gag tcg agt ttt aat gat agt 1818
 Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe Glu Ser Ser Phe Asn Asp Ser
 360 365 370
 aat cct aac att cac act agt aat gat acc tat tca aaa tca aat gaa 1866
 Asn Pro Asn Ile His Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Ser Lys Ser Asn Glu
 375 380 385
 agt agt gcg cat gcc gca aaa ttt gca aaa tta gca ctg caa ttt tta 1914
 Ser Ser Ala His Ala Ala Lys Phe Ala Lys Leu Ala Leu Gln Phe Leu
 390 395 400
 gta gaa gcg act aaa cca act gat gat tta ggt cta aat aac acc tca 1962
 Val Glu Ala Thr Lys Pro Thr Asp Asp Leu Gly Leu Asn Asn Thr Ser
 405 410 415 420
 aag agc aat tct aaa ata gtg gtg aat caa aaa aca tta aac tat ttt 2010
 Lys Ser Asn Ser Lys Ile Val Val Asn Gln Lys Thr Leu Asn Tyr Phe
 425 430 435


```

tta gaa agc tcg atg aat aat aac cga gtg aaa att atc aat cca aca 2058
Leu Glu Ser Ser Met Asn Asn Asn Arg Val Lys Ile Ile Asn Pro Thr
      440              445              450
ggt caa att gtt tat caa aac gat aaa ctt tca tca aat gga caa ctt 2106
Gly Gln Ile Val Tyr Gln Asn Asp Lys Leu Ser Ser Asn Gly Gln Leu
      455              460              465
aat tta aca caa tta acc aat ggc atg tat atc gtt gtt ttc gaa tcc 2154
Asn Leu Thr Gln Leu Thr Asn Gly Met Tyr Ile Val Val Phe Glu Ser
      470              475              480
gat aag ggt gaa aaa ttc act tca aaa ttc tta att cat taa acaacatat 2205
Asp Lys Gly Glu Lys Phe Thr Ser Lys Phe Leu Ile His Stop
485              490              495
actttaggac ataaaaaaaa gaggcataag cctctttttt tatatttata tccaatcaaa 2265
acttaattta aactctgcaa ataagcaatc caacctaaagg tttggtactc ttttgctgcc 2325
gttttgaaat ctaccgctct atataatcca cgaccgacaa tcataaaatc ggtatggtaa 2385
tttttgaata caatctctgg cgtattatat tgtgtcctt tgtgtccct gacaccgaaa 2445
tattaacacc tgggtgaaat aataacaatt tattaccac tttacgttgc gctacacacc 2505
cccaaacat taggtt 2521
<;210>; 2
<;211>; 912
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 2
gat ttt aac att agc gaa gat gaa att gta aaa gat tac atc aca caa 48
Asp Phe Asn Ile Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln
  1              5              10              15
ggt aaa gaa gga aat ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att 96
Val Lys Glu Gly Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile
      20              25              30
cat aca cga ttt cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac 144
His Thr Arg Phe His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr
      35              40              45
atc aaa aat ttg tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat 192
Ile Lys Asn Leu Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp
      50              55              60
ttg aaa gtc gag ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt 240
Leu Lys Val Glu Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val
      65              70              75              80
att ttc acg atc gaa ggc aac gaa gaa gca gat gaa tac atc att att 288
Ile Phe Thr Ile Glu Gly Asn Glu Glu Ala Asp Glu Tyr Ile Ile Ile
      85              90              95
ggc ggt cat gcc gac agt att gtg agt tca tct tgg ggc gga aat tac 336
Gly Gly His Ala Asp Ser Ile Val Ser Ser Ser Trp Gly Gly Asn Tyr
      100             105             110
gaa ttg cgt tca cct gga gct gat gat aat gcg agt gga att gcc acc 384
Glu Leu Arg Ser Pro Gly Ala Asp Asp Asn Ala Ser Gly Ile Ala Thr
      115             120             125
ggt aca gaa gcg ttg aga ata ttg gta gaa aat agt ttt cgt ccc aaa 432
Val Thr Glu Ala Leu Arg Ile Leu Val Glu Asn Ser Phe Arg Pro Lys
      130             135             140

```

aaa acc att cag att atg gcc tat gca gcc gaa gaa gtt gga ttg gtg 480
 Lys Thr Ile Gln Ile Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Val
 145 150 155 160
 gga tct aat gaa atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt atg gac gtc 528
 Gly Ser Asn Glu Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly Met Asp Val
 165 170 175
 aaa gca tat gta caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt tct cca aat 576
 Lys Ala Tyr Val Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly Ser Pro Asn
 180 185 190
 gat gtt tac atc act aca gat tca tac aat tca aat gac cta aat tta 624
 Asp Val Tyr Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp Leu Asn Leu
 195 200 205
 ttt ttg gtc gaa tta atg gaa cat tac aat gct tct gga gat cat tct 672
 Phe Leu Val Glu Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly Asp His Ser
 210 215 220
 ttt act tat ggt tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct gat cat gca 720
 Phe Thr Tyr Gly Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala
 225 230 235 240
 tcg tgg gca aac aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc gag tcg agt 768
 Ser Trp Ala Asn Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe Glu Ser Ser
 245 250 255
 ttt aat gat agt aat cct aac att cac act agt aat gat acc tat tca 816
 Phe Asn Asp Ser Asn Pro Asn Ile His Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Ser
 260 265 270
 aaa tca aat gaa agt agt gcg cat gcc gca aaa ttt gca aaa tta gca 864
 Lys Ser Asn Glu Ser Ser Ala His Ala Ala Lys Phe Ala Lys Leu Ala
 275 280 285
 ctg caa ttt tta gta gaa gcg act aaa cca act gat gat tta ggt cta 912
 Leu Gln Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Pro Thr Asp Asp Leu Gly Leu
 290 295 300
 <;210>; 3
 <;211>; 55
 <;212>; PRT
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 3
 Asp Phe Asn Ile Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln
 1 5 10 15
 Val Lys Glu Gly Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 20 25 30
 His Thr Arg Phe His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr
 35 40 45
 Ile Lys Asn Leu Trp Gln Ser
 50 55
 <;210>; 4
 <;211>; 35
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 4
 attgtaaaag attatattac acaagtnaar gargg 35

<;210>; 5
 <;211>; 35
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 5
 gtatcttggtg twgtatgaat ctttggrttr tartc 35
 <;210>; 6
 <;211>; 715
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 6
 a aat ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att cat aca cga 46
 Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile His Thr Arg
 1 5 10 15
 ttt cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac atc aaa aat 94
 Phe His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr Ile Lys Asn
 20 25 30
 ttg tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat ttg aaa gtc 142
 Leu Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp Leu Lys Val
 35 40 45
 gag ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt att ttc acg 190
 Glu Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val Ile Phe Thr
 50 55 60
 atc gaa ggc aac gaa gaa gca gat gaa tac atc att att ggc ggt cat 238
 Ile Glu Gly Asn Glu Glu Ala Asp Glu Tyr Ile Ile Ile Gly Gly His
 65 70 75
 gcc gac agt att gtg agt tca tct tgg ggc gga aat tac gaa ttg cgt 286
 Ala Asp Ser Ile Val Ser Ser Ser Trp Gly Gly Asn Tyr Glu Leu Arg
 80 85 90 95
 tca cct gga gct gat gat aat gcg agt gga att gcc acc gtt aca gaa 334
 Ser Pro Gly Ala Asp Asp Asn Ala Ser Gly Ile Ala Thr Val Thr Glu
 100 105 110
 gcg ttg aga ata ttg gta gaa aat agt ttt cgt ccc aaa aaa acc att 382
 Ala Leu Arg Ile Leu Val Glu Asn Ser Phe Arg Pro Lys Lys Thr Ile
 115 120 125
 cag att atg gcc tat gca gcc gaa gaa gtt gga ttg gtg gga tct aat 430
 Gln Ile Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Val Gly Ser Asn
 130 135 140
 gaa atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt atg gac gtc aaa gca tat 478
 Glu Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly Met Asp Val Lys Ala Tyr
 145 150 155
 gta caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt tct cca aat gat gtt tac 526
 Val Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly Ser Pro Asn Asp Val Tyr
 160 165 170 175
 atc act aca gat tca tac aat tca aat gac cta aat tta ttt ttg gtc 574
 Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp Leu Asn Leu Phe Leu Val
 180 185 190
 gaa tta atg gaa cat tac aat gct tct gga gat cat tct ttt act tat 622
 Glu Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly Asp His Ser Phe Thr Tyr
 195 200 205

ggt tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct gat cat gca tcg tgg gca 670
 Gly Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala Ser Trp Ala
 210 215 220
 aac aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc gag tcg agt ttt aat 715
 Asn Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe Glu Ser Ser Phe Asn
 225 230 235
 <;210>; 7
 <;211>; 22
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 7
 aggcaacgaa gaagcagatg aa 22
 <;210>; 8
 <;211>; 21
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 8
 caccgttaca gaagcgttga g 21
 <;210>; 9
 <;211>; 21
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 9
 ctatgcagcc gaagaagtg g 21

 <;210>; 10
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 10
 atattctcaa cgcttctgta acg 23
 <;210>; 11
 <;211>; 22
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 11
 ttccactcgc attatcatca gc 22
 <;210>; 12
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Flabovacterium breve T-382
 <;400>; 12
 atgtattcat ctgcttcttc gtt 23
 <;210>; 13
 <;211>; 16
 <;212>; DNA
 <;213>; artificial Sequence
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; 5, 10

<;223>; Designed oligonucleotide based on random sequence.
 <;400>; 13
 agwcnagawn acwaaa 16
 <;210>; 14
 <;211>; 1010
 <;212>; DNA
 <;213>; *Flabovacterium breve* T-382
 <;400>; 14

a ttg gtg gga tct aat gaa atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt	46
Leu Val Gly Ser Asn Glu Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly	
1 5 10 15	
atg gac gtc aaa gca tat gta caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt	94
Met Asp Val Lys Ala Tyr Val Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly	
20 25 30	
tct cca aat gat gtt tac atc act aca gat tca tac aat tca aat gac	142
Ser Pro Asn Asp Val Tyr Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp	
35 40 45	
cta aat tta ttt ttg gtc gaa tta atg gaa cat tac aat gct tct gga	190
Leu Asn Leu Phe Leu Val Glu Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly	
50 55 60	
gat cat tct ttt act tat ggt tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct	238
Asp His Ser Phe Thr Tyr Gly Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser	
65 70 75	
gat cat gca tcg tgg gca aac aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc	286
Asp His Ala Ser Trp Ala Asn Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe	
80 85 90 95	
gag tcg agt ttt aat gat agt aat cct aac att cac act agt aat gat	334
Glu Ser Ser Phe Asn Asp Ser Asn Pro Asn Ile His Thr Ser Asn Asp	
100 105 110	
acc tat tca aaa tca aat gaa agt agt gcg cat gcc gca aaa ttt gca	382
Thr Tyr Ser Lys Ser Asn Glu Ser Ser Ala His Ala Ala Lys Phe Ala	
115 120 125	
aaa tta gca ctg caa ttt tta gta gaa gcg act aaa cca act gat gat	430
Lys Leu Ala Leu Gln Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Pro Thr Asp Asp	
130 135 140	
tta ggt cta aat aac acc tca aaa agc aat tct aaa ata gtg gtg aat	478
Leu Gly Leu Asn Asn Thr Ser Lys Ser Asn Ser Lys Ile Val Val Asn	
145 150 155	
caa aaa aca tta aac tat ttt tta gaa agc tcg atg aat aat aac cga	526
Gln Lys Thr Leu Asn Tyr Phe Leu Glu Ser Ser Met Asn Asn Asn Arg	
160 165 170 175	
gtg aaa att atc aat cca aca ggt caa att gtt tat caa aac gat aaa	574
Val Lys Ile Ile Asn Pro Thr Gly Gln Ile Val Tyr Gln Asn Asp Lys	
180 185 190	
ctt tca tca aat gga caa ctt aat tta aca caa tta acc aat ggc atg	622
Leu Ser Ser Asn Gly Gln Leu Asn Leu Thr Gln Leu Thr Asn Gly Met	
195 200 205	
tat atc gtt gtt ttc gaa tcc gat aag ggt gaa aaa ttc act tca aaa	670
Tyr Ile Val Val Phe Glu Ser Asp Lys Gly Glu Lys Phe Thr Ser Lys	
210 215 220	

ttc tta att cat taa acaacatata ctttaggaca taaaaaaaag aggcataagc c 726
 Phe Leu Ile His Stop
 225
 tcttttttta tatttatatc caatcaaac ttaatttaaa ctctgcaaat aagcaatcca 786
 acctaaggtt tggactctt ttgctgccgt ttgaaatct accgctctat ataatccacg 846
 accgacaatc ataaaatcgg tatggtaatt ttgaaataca atctctggcg tatttatattg 906
 ttgtcctttg ttgtccctga caccgaaata ttaacacctg gtgtaataa taacaattta 966
 ttaccactt tacgttgcgc tacacacccc caaacatta gggt 1010
 <;210>; 15
 <;211>; 1296
 <;212>; DNA
 <;213>; *Flabovacterium breve* T-382
 <;400>; 15
 cgcaaaaatt taagaatgag aaagataaat cagaagattt gaagaaaata aaaccttcca 60
 taatgtagtg caaccgactc gcgaagaaac cataaatgct tttcatttga aaggaaaaatg 120
 gcgcgaaaag tttttcaaaa acgataatcc aattgttttg gaattgggtt gtggaaaagg 180
 cgaatatact gttgccatgg cgcgctcgaga tgcccatcgt aattttatag gtgttgatat 240
 aaaagggtgca cgattttggc gaggtgcaaa aactgccatc gaagaaggat tgaataatgt 300
 tggttttata cgtacacaaa ttgaattgat tgatcatttg ttgaccaa acgagggtgga 360
 cgaaatttgg attacttttc cagatccaca aatcaaatit agacgtacca aacaccgttt 420
 gactcaccca gattttttga atcgatatgc taaaatttta aaaccagaag gaactgttaa 480
 ttgaaaacc gattcagaat ttttcatgg ctatacacat ggtgttatac agcttttagg 540
 tcacaaagtt ttgaaatcat cacatgacgt ttaccatcca gatcgtgctg atatacctgc 600
 agttgtaact gaggtgcaaa ctttttacga atcaaaaatt ttacaagaaa ataaaaaat 660
 tacgtacatt agtttttcat taacacctta aaaatcaaga aa atg ctt ctg aac 714
 Met Leu Leu Asn
 1
 aaa att tta cta ctt tca ctt tct cta tta aat gtt ggt ctc ttt gca 762
 Lys Ile Leu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Leu Asn Val Gly Leu Phe Ala
 5 10 15 20
 caa cat tcg cac aaa cta cca aaa gat act ccc aaa agt tac ttt tat 810
 Gln His Ser His Lys Leu Pro Lys Asp Thr Pro Lys Ser Tyr Phe Tyr
 25 30 35
 gca acg atg aat gct gat cag gcc gat aaa tta aag gtt tta cat ccc 858
 Ala Thr Met Asn Ala Asp Gln Ala Asp Lys Leu Lys Val Leu His Pro
 40 45 50
 aat gat gtt aaa att tta gcc atc aac aaa aat gaa gct gta gtc aac 906
 Asn Asp Val Lys Ile Leu Ala Ile Asn Lys Asn Glu Ala Val Val Asn
 55 60 65
 atg agc aat tat gct gct gca gat tta cat caa ttt gta ttg tcg cat 954
 Met Ser Asn Tyr Ala Ala Ala Asp Leu His Gln Phe Val Leu Ser His
 70 75 80
 ggt cca ggt ttt ata ctt cat acg gat gaa aaa atc gct aaa aat tat 1002
 Gly Pro Gly Phe Ile Leu His Thr Asp Glu Lys Ile Ala Lys Asn Tyr
 85 90 95 100
 tta caa aga cca caa acc aaa act tca agt gtt ctt gat ttt aac att 1050
 Leu Gln Arg Pro Gln Thr Lys Thr Ser Ser Val Leu Asp Phe Asn Ile
 105 110 115
 agc gaa gat gaa att gta aaa gat tac atc aca caa gtt aaa gaa gga 1098
 Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln Val Lys Glu Gly

```

          120          125          130
aac ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att cat aca cga ttt 1146
Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile His Thr Arg Phe
          135          140          145
cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac atc aaa aat ttg 1194
His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr Ile Lys Asn Leu
          150          155          160
tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat ttg aaa gtc gag 1242
Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp Leu Lys Val Glu
          165          170          175          180
ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt att ttc acg atc 1290
Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val Ile Phe Thr Ile
          185          190          195
gaa ggc 1296
Glu Gly
<;210>; 16
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 16
gttgtgaaa agcgcaatat ac 22
<;210>; 17
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 17
cttaggttg attgcttatt tg 22
<;210>; 18
<;211>; 31
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 18
atcaagacca tggctctgaa caaaattta c 31
cgccgcatg gcggcagaac agg 23
<;210>; 19
<;211>; 32
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 19
gtcctaaagg atccgttggt taatgaatta ag 32
<;210>; 20
<;211>; 31
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382
<;400>; 20
agtgttcca tggtaacat tagcgaagat g 31
<;210>; 21
<;211>; 34
<;212>; DNA
<;213>; Flabovacterium breve T-382

```

<400>; 21

gctcttgat ccgttttat agacctaat catc 34

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA05 BA14 BA80 CA03 DA06

EA04 GA11

4B050 CC03 CC06 DD02 LL02

4B065 AA26X AA27Y AB01 AC14

BA02 CA24 CA33 CA41

4H045 AA50 BA10 CA11 DA89 EA01

FA72 FA74 HA05