

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4825963号
(P4825963)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月22日(2011.9.22)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/24	(2006.01)	C 1 2 N 9/24	
C 1 2 P 19/44	(2006.01)	C 1 2 P 19/44	
C 1 2 R 1/01	(2006.01)	C 1 2 P 19/44	
		C 1 2 R 1:01	

請求項の数 1 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2001-249782 (P2001-249782)	(73) 特許権者	504145342
(22) 出願日	平成13年8月21日(2001.8.21)		国立大学法人九州大学
(65) 公開番号	特開2003-61663 (P2003-61663A)		福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
(43) 公開日	平成15年3月4日(2003.3.4)	(72) 発明者	伊東 信
審査請求日	平成20年8月20日(2008.8.20)		福岡県福岡市西区愛宕浜4-34-1
微生物の受託番号	IPOD FERM P-18416	(72) 発明者	末吉 紀行
			福岡県古賀市花見東5-12-12
		(72) 発明者	澄田 智美
			福岡県福岡市東区箱崎6-4-11-105
		審査官	白井 美香保

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物を用いたスフィンゴ糖脂質の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エキソ型ガングリオシド分解酵素産生菌Paenibacillus sp.TS12 F E R M P - 1 8 4 1 6 をGD1a、GD1b、GM1、GM2およびGM3から選ばれるガングリオシドと共培養してアジアロGM1、アジアロGM2、ラクトシルセラミドおよびグルコシルセラミドから選ばれるスフィンゴ糖脂質を得ることを特徴とするスフィンゴ糖脂質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

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

【0002】

【従来の技術】

スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴシン塩基を含むセラミドを脂質部分として持つ糖脂質の総称で、なかでもガングリオシドはシアル酸を分子内に有するスフィンゴ糖脂質の一群につけられた名称である。ガングリオシドという名称は、神経節(ガングリオン)に由来しているが、実際に脳や神経系に豊富に存在している(Ledeer, R. W. (1989) Biosynthesis, metabolism, and biological effects of gangliosides, In Neurobiology of Glyc

onjugates ; Margolis, R. U. and R. K. Margolis, eds)。ガングリオシドは、成長因子受容体などの膜貫通型タンパク質の機能（多くはリン酸化）を調節することで細胞増殖を制御したり、神経系では軸索の伸長やシナプスの形成にも重要な機能を果たしていると考えられている。一方、ある種の病原菌や毒素の受容体としても注目されている。例えば、ある種のガングリオシドはインフルエンザウイルスのレセプターとして、また、GM1ガングリオシドはコレラ毒素の受容体として知られている。最近になって、ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質は、スフィンゴミエリンやコレステロールとともに細胞膜マイクロドメインを形成し、同じくマイクロドメインに集積するsrc-family キナーゼやGPI型タンパク質と相互作用することで細胞機能を調節している可能性が指摘されている。ガングリオシドは、分子内に十数個のシアル酸を有しており、骨格となる中性糖鎖の構造に基づいておよそ5つの系統に分類される。なかでも、Gal 1-3GalNAc 1-4Gal 1-4Glc 1-1'Cer (セラミド)という4糖を骨格に持つガングリオテトラオース系列は、神経系に比較的豊富に存在している。ガングリオテトラオース系列のうち、シアル酸を1個有するGM1 (モノシアロガングリオテトラオシルセラミド)はこれまで最もよく研究されてきたガングリオシドの1つで、現在までにアルツハイマー (Svennerholm, L., (1994) *Life Sci.* 55, 2125-2134) やパーキンソン病 (Schneider J. S., Roeltgen, D. P., Rothblat, D.S., Chapa s-Crilly, J., Seraydarian, L., and Rao, J., (1995) *Neurology* 45, 1149-1154)、脊髄損傷 (Geisler, F. H., Dorsey, F. C., and Coleman, W. P., (1991) *New England J. Med.* 324, 1829-1838)、脳卒中 (Argentino, C., Sacchetti, M. L., Toni, D., Savoini, G., D'Arcangelo, E., Erminio, G. A., Ponari, O., Rebucci, G., Senin, U., and Fieschi, C., (1989) *Stroke* 20, 1143-1149)、胎児アルコール障害 (Basalingappa, L. H., Donald, R. C., and Vinayak, G.S. (1994) *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18, 1248-1251) などの様々な神経疾患への臨床応用が試みられている。スフィンゴ糖脂質の調製は、それぞれのスフィンゴ脂質が豊富に含まれていると思われる動物組織から行われている。例えば、ガングリオテトラオース系ガングリオシドであるGT1a, GD1a, GD1b, GM1は、ウシ脳から単離される。GM2は、正常な脳組織には殆ど存在せず、Tay-Sachs病の患者脳から単離される。GM3は、ヒト赤血球から単離される。ラクトシルセラミド(LacCer)は、ウシやブタの臓器から単離される。グルコシルセラミド(GlcCer)は、Gaucher病患者の脾臓から単離される。セラミドは、ウシ脳から調製される。これらの天然物由来の標品以外に化学合成法によっても調製されているが、非常に高価である。従って、これらの各種ガングリオシドやスフィンゴ糖脂質を大量にしかも安価に調製する方法の開発が待たれている。

動物の生体内でのガングリオシドの分解は、リソソームに存在する種々の糖加水分解酵素によって段階的に進められる。つまり、糖鎖の非還元末端から順次単糖が外れ、最終的にはセラミドが生成する。このセラミドは、リソソームに存在する酸性セラミダーゼによってスフィンゴシン塩基と脂肪酸に代謝される。一方、自然界ではどのようにしてガングリオシドやスフィンゴ糖脂質が分解されているのは明らかでない。自然界では、これらの複合脂質の分解に微生物が関与していることは漠然と推測されているが、ガングリオシドやスフィンゴ糖脂質を単独で完全に分解できる微生物は知られていない。現在までに報告のあるガングリオシドあるいはスフィンゴ糖脂質に作用する微生物起源の酵素としては、非還元末端の 位のシアル酸に作用するシアリダーゼ (Sugano, K., Saito, M., and Nagai, Y., (1978) *FEBS Lett.* 89, 321-325)、スフィンゴ糖脂質のオリゴ糖鎖とセラミド間のグリコシド結合を加水分解するエンドグリコセラミダーゼ (EGCase) (Ito, M. and Yamagata, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14278-14282)、また、スフィンゴ糖脂質のセラミド内にあるスフィンゴシン塩基と脂肪酸との酸アミド結合を加水分解するグリコスフィンゴ脂質セラミドデアシラーゼ (Hirabayashi, Y., Kimura, Matsumoto, M., Yamamoto, K., Kadowaki, S., Tochikura, T. (1988) *J. Biochem. (Tokyo)* 103, 1-4) およびスフィンゴ糖脂質のみならずスフィンゴミエリンのセラミドの酸アミド結合も加水分解するスフィンゴ脂質セラミドN -デアシラーゼ (SCDase) (Ito, M., Kurita, T., and Kita, K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24370-24374) などがある。しかし、シアリダーゼを除いてガ

10

20

30

40

50

グリオシドを含むスフィンゴ糖脂質糖鎖の非還元末端に作用する微生物起源のエキソグリコシダーゼは未だ報告がない。

【0003】

グリコシダーゼは、その性質によってエキソ型とエンド型に分けられる。エキソ型酵素は、糖鎖の非還元末端の糖に作用し、単糖を遊離する。一方、エンド型酵素は、糖鎖の内部グリコシド結合に作用し、単糖ではなくオリゴ糖あるいはより大きな糖鎖を遊離する。一般に、微生物由来のエキソグリコシダーゼは、動物起源の酵素と比較すると糖鎖部分の構造に対する特異性が厳密である。この性質を利用して糖タンパク質やオリゴ糖鎖の構造解析に繁用されてきた。しかし、ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質糖鎖に作用する微生物由来のエキソ型グリコシダーゼは、シアリダーゼ以外には知られておらず、植物や動物臓器由来の酵素を使用することを余儀無くされてきた。安価で大量に調製可能な微生物起源のエキソ型グリコシダーゼの開発が待たれている。微生物由来のエキソグリコシダーゼは、糖鎖配列自動決定装置（糖鎖シーケンサー）の開発にも欠かせない。

また、エキソ型グリコシダーゼを動物や植物の培養細胞に作用させ、細胞表面の糖鎖をトリミングすることによって、細胞の増殖、分化、サイトカインや増殖因子との応答性の変化を調べ、糖鎖の機能を知ることにもできる。さらに、糖鎖をトリミングすることで積極的に細胞機能を変化させる細胞工学的な試みも可能であろう。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、ガングリオシドを分解する微生物について鋭意研究・検討した結果、ある種の微生物が単独でGD1a, GM1等のガングリオシドを完全に分解することを見出した。さらに検討を続けた結果、本菌は培地中にガングリオシドに作用する特異性の高いエキソ型グリコシダーゼを産生することを突き止めた。そこで、発現クローニング法を用いて、幾つかのエキソ型グリコシダーゼの遺伝子を取得し、この発明を完成した。

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、まず、この発明は、ガングリオシドを分解できる微生物の単離を試み、ガングリオシドを完全分解できる細菌Paenibacillus sp. TS12 F E R M P - 1 8 4 1 6を提供する。

次に、この発明は、Paenibacillus sp. TS12株のゲノムDNAライブラリーを作製し、蛍光基質4-メチルウンベリフェリル-グリコシド類（4MU-glycosides）を用いた発現クローニング法によって得られる各種グリコシダーゼ遺伝子を提供する。

さらに、この発明は、クローン化した遺伝子が大腸菌で大量発現させ、糖脂質の糖鎖に作

10

20

30

40

50

用する新規なエキソグリコシダーゼを提供する。

また、この発明は、ガングリオシド分解酵素生産菌であるPaenibacillus sp. TS12 F E R M P - 1 8 4 1 6 を粗ガングリオシドと共培養して、糖鎖トリミングによってスフィンゴ糖脂質を製造する方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

この発明を実施例によって更に詳細に説明する。

【実施例】

この発明を実施例により更に詳細に説明する。

実施例 1 : ガングリオシド分解菌TS12株の単離と同定および分解機序の検討

(ガングリオシド分解菌TS12株の単離)

10

福岡県福岡市東区箱崎の土壌から採集したサンプルを、モノシアロガングリオテトラオシルセラミド (GM1) を含む合成培地 (0.05% GM1, 0.05% NH₄Cl, 0.05% K₂HPO₄, 0.5% NaCl, 0.05% タウロデオキシコール酸ナトリウム, pH 7.2-7.4) 100 μ l 中に加え、30 °C で2日間培養した。その後、培養上清を20 μ l 乾燥させ、クロロホルム/メタノール (2 / 1、v/v) 5 μ l に溶解してTLCに負荷した。薄層クロマトグラフィー (TLC) はクロロホルム/メタノール/ 0.02% CaCl₂ (5 / 4 / 1, v/v) で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた。その結果、12番のサンプルに活性が見られた (図 1 (A)) 。

TS12株によるGM1の分解の時間変化をTLCを用いて調べた結果、GM1は、時間経過とともにアシアロGM1、アシアロGM2、ラクトシルセラミド(LacCer)、グルコシルセラミド(GlcCer)の順に分解された。この結果は、本菌がGM1に作用するエキソ型のシアリダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 α -ヘキソサミニダーゼを生産していることを示している (図 1 (B)) 。

20

次に、セラミドの脂肪酸の 1 位に蛍光でラベルされたNBD - GM1を用いてGlcCerから先に分解が進むかを調べた。その結果、TS12株はGlcCerに作用してグルコースを遊離し、セラミドを生成する α -グルコシダーゼも生産していることが分かった。また、TS12株は、GM1だけでなくGD1a, GD1b, GT1a等の複数のシアル酸を持つガングリオシド、GM2, GM3等の短鎖のガングリオシド、LacCerのような中性スフィンゴ糖脂質を分解してGlcCerを生成した。しかし、スルファチドやグロボシドは分解しなかった。

【 0 0 0 9 】

(ガングリオシド分解菌TS12株の同定)

30

単離した菌株TS12株の同定は、基本的にはBergey's Manual (第8版) (Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., (1974)) に基づいて行った。培養温度は30 °Cで行った。運動性、グラム染色の判定は光学顕微鏡観察で行った。オキシダーゼテストはKovacsらの方法 (Kovacs, N. (1956) Nature , 178, 703) を用い、グルコースの利用 (O-Fテスト) はHughとLeifsonの方法 (Hugh, R., and Leifson, E. (1953) J. Bacteriol. 66, 24-26) を用いた。16S rDNA解析は平石の方法 (Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology Vol. 10, No. 2, 81-102, (1995)) に従った。

その結果、TS12株は、運動性のある短桿菌で、電子顕微鏡観察の結果、周毛を有していた。また、TS12株は、グラム染色陰性、カタラーゼ陰性、オキシダーゼ陽性、GC含量49%であった (表 1) 。さらに、16S rDNAによる解析を行った結果、本菌は、Paenibacillus属の一種であると同定された。本菌はF E R Mに P - 1 8 4 1 6 として寄託している。

40

【 0 0 1 0 】

表1：各種生理生化学的試験

形態	短桿菌	
運動性	+	
グラム染色	-	
カタラーゼ	+	
オキシダーゼ	-	
0% NaCl 中での生育	+	10
0.5% NaCl 中での生育	+	
3% NaCl 中での生育	+	
5% NaCl 中での生育	-	
7% NaCl 中での生育	-	
コロニーの色	乳白色	
OFテスト	-	
GC含量	49%	20

【0011】

(TS12株によるGM1の分解)

TS12株を、前述のGM1合成培地250 μ lに植菌し、30℃で54時間培養し、6時間ごとに培地中のGM1の分解をTLCにて確認したところ、分解は時間経過とともに進行し、最終的にGM1はGlcCerに変換された。なお、TLCは、クロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v)で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた。発色させた糖脂質の吸光度(540 nm)をデンストメータ(SHIMADZU CS-9300 PC)で定量した結果、時間経過とともに培地中のGM1は減少してアジアロGM1(AsGM1)が増加し、さらにLacCerに変換され、最終的にGM1はGlcCerに変換された(図2)。

以上の結果から、TS12株は、GM1に作用するエキソ型のシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼを生産していることが明らかとなった。

【0012】

(TS12株によるNBD-GM1の分解)

オルシノール硫酸法は、糖鎖の検出試薬であるため、糖脂質は検出できるが、セラミドは検出できない。そこで、セラミドの脂肪酸部位が蛍光標識されているNBD-GM1を用いてGlcCerからさらにセラミドにまで分解が進むかどうかを調べた。TS12株をNBD-GM1を250 pmol含む合成培地50 μ lに植菌し、30℃で3日間培養した上清を20 μ l回収し、TLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v)で展開し、トランスイルミネーターで紫外線照射し、NBD-GM1の分解を調べた。その結果、NBD-GM1はセラミドにまで分解されることが判明した(図3)。

以上の結果から、TS12株はGlcCerに作用する β -グルコシダーゼも生産していることが分かった。また、NBD-GM1の分解の様子から、本菌は、ガングリオシド糖鎖の非還元末端の糖を順に遊離し、資化していることが推測された。

【0013】

(TS12株による各種スフィンゴ糖脂質の分解)

TS12株を、ガングリオシドを含む各種スフィンゴ糖脂質(GQ1b, GT1b, GD1a, GD1b, GM1, GM2, GM3, LacCer, グロボシド, スルファチド)1 μ gを含む合成培地20 μ lに植菌し、30℃で3日間培養し、全量を乾燥し、TLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/0.02% CaCl₂ (5/4/1, v/v)で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた

。上述のようにして、TS12株を各種スフィンゴ糖脂質とともに培養してそれぞれの分解をしらべた。その結果、TS12株は各種gangliosideおよびLacCerを分解してGlcCerに変換したが、GlycoCer、SulfoCerは分解しなかった。また、LacCerの分解速度はgangliosideに比べて遅いことが判明した。

以上の結果から、Paenibacillus属の細菌であると同定されたTS12株は、単独で各種gangliosideを分解することが明らかになった。また、本菌が自然界においてgangliosideを分解・資化していることが示唆された。

【 0 0 1 4 】

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

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

【 0 0 1 5 】

(蛍光基質の検討)

発現クローニングを行う前に、TS12株の生産する各種グリコシダーゼが蛍光基質である 4 - メチルウンベリフェリル - グリコシド類 (4MU - glycosides) に作用するか調べた。その結果、TS12株のコロニーは4MU - グリコシド類と反応して蛍光を発することが確認された。これは、基質である4MU - グリコシド類がコロニー (細胞) 中に取り込まれ、分解を受けて4MUの蛍光を発しているものと考えられる。

具体的には、TS12株をLB平板培地にスプレッダーで播き、30 ℃ で2日間培養した。生えてきたコロニーを2 cm四方のバイオダイナに写し取り、20 μ l の4MU - シアル酸 (4MU - NeuAc) 溶液 (0.3 mM 4MU - シアル酸, 10 mM 酢酸バッファー, pH 4.0)、4 - MU - D - ガラクトシド (4MU - Gal) 溶液 (0.3 mM 4MU - Gal, 10 mM 酢酸バッファー, pH 4.0)、4 - MU - D - N - アセチルガラクトサミン (4MU - GalNAc) 溶液 (0.3 mM 4MU - GalNAc, 10 mM 酢酸バッファー, pH 4.0)、4 - MU - D - グルコシド (4MU - Glc) 溶液 (0.3 mM 4MU - Glc, 10 mM 酢酸バッファー, pH 4.0) のそれぞれに浸した。これを37 ℃ で30分間反応させ、紫外線照射により活性を確認した。

【 0 0 1 6 】

(発現クローニングの方法)

TS12株のゲノムDNAをSau3AIで限定分解し、pBluscriptII SKベクターのBamHIサイトに組み込んでゲノムライブラリーを作製した。続いて、作製したゲノムライブラリーを大腸菌DH5 にトランスフェクトし、各種4MU - glycosidesと反応させ、宿主にはないグリコシダーゼを新たに生産するコロニーをスクリーニングした。

具体的には、TS12株を300 mlのPY培地で30 ℃、3日間振とう培養し、8,000 rpmで5分間遠心し、菌体を回収した。集めた菌体を4 mlのTE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に懸濁し、4 mgのリゾチームを加え37 ℃ で10分間インキュベートした。さらに1 mlの10% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) を加え、菌体を溶菌させた後に750 μ l の5 M NaClを加えた。5 mlの平衡化フェノールを加え、よく転倒飽和した後に5,000 rpmで10分間遠心して水層とフェノール層に分離し、水層を回収した。タンパク質の中間層がなくなるまでこの操作を繰り返し行った。次に等量のクロロホルムを加え転倒混和し、5,000 rpmで10分間遠心して、水層とクロロホルム層に分離し、水層を回収した。得られた水層に等量のイソプロピルアルコールを加えてDNAを沈澱させ、このDNAを70%エタノールで洗浄した後にTE buffer 4 mlに溶解した。このDNA溶液にRNase (20 mg / ml) を10 μ l加え、50 ℃ で1時間インキュベートしてRNAを分解した。さらに5 M NaClを100 μ l、10% SDSを200 μ l、Proteinase K (20 mg / ml) を25 μ lを加えて37 ℃ で1時間インキュベートし、残りのタンパク質を分解した。

続いて、上記と同様の方法でフェノール処理、クロロホルム処理、イソプロピルアルコー

10

20

30

40

50

ル沈澱を行い、70%エタノールで洗浄したものを2 mlのTE bufferに溶かし、分光光度計 (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) にて定量した。50 μ gのゲノムDNAをSau3AIで限定分解し、約2k-8 kbpの部分を4フラクションに切り出し、それぞれをSephaglas BandPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてゲルより抽出した。これをpBluscriptII SKベクターのBamHIサイトにLigation Pack (日本ジーン) を用いて組み込んだ。反応溶液をエタノール沈澱し、10 μ lの滅菌水に溶かし、ゲノムDNAライブラリーとした。

【0017】

(-N-アセチルヘキソサミニダーゼ遺伝子の単離)

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

【0018】

以下、方法を具体的に記載する。4MU-GalNAc と反応して蛍光を発する1クローン(Hex36)からプラスミド(pHex36)を抽出し、インサートを解析した結果、このプラスミドには -ヘキソサミニダーゼ遺伝子が含まれているものの、その全長は含まれておらず、C末部分が欠如していることが分かった。そこで、下線部をプローブとして、ヘキソサミニダーゼのC末断片をサザンブロッティング、コロニーハイブリダイゼーションで取得し、Hex36の3'部分と入れ替えて全長の入ったクローンHex36Tを取得した。Hex36Tの取得は、次のような方法で行った。TS12株のゲノムDNA 500 ngを各種制限酵素で消化し、0.7%のアガロースゲルで泳動した。DNAをアガロースゲルからナイロンメンブレン(Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) に写し取った。このメンブレンを80℃で2時間乾燥させ、三方をシールしたハイブリバックにいれた。ここにハイブリダイゼーション溶液(1 mM EDTAと7% SDSを含む0.5 M チャーチリン酸バッファー(pH 7.0))を加え、ポリシーラーで閉じ、1時間プレハイを行った。プローブはReady-To-Go DNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して[γ -³²P] dCTPでラベルし、ハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション溶液中で65℃、16時間行った。ハイブリダイゼーションさせた後、メンブレンは1% SDSを含む40 mMチャーチリン酸バッファー(pH 7.0)で3回洗浄し、imaging plateに曝した。20分後にBAS1500 imaging analyzer (FujiFilm) にて解析した。サザンブロッティングを行った結果、HindIIIで消化した約1.5 kbpのフラグメントに -ヘキソサミニダーゼのC末部分が含まれていると予想されたので、このフラグメントを取得するために、TS12株のゲノムDNA 5 μ gをHindIIIで消化して、0.7%のアガロースゲルで泳動した。約1.5 kbpのフラグメントを切り出し、ゲルから抽出した。これをpBluscriptII SKベクターのHindIIIサイトにLigation Packを用いて組み込んだ。反応溶液をエタノール沈澱し、DH5 α に導入し、ヘキソサミニダーゼのC末断片の遺伝子を含むゲノムライブラリーを作製して、³²Pでラベルしたプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った(参考文献: 実験医学 17(2), 172-174, 17(3), 517-514 1999)。

【0019】

(TS12株の -ヘキソサミニダーゼの基質特異性)

GM2 (1 μ g GM2, 0.1% TDC) 10 μ l とHex36Tのライセート10 μ l を37℃で16時間反応させた。反応溶液には終濃度0.05%のTDCを加えた。反応させたサンプルを乾燥させ、クロロホ

10

20

30

40

50

ホルム/メタノール (2 / 1) 5 μ l に溶解してTLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/ 0.02% CaCl₂ (5 / 4 / 1, v / v) で展開し、糖脂質はオルシノール硫酸で発色させた。TS12株の α -N-アセチルヘキソサミニダーゼ 3 6 (Hex36) は、AsGM2には作用したが、GM2には作用しなかった。Bacillus属のAT173-1株も α -N-アセチルガラクトサミニダーゼを生産することが報告されているが (Tanaka, A and Ozaki, S. (1997) J. Biochem. , 122, 330-336)、AT173-1株の生産する α -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、オリゴ糖末端のGalNAcには作用するが、糖脂質の末端GalNAcには作用しない。よって、この発明に係る α -ヘキソサミニダーゼは、糖脂質に作用することが示されたので、新規の α -ヘキソサミニダーゼであるといえる。

【 0 0 2 0 】

(α -グルコシダーゼの発現クローニング)

さらに、4MU- β -Glcを用いて、 α -N-アセチルヘキソサミニダーゼと同様な方法で発現クローニングを行った結果、約3,000個のコロニーから、3個の4MUの蛍光を発するコロニーが得られた。これら3個のpositiveクローン (クローンGlc8, クローンGlc4, クローンGlc28) の細胞抽出液を4MU- β -Glcとエッペンチューブ中で反応させたところ、分解が確認されたので、これら3クローンは α -グルコシダーゼを生産していることが分かった。

それぞれのクローンが持っていたプラスミドpGlc8, pGlc4, pGlc28のインサートを解析した結果、glc8(配列番号 3、4)は4,098 bpからなり、1,366アミノ酸をコードし、推定分子量145,254、推定pIは4.64だった。glc4(配列番号 1、2)は、2,493 bpからなり、831アミノ酸をコードし、推定分子量90,706、推定pIは5.34だった。glc28(配列番号 5、6)は、1,713 bpからなり、571アミノ酸をコードし、推定分子量63,628、推定pIは5.09だった。得られた3クローンの配列は、相互に一致しなかったため、それぞれ異なる α -グルコシダーゼをコードしていることが明らかとなった。

【 0 0 2 1 】

(α -グルコシダーゼの基質特異性)

NBD-GlcCer溶液 (100 pmol NBD-GlcCer, 0.1% TDC) 10 μ l と α -グルコシダーゼ遺伝子で形質転換した大腸菌の細胞抽出液10 μ l を37 $^{\circ}$ Cで16時間反応させた。反応させたサンプルを乾燥させ、クロロホルム/メタノール (2 / 1, v/v) 5 μ l に溶解してTLCに負荷した。TLCはクロロホルム/メタノール/ 0.02% CaCl₂ (5 / 4 / 1, v / v) で展開し、分解の様子を紫外線照射で確認した。

その結果、グルコシダーゼ4(Glc4)はNBD-GlcCerに作用してグルコースを遊離し、Cerを生成したが、グルコシダーゼ8(Glc8), グルコシダーゼ28(Glc28)はNBD-GlcCerには作用しないことが判明した。

【 0 0 2 2 】

(DNAシーケンスとその解析)

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

【 0 0 2 3 】

【 発明の効果 】

この発明で以下のような効果が期待される。

微生物起源の特異性の厳格なエキソ型グリコシダーゼを用いることによって糖鎖シーケンサーの開発。

TS12株を用いたGlcCerの製造。

シアリダーゼ阻害剤等を併用して、GM2, GM3 等の短鎖ガングリオシドの製造セラミドの製造。

高度に精製した酵素を用いて細胞表面糖鎖のトリミング法の開発。

10

20

30

40

50

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

【 0 0 2 4 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<100> UIP Co., Ltd.

<120> Process for the production of gangliosides by using a microorganism 10

<130> P0446T

<160> 8

<210> 1 20

<211> 2496

<212> DNA

<213> Paenibacillus sp.

<400> 1

```

gtggcgcaac tcacgcttga agaaaaagcc ggccctctgtt cgggggaaag cttttggagg 60
accaaagcaa ttgatcgtct ggggattccg tccatcatga tgacagacgg acccaccggc 120
ttgcgcaagc aagcggggga agcggaccat ctgggactga acgagagcat tccggcaacg 180
tgctttccga ccgccgccgg gcttgcgagc tccctgggacc gcgaactggt gcgaaaggta 240
ggagaagcgc tgggaaagga aagccaggca gagaacgtct ccatcctgct gggacctggc 300
gcgaatatta aacgttcgcc actgtgcggg aggaacttcg agtatttctc ggaagatccg 360
tatctgacgg gcgagttggc cgcggcgcac attgccaggcg ttcaaagcca ggggtgcggc 420
acgtcgciga agcatttcgc tgtcaacaac caggagcacc gccggatgac gaccgatgct 480
gtggtggacg aacggacgct gcgcgaaatt tatttgaccg gcttcgagat tgccgtgaag 540
aaatcgcagc catggacggt catgtcggcg tacaaccgga tgaacggaac ctactgctcc 600
gaaaacgaaa cgttgcigac ccgattctg aaggaggaat ggggccacga gggcatcgtc 660
glatcggact ggggcgccgt caacgaagcg gcctcgagcg tggcggccgg catggagctg 720
gagatgccgt ccagccaatgg catcggccaa aggaaaatcg tggcggcggg ggaaagcgga 780

```

30

40

gaactgtccg tcgaggcgct ggatcgggca gtgacgcggc ttttgactgt gattttcaaa 840
 gctgtcgaca gccggaagac ggacgccact tacgacaagg aagcgcatac ctacttggc 900
 cgcgaaatcg cccgcgaatc gatgggtgtg ctcaaaaatg aaggcaatct gctcccgtcg 960
 gcaaagacgg gcaaactggc gatcatcgga gccatggctg agcaggttcg ataccaaggi 1020
 ggcggaagct cccacatcaa gccgacaaaag ctggatagca tcaggacga gatcgaaaaa 1080
 tcggccagaa gtgcggaaat ccgttattcg aaagggtatc ttctcgaaag cgacgagagc 1140
 gacgagtctt tgcigaacga ggcgaaagca gccgcagctg actctgatgt cgcgggtgtg 1200
 ttctcgggc tgcggaccg ttacgaatcg gaaggctacg atcggacgca tctgaatttg 1260
 ccggctaac acatcgaact gatcgagcgg atcgcatacg ttcagccgaa cgtcgttgg 1320
 atcttgagca acggttctcc cgtcgttatg ccgtggctgg gtcattcgaa gcccggtgtc 1380
 gaagcttacc tggcggttca ggctgcgggc ggagcgcacg ccgacctgtt gttcggcgac 1440
 gccaatccga gcggcaagct ggcgagacg ttcccgcata gccitgaagca caatccgtcc 1500
 catcttttt atcttggcga gggcgcacgg acggaatacc gggaaaggcat ttttgtcgg 1560
 tatcgtatt tcgacgcgaa ggatatagag ccgctgttcc cgttcggaca cggcttaagc 1620
 tatacggcgt ttctctatt cggattgaag ctggacaaaa gcgagatgac agaccgggac 1680
 atcgtgcaag tccgcgtcaa cgtgaagaac accggggggc ggcttcggca gaaaccgtt 1740
 cagctttacg tccacagtcg gaattccagc gtcattcgtc cggaaaaaga gctgaaaggc 1800
 ttgctgaagg tctcgttaaa cccggaggaa gaacagacgg ttacgttcgc gcttgataaa 1860
 cgaagcttgg cctattacaa cgcggaattg aaagagtggc atcctgaaac gggcgaatat 1920
 gaaatatiga tcggcagctc ttccgcgat atcgccttc ggacggcatt gacggctccag 1980
 tccacgaccg aaatcgtccc aacatticat cggaaatcga cactcggaga gctgatggaa 2040
 aatccggcaa cgtcccgat tcttgcgcac ttgcagagca tggcggcga acagcaggcg 2100
 caatcggact cggigtccc agacatgatg atggcgaiga tgcgatacat gccctgtgc 2160
 gcctgtctc ctttaccgg cggcgcgatg acggaagaga cgttggcat gttgtggag 2220
 cagtttaac aggccgttcg cggcgaaaag aatcaaccic atgcaagcga gggaaagtct 2280
 gcggcttta acgaatactc gacgctgggc gacctcttgg ctacgaagc agctgttgc 2340
 gtattagaaa agcatctccc cggcataatc acgaatccga tgatcagcat ggggaaagga 2400
 ctactctca agcaactggc cggcattccg caagcgaata taccgagga gttaatctct 2460
 acaattigga ccgacttgag tgtatcaga ggataa 2496

10

20

30

40

Thr Leu Arg Glu Ile Tyr Leu Thr Gly Phe Glu Ile Ala Val Lys		
170	175	180
Lys Ser Gln Pro Trp Thr Val Met Ser Ala Tyr Asn Arg Met Asn		
185	190	195
Gly Thr Tyr Cys Ser Glu Asn Glu Thr Leu Leu Thr Arg Ile Leu		
200	205	210
Lys Glu Glu Trp Gly His Glu Gly Ile Val Val Ser Asp Trp Gly		10
215	220	225
Ala Val Asn Glu Ala Ala Ala Ser Val Ala Ala Gly Met Glu Leu		
230	235	240
Glu Met Pro Ser Ser His Gly Ile Gly Gln Arg Lys Ile Val Ala		
245	250	255
Ala Val Glu Ser Gly Glu Leu Ser Val Glu Ala Leu Asp Arg Ala		20
260	265	270
Val Thr Arg Leu Leu Thr Val Ile Phe Lys Ala Val Asp Ser Arg		
275	280	285
Lys Thr Asp Ala Thr Tyr Asp Lys Glu Ala His His Leu Leu Ala		
290	295	300
Arg Glu Ile Ala Arg Glu Ser Met Val Leu Leu Lys Asn Glu Gly		
305	310	315
Asn Leu Leu Pro Leu Ala Lys Thr Gly Lys Leu Ala Ile Ile Gly		30
320	325	330
Ala Met Ala Glu Gln Val Arg Tyr Gln Gly Gly Gly Ser Ser His		
335	340	345
Ile Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ser Ile Arg Asp Glu Ile Glu Lys		
350	355	360
Ser Ala Arg Ser Ala Glu Ile Arg Tyr Ser Lys Gly Tyr Leu Leu		40
365	370	375
Glu Ser Asp Glu Ser Asp Glu Ser Leu Leu Asn Glu Ala Lys Gln		

380	385	390	
Ala Ala Ala Asp Ser Asp Val Ala Val Leu Phe Val Gly Leu Pro			
395	400	405	
Asp Arg Tyr Glu Ser Glu Gly Tyr Asp Arg Thr His Leu Asn Leu			
410	415	420	
Pro Ala Asn His Ile Glu Leu Ile Glu Arg Ile Ala Ser Val Gln			
425	430	435	10
Pro Asn Val Val Val Ile Leu Ser Asn Gly Ser Pro Val Val Met			
440	445	450	
Pro Trp Leu Gly His Ala Lys Ala Val Leu Glu Ala Tyr Leu Gly			
455	460	465	
Gly Gln Ala Ala Gly Gly Ala Ile Ala Asp Leu Leu Phe Gly Asp			
470	475	480	
Ala Asn Pro Ser Gly Lys Leu Ala Glu Thr Phe Pro His Ser Leu			20
485	490	495	
Lys His Asn Pro Ser His Pro Phe Tyr Pro Gly Glu Gly Asp Arg			
500	505	510	
Thr Glu Tyr Arg Glu Gly Ile Phe Val Gly Tyr Arg Tyr Phe Asp			
515	520	525	
Ala Lys Asp Ile Glu Pro Leu Phe Pro Phe Gly His Gly Leu Ser			
530	535	540	30
Tyr Thr Ala Phe Ser Tyr Ser Gly Leu Lys Leu Asp Lys Ser Glu			
545	550	555	
Met Thr Asp Arg Asp Ile Val Gln Val Arg Val Asn Val Lys Asn			
560	565	570	
Thr Gly Gly Arg Phe Gly Lys Glu Thr Val Gln Leu Tyr Val His			
575	580	585	
Ser Arg Asn Ser Ser Val Ile Arg Pro Glu Lys Glu Leu Lys Gly			40
590	600	600	

Phe Ala Lys Val Ser Leu Asn Pro Glu Glu Glu Gln Thr Val Thr		
605	610	615
Phe Ala Leu Asp Lys Arg Ser Phe Ala Tyr Tyr Asn Ala Glu Leu		
620	625	630
Lys Glu Trp His Ala Glu Thr Gly Glu Tyr Glu Ile Leu Ile Gly		
635	640	645
Ser Ser Ser Arg Asp Ile Ala Leu Arg Thr Ala Leu Thr Val Gln		10
650	655	660
Ser Thr Thr Glu Ile Val Pro Thr Phe His Arg Asn Thr Thr Leu		
665	670	675
Gly Glu Leu Met Glu Asn Pro Ala Thr Leu Pro Ile Leu Ala His		
680	685	690
Leu Gln Ser Met Ala Pro Gln Gln Gln Ala Gln Ser Asp Ser Val		20
695	700	705
Ser Pro Asp Met Met Met Ala Met Met Arg Tyr Met Pro Leu Arg		
710	715	720
Ala Leu Leu Pro Phe Thr Gly Gly Ala Met Thr Glu Glu Thr Leu		
725	730	735
Gly Met Leu Leu Glu Gln Phe Asn Gln Ala Val Arg Gly Glu Lys		
740	745	750
Asn Gln Pro His Ala Ser Glu Gly Ser Ser Ala Ala Phe Asn Glu		30
755	760	765
Tyr Ser Thr Leu Gly Asp Leu Leu Ala His Glu Ala Ala Val Ala		
770	775	780
Val Leu Glu Lys His Leu Pro Gly Ile Ser Thr Asn Pro Met Ile		
785	790	795
Ser Met Gly Lys Gly Leu Thr Leu Lys Gln Leu Ala Gly Ile Pro		40
800	805	810
Gln Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Ile Ser Thr Ile Val Thr Asp		

815
 Leu Ser Val Val Arg Gly
 830

820

825

<210> 3

<211> 4101

<212> DNA

<213> Paramecium sp.

10

<400> 3

atgaggatag gccitgaatat atccittcag aaagcgttga gtgcggtatt ggittttaacg 60
 gtcgtgctag gacittggag cggttatcgt ccigtigtta gcgctgcggc cgctaatgaa 120
 ttacggtaa cctttgattc caatggatgc tcgataacgg caccagcagc ggatacggit 180
 aacgggaagc tagcttcgat tctcttctt gcaagggaa gttatacatt tgaaggatgg 240
 tatgaaagca agaatcctgc cattacagca acagccatta acagcaaacac cgtgttcacc 300
 aagaacacaa cagtataatgc catttggcaa gcggactatg ccaagctggc aacaaaatat 360
 aaggatcagg aagtaacatt atcctacgct cctctctcgg gagtcaagct gatcaaggaa 420
 gacgggaccg cattaaccaa agccgaaatt tcggcctatg accaatcctt tccgatcttt 480
 aaagatciga ataaaaacgg taaattggac ccttatgaag attggcggct gccctataaa 540
 gagcgtgctc tgaatttggc gtcgctgatg gccggcgcaa gcgataacgt cgaacaaatt 600
 gcgggactga tgcigtacag cgcccattat ggcgtaacat ccgccaatgcc gaccgatgcg 660
 cagaagcaat accicgacgc cgaccatttg cgccatgttc tggtcacgac aagctcgtcg 720
 ccggaaatga atgcgaaatg gaataataac gtacaagctt ttacggaaag cacctcatic 780
 ggcatctctg ccaataactc ttcggatccg cgccattcag ccaacacgac atccggagtg 840
 gaatactacg tggagaatgc gggcgtgtct gcatggccga cctcgtctggg gctagcggcg 900
 actittaatg tcgatacgat gaagcaattt ggtaaaatcg cctcgattga atatcgctcg 960
 ctiggcatat cgaccgcgct ttaccctcaa atcgatatig ctacggatcc tcgctggggc 1020
 cggittaacg gcacattcgg agaagacccc aagctcgcat ccgctatggc aagagcitat 1080
 gtagacggtt ttacagacgac ctatgcagac gggacgagca atacgccggt cgccggaggc 1140
 tggggcaatg acagcgtcaa tgcgatgatg aagcattggc cgggcggcgg cgccggagaa 1200

20

30

40

ggccggacggg atgcgcatta tgattacggc aagtatgccg tgtacccggg agataatttt 1260
 gaagcgcatt taattccgtt cgtagacggc tcctcagtc tateccgacgg tacgggaatg 1320
 gcaacggcag ttaigcccta ttacaccatt tcgtatatgc aaacgcctgg aagcgaacct 1380
 aacagctcca atcttccggg ggcaaagctg aatatggcga atgccataa tgattacaatg 1440
 atcaatggcg ttcigcgtga cgcttatcaa ttigaaggcg tcgtaacgac ggattggaac 1500
 gttatcggtc caaagactgc acccggcggc ggitttgaca gcgacattcc gggcatgatc 1560
 tgggggccgg acgaccatta cggattaacg ggatttacga tggacgatat ggccgtaaga 1620
 gcgcgccctgc tctctgatgc cgggtctgat caattcgggg gacttaacac gaatgcgcca 1680
 atcgtaaccg cttaacaaca cgcaacgggc gaagataagg agaggctgct ggcacagctt 1740
 caagttagcg cctatcggct tcctgatgaac gtcttcagaa cggggttatt cgaagatccg 1800
 tatctggacc cggctgagag caaagccacg gtcggccaag aagcgttcat ggcctccggc 1860
 tacaaagcgc agttggaatc gatggatttg ctaaaggata aaaacagcat ctgcccgtia 1920
 tcgaccaata aaaaggtata tgcgcccgga gcggatgcca ataccgttac ttigtctgaag 1980
 gcatacttcg gcagtgaaaa cgtaattacg gaagcagcca acgcaaatgc ggccgattat 2040
 gcgatigigt tcaitgaactc cgtctctgca ggccggcgggt caaggaatgc ttcgcagcat 2100
 atcaacagct atacgccgat taatctggac tttaaagctt ataccgcgac aaacgcgcgc 2160
 gaaacgagca ttgccggtta cccgctaaga gaaattccgg atgatttac ctctgcgggt 2220
 ataggaatgg agaatcgttc ctacaggggc ctactacca atatttccgc tgcctccgca 2280
 acgatcaaca gcaacatagc cgcgcccaag gccagcggaa aaccggtcat tctttccgtt 2340
 aatatgtcca acctatggt catgggagag gttagacctc atgcggatgt aatgctcgtc 2400
 aacttcggag ctcaaaaaatc cgccatactg gatatgcita cgggccttac tcgctacggc 2460
 aagcaaggcg gtccatctc ggctgtctat cctaccggca tgcctccaat gcaattgcct 2520
 aaagataagg atgaagtcga gctgcaatat gaagatgtcc ctgcgatat ggtcagctac 2580
 acggacagcc agggaaatgt ttacgacttt ggctttggac tgacctggaa ggacggatig 2640
 aagaggattg atgcatcggg aaatcccggg tatactcctt tcgttgcggg aaatacggtg 2700
 ccgatgactc atcccgttaa tatgggcacc aatgaaaaca gcccttatct gattgccaat 2760
 cgggcaaaaag tgaatttga tticggctat aaggaatcgg cagccgataa ggaaaatgca 2820
 aaaatcacca aaatagtaaa taaaggttca accgtaactc ctgccgaacc gccatcccgc 2880
 gccggacaag caticgcggg ctggataaac ggaaccgaca aatttgattt ctccaacccg 2940

10

20

30

40

attactgaag atatcgttct tacagcaaaa tggggatgaag aaggagcggc tccgacgatc 3000
 acggctccag cctccgtcgt ggtcggacag gacttcgate ttcacattgg cattaaaggc 3060
 atcgaggaag ggtttgactc cctggcggta gtcgtgaatt atgatccgga gcaggctcgag 3120
 tttagacctg taagcgaatg ggaaggcgca ctgagcttga gtgagcaagc ggttcgcttcg 3180
 ctgcgttccg atcttcacgt tctcggaaaca ggcgtcaagc ccgacgcggg acaaattcig 3240
 attatccigt caacgacagg tcaactggtc gagctggacg gcgatctgct ggttctccat 3300
 ggcaaggcca gagctggcgc tgcagcaggt acgactatta tagctttaag cgattttgaa 3360
 gtatcggcta acggctcctc ccaatcgtcg aatacggatg gtagttcggg cgccattcaa 3420
 attcgtttgg ctgatcatgc ggcgctggca tcggcgatca gcgaagccga gcagctgctt 3480
 gccaggctg tcgagggctc gcagccgggt cagtaccggg ctggcaccaa agcggcgcig 3540
 cggcttggcg ttaatcaggc gattgcggtc agggataacg cttcggcgat aatgaacag 3600
 attgctcaag cggcgggtgc gctcaacaat gccattaaac tattcaagag ctgggtgaac 3660
 ccggatcctt ctccctcggc agacaagatt gcgttgaatg cggcgatcgc ggcggcgcag 3720
 acgaagcigg gtcaggcgaa ggaaggcagc aagggtgggc aatattccgc atcggccatc 3780
 gctgcgciga aagcggctgt tcaaacggct aacgcagiga agaatgattc gacggcatcg 3840
 caatattccg ttgatcaagc gacggcaaaa ttaaacgagg cggttgccga attcaccgcg 3900
 aagatgatta cgcttgttcc cggtcaaacg ggagtgacgc tgagcgactt gtcctatttg 3960
 gcgaagtact acggcgtaaa atcgaccgat ccggaatgga gcaatgtcga gaaggcagac 4020
 ctcttcgaca gcggtgaaat tacgattcgc gagctggcgg caattgcaag aatgatgtc 4080
 gacaactggc tggatcaata a 4101

10

20

30

<210> 4

<211> 1366

<212> PRT

<213> Paramecium sp.

<400> 4

Met Arg Ile Gly Leu Asn Ile Ser Phe Gln Lys Ala Leu Ser Ala

5

10

15

40

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

230	235	240	
Pro Glu Met Asn Ala Lys Trp Asn Asn Asn Val Gln Ala Phe Thr			
245	250	255	
Glu Ser Thr Ser Phe Gly Ile Pro Ala Asn Asn Ser Ser Asp Pro			
260	265	270	
Arg His Ser Ala Asn Thr Thr Ser Gly Val Glu Tyr Tyr Val Glu			
275	280	285	10
Asn Ala Gly Val Ser Ala Trp Pro Thr Ser Leu Gly Leu Ala Ala			
290	295	300	
Thr Phe Asn Val Asp Thr Met Lys Gln Phe Gly Lys Ile Ala Ser			
305	310	315	
Ile Glu Tyr Arg Ser Leu Gly Ile Ser Thr Ala Leu Ser Pro Gln			
320	325	330	
Ile Asp Ile Ala Thr Asp Pro Arg Trp Gly Arg Phe Asn Gly Thr			20
335	340	345	
Phe Gly Glu Asp Pro Lys Leu Ala Ser Ala Met Ala Arg Ala Tyr			
350	355	360	
Val Asp Gly Phe Gln Thr Thr Tyr Ala Asp Gly Thr Ser Asn Thr			
365	370	375	
Pro Val Ala Gly Gly Trp Gly Met Asp Ser Val Asn Ala Met Met			
380	385	390	30
Lys His Trp Pro Gly Gly Gly Ala Gly Glu Gly Gly Arg Asp Ala			
395	400	405	
His Tyr Asp Tyr Gly Lys Tyr Ala Val Tyr Pro Gly Asp Asn Phe			
410	415	420	
Glu Ala His Leu Ile Pro Phe Val Asp Gly Ser Leu Ser Leu Ser			
425	430	435	
Asp Gly Thr Gly Met Ala Thr Ala Val Met Pro Tyr Tyr Thr Ile			40
440	445	450	

Ser Tyr Met Gln Thr Pro Gly Ser Glu Pro Asn Ser Ser Asn Leu		
455	460	465
Pro Gly Ala Lys Leu Asn Met Ala Asn Ala Tyr Asn Asp Tyr Met		
470	475	480
Ile Asn Gly Val Leu Arg Asp Ala Tyr Gln Phe Glu Gly Val Val		
485	490	495
Thr Thr Asp Trp Asn Val Ile Gly Pro Lys Thr Ala Pro Gly Gly		10
500	505	510
Gly Phe Asp Ser Asp Ile Pro Gly Met Ile Trp Gly Pro Asp Asp		
515	520	525
His Tyr Gly Leu Thr Gly Phe Thr Met Asp Asp Met Ala Val Arg		
530	535	540
Ala Arg Leu Leu Leu Asp Ala Gly Val Asp Gln Phe Gly Gly Leu		20
545	550	555
Asn Thr Asn Ala Pro Ile Val Thr Ala Tyr Asn Asn Ala Thr Gly		
560	565	570
Glu Asp Lys Glu Arg Leu Leu Ala Gln Leu Gln Val Ser Ala Tyr		
575	580	585
Arg Leu Leu Met Asn Val Phe Arg Thr Gly Leu Phe Glu Asp Pro		
590	595	600
Tyr Leu Asp Pro Ala Glu Ser Lys Ala Thr Val Gly Gln Glu Ala		30
605	610	615
Phe Met Ala Ala Gly Tyr Lys Ala Gln Leu Glu Ser Met Val Leu		
620	625	630
Leu Lys Asp Lys Asn Ser Ile Leu Pro Val Ser Thr Asn Lys Lys		
635	640	645
Val Tyr Ala Pro Gly Ala Asp Ala Asn Thr Val Thr Leu Leu Lys		40
650	655	660
Ala Tyr Phe Gly Ser Glu Asn Val Ile Thr Glu Ala Ala Asn Ala		

665	670	675	
Asn Ala Ala Asp Tyr Ala Ile Val Phe Met Asn Ser Val Ser Ala			
680	685	690	
Gly Gly Gly Ser Arg Asn Ala Ser Gln His Ile Asn Ser Tyr Thr			
695	700	705	
Pro Ile Asn Leu Asp Phe Lys Ala Tyr Thr Ala Thr Asn Ala Arg			
710	715	720	10
Glu Thr Ser Ile Ala Gly Tyr Pro Leu Arg Glu Ile Pro Asp Asp			
725	730	735	
Phe Thr Ser Ala Val Ile Gly Met Glu Asn Arg Ser Tyr Arg Gly			
740	745	750	
Leu Thr Thr Asn Ile Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ile Asn Ser Asn			
755	760	765	
Ile Ala Ala Ala Lys Ala Ser Gly Lys Pro Val Ile Leu Ser Val			20
770	775	780	
Asn Met Ser Asn Pro Met Val Met Gly Glu Val Glu Pro His Ala			
785	790	795	
Asp Val Met Leu Val Asn Phe Gly Ala Gln Lys Ser Ala Ile Leu			
800	805	810	
Asp Met Leu Thr Gly Ser Thr Arg Tyr Gly Lys Gln Gly Gly Pro			
815	820	825	30
Ser Ser Ala Val Tyr Pro Thr Gly Met Leu Pro Met Gln Leu Pro			
830	835	840	
Lys Asp Met Asp Glu Val Glu Leu Gln Tyr Glu Asp Val Pro Arg			
845	850	855	
Asp Met Val Ser Tyr Thr Asp Ser Gln Gly Asn Val Tyr Asp Phe			
860	865	870	
Gly Phe Gly Leu Thr Trp Lys Asp Gly Leu Lys Arg Ile Asp Ala			40
875	880	885	

Ser Val Asn Pro Gly Tyr Thr Pro Phe Val Ala Gly Asn Thr Val		
890	895	900
Pro Met Thr His Pro Val Asn Met Gly Thr Asn Glu Asn Ser Pro		
905	910	915
Tyr Leu Ile Ala Asn Arg Ala Lys Val Lys Phe Asp Phe Gly Tyr		
920	925	930
Lys Glu Ser Ala Ala Asp Lys Glu Asn Ala Lys Ile Thr Lys Ile		10
935	940	945
Val Asn Lys Gly Ser Thr Val Thr Pro Ala Glu Pro Pro Ser Arg		
950	955	960
Ala Gly Gln Ala Phe Ala Gly Trp Tyr Asn Gly Thr Asp Lys Phe		
965	970	975
Asp Phe Ser Asn Pro Ile Thr Glu Asp Ile Val Leu Thr Ala Lys		20
980	985	990
Trp Gly Glu Glu Gly Ala Ala Pro Thr Ile Thr Ala Pro Ala Ser		
995	1000	1005
Val Val Val Gly Gln Asp Phe Asp Leu His Ile Gly Ile Lys Gly		
1010	1015	1020
Ile Glu Glu Gly Phe Asp Ser Leu Ala Val Val Val Asn Tyr Asp		
1025	1030	1035
Pro Glu Gln Val Glu Phe Asp Thr Val Ser Asp Ala Glu Gly Ala		30
1040	1045	1050
Leu Ser Leu Ser Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Arg Ser Asp Leu		
1055	1060	1065
His Val Leu Gly Thr Gly Val Lys Pro Asp Ala Gly Gln Ile Leu		
1070	1075	1080
Ile Ile Leu Ser Thr Thr Gly Gln Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp		40
1085	1090	1095
Leu Leu Val Leu His Gly Lys Ala Arg Ala Gly Ala Ala Ala Gly		

1100	1105	1110	
Thr Thr Ile Ile Ala Leu Ser Asp Phe Glu Val Ser Ala Asn Gly			
1115	1120	1125	
Ser Ser Gln Ser Leu Asn Thr Asp Gly Ser Ser Val Ala Ile Gln			
1130	1135	1140	
Ile Arg Leu Ala Asp His Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ile Ser Glu			
1145	1150	1155	10
Ala Glu Gln Leu Leu Ala Gln Ala Val Glu Gly Ser Gln Pro Gly			
1160	1165	1170	
Gln Tyr Pro Ala Gly Thr Lys Ala Ala Leu Arg Leu Ala Val Asn			
1175	1180	1185	
Gln Ala Ile Ala Val Arg Asp Asn Ala Ser Ala Ile Asn Glu Gln			
1190	1195	1200	
Ile Ala Gln Ala Ala Val Ser Leu Asn Asn Ala Ile Lys Leu Phe			20
1205	1210	1215	
Lys Ser Leu Val Asn Pro Asp Pro Ser Pro Ser Ala Asp Lys Ile			
1220	1225	1230	
Ala Leu Asn Ala Ala Ile Ala Ala Ala Gln Thr Lys Leu Gly Gln			
1235	1240	1245	
Ala Lys Glu Gly Thr Lys Val Gly Gln Tyr Ser Ala Ser Ala Ile			
1250	1255	1260	30
Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Gln Thr Ala Asn Ala Val Lys Asn			
1265	1270	1275	
Asp Ser Thr Ala Ser Gln Tyr Ser Val Asp Gln Ala Thr Ala Lys			
1280	1285	1290	
Leu Asn Glu Ala Val Ala Glu Phe Thr Ala Lys Met Ile Thr Leu			
1295	1300	1305	
Val Pro Gly Gln Thr Gly Val Thr Leu Ser Asp Leu Ser Tyr Leu			40
1310	1315	1320	

Ala Lys Tyr Tyr Gly Val Lys Ser Thr Asp Pro Glu Trp Ser Asn
 1325 1330 1335
 Val Glu Lys Ala Asp Leu Phe Asp Ser Gly Glu Ile Thr Ile Arg
 1340 1345 1350
 Glu Leu Ala Ala Ile Ala Arg Met Ile Val Asp Asn Trp Leu Asp
 1355 1360 1365

Gln
 1366

10

- <210> 5
- <211> 1716
- <212> DNA
- <213> Paenibacillus sp.

20

<400> 5

gtggttaatt tacgagcgaa accattttat ctggatgatg atgccgtgat ttgggtgcaa 60
 agcacattag aaaaaatgga tatacgagcc aaggttggcc aatigtittg tgaaatigtg 120
 tgggacaagc cgggcatgga catagacagt ctgtttactg atategaacc gggcgggaatt 180
 atgtttcgtc ctgatacagg ggccaacatt caaaaatcgg ccaggatgtg gcagcagaag 240
 gctcaaattc cgcigttaat tgccggtaat ctcgaacgtg gcggcagcgg tggaaacggt 300
 gggtttaagg acgggacctt ctttggttcg cccatgcaag ttgctgctac cgatgatgaa 360
 gagaacgggt ataggcttgg gttaatigca tgcagggaaag gggcggctgc aggggtaaac 420
 tggacattcg aacctatcat cgatatgac tataattttc ataatccaat tacgaatgtt 480
 cggacgttcg gcagtgattt aaatcgtata ctccggatgg ccaaagggtt catgcgaggg 540
 gcttatgagt gcggagtggc cgtatcgatc aagcattggc cgggagacgg agttgatttt 600
 cgcgatcagc atttgctggc cagtgttaac agtatgtcgg tagaagaatg gaatgcatca 660
 ttgggttggc tatataaaga aatgatcgat gccggcgcca atacgttgat ggccicccat 720
 attaaattgc cggcgtactc tcggaaattg cgcccgggaa ttaaggatga agagatcatg 780
 cctgcctcat tggctcccga attgcatcat caattattgc gtgagcagtt aggatttaac 840

30

40

ggccatcgc tcagcgaig taccagatg gctggattta cggtatcgaat ggaacgcgaa 900
 aaagcgggtc ctgccgccat agccgcggga tgcgacatgt ttttgtttac aattaatcac 960
 agggaagacg ttcaatacat gtttaaggggt gtcgagcaag gtatcattag ccaggaaaga 1020
 ttaaataaag cggttaccgc tattctggcg cttaaagcat ctcttgggct gcatagaaag 1080
 cagcacgaac ataacctigt tcttgggact gatgctttgc aactgctgct gtgcgaccaa 1140
 catgtgagtt gggccaaaga atgcgcagac caagctatca cgctgattaa ggatagagag 1200
 caactattgc ctcttcgac cgaaaggcac aagcgcattc tattgcaaac gattacgaat 1260
 gagcctacag atgaacaagg ttttactgcc gaatcattgc agttcaagcg ctgtcttgaa 1320
 caatcaggat ttgagattac tgacttcaga tctgaagaga tgccctggggg ttacagggg 1380
 aaaatatcaa tcagtgaatt gaagcaacaa acggatctta ttgtatatta tgtaaataatg 1420
 agagtggcca gcaatcagaa tagtgtacga ttgtcttggg cggacttttt gggcgaagac 1500
 tcgcctaagt atgcgaaaga taccctcgtc gtctttattt ccgcatcaa tctttatcat 1560
 ctgatagatg taccgatggt atcgacttat attaacgcat acagttcaaa tcaatatgtt 1620
 gtagaagctc tggttgataa attgcttggg aagtcggagt ttaaaggaat tagtcctgtc 1680
 gatccatttt gcggattgtg ggatgccggg ctctga 1716

10

20

- <210> 6
- <211> 571
- <212> PRT
- <213> Paenibacillus sp.

30

<400> 6
 Val Val Asn Leu Arg Ala Lys Pro Phe Tyr Leu Asp Asp Asp Ala
 5 10 15
 Val Ile Trp Val Gln Ser Thr Leu Glu Lys Met Asp Ile Arg Ala
 20 25 30
 Lys Val Gly Gln Leu Phe Cys Glu Ile Val Trp Asp Lys Pro Gly
 35 40 45
 Met Asp Ile Asp Ser Leu Phe Thr Asp Ile Glu Pro Gly Gly Ile

40

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

Gln Leu Leu Arg Glu Gln Leu Gly Phe Asn Gly Leu Ile Val Ser		
275	280	285
Asp Ala Thr Gln Met Ala Gly Phe Thr Val Ser Met Glu Arg Glu		
290	295	300
Lys Ala Val Pro Ala Ala Ile Ala Ala Gly Cys Asp Met Phe Leu		
305	310	315
Phe Thr Ile Asn His Arg Glu Asp Val Gln Tyr Met Leu Arg Gly		10
320	325	330
Val Glu Gln Gly Ile Ile Ser Gln Glu Arg Leu Asn Glu Ala Val		
335	340	345
Thr Arg Ile Leu Ala Leu Lys Ala Ser Leu Gly Leu His Arg Lys		
350	355	360
Gln His Glu His Asn Leu Val Pro Gly Thr Asp Ala Leu Gln Leu		20
365	370	375
Leu Leu Cys Asp Gln His Val Ser Trp Ala Lys Glu Cys Ala Asp		
380	385	390
Gln Ala Ile Thr Leu Ile Lys Asp Arg Glu Gln Leu Leu Pro Leu		
395	400	405
Ser Thr Glu Arg His Lys Arg Ile Leu Leu Gln Thr Ile Thr Asn		
410	415	420
Glu Pro Thr Asp Glu Gln Gly Phe Thr Ala Glu Ser Leu Gln Phe		30
425	430	435
Lys Arg Leu Leu Glu Gln Ser Gly Phe Glu Ile Thr Asp Phe Arg		
440	445	450
Ser Glu Glu Met Pro Gly Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ser Ile Ser		
455	460	465
Glu Leu Lys Gln Gln Thr Asp Leu Ile Val Tyr Tyr Val Asn Met		40
470	475	480
Arg Val Ala Ser Asn Gln Asn Ser Val Arg Leu Ser Trp Ala Asp		

485 490 495
 Phe Leu Gly Glu Asp Ser Pro Lys Tyr Ala Lys Asp Ile Pro Val
 500 505 510
 Val Phe Ile Ser Ala Ser Asn Pro Tyr His Leu Ile Asp Val Pro
 515 520 525
 Met Val Ser Thr Tyr Ile Asn Ala Tyr Ser Ser Asn Gln Tyr Val
 530 535 540
 Val Glu Ala Leu Val Asp Lys Leu Leu Gly Lys Ser Glu Phe Lys
 545 550 555
 Gly Ile Ser Pro Val Asp Pro Phe Cys Gly Leu Trp Asp Ala Gly
 560 565 570

Leu

571

<210> 7

<211> 2937

<212> DNA

<213> Paenibacillus sp.

<400> 7

atgatgagct ttattcctga aagtgccagc gctcaacaa gtcagccttc aattttgcca 60
 aagccctgiaa gctatacagt gggatccggg caatttgitt taacaaagaa cgcttccatc 120
 ttigttagccg gcaataacgt aggagaaacg gatgagctgt tcaacattgg acaagccctc 180
 gccaaaaaac tgaatgcatc gaccgggtat accatcagtg tegtcaaate aaaccagccg 240
 acggctggaa gtatttattt gactacagtt ggcggaaatg ccgccctggg caatgaaggg 300
 tatgatttaa tcacgacttc caatcagggt acgcttactg caataaacc ggaaggagtc 360
 tttagaggca atcaaaccct attgcagctc ttgccggcgg gtattgaaa gaacaccggt 420
 gtttccggcg tgcaatgggt aatcccccat tccaatatta ggcacaagcc cgaataigaa 480
 tatcggcgac ttatgcttga tgtggctcga cacttcttta ccgtggatga agttaaacgt 540
 cagattgatc tggcctcgcg gtataagatc aacaaatttc atatgcattt gtcigacgat 600

cagggctggc gtattgaaat taaatcatgg ccigatctca tagagatcgg aagcaagggg 660
 caggtaggcg gcggctcccg cggatattat acgcaggagc agttcaaaga tattgtcagc 720
 tatgcggctg aacgatacat tgaagttatt ccggaaatcg atatgcccgg tcatacgaat 780
 gccgctttag ctctttatgg tgaacttaat ccigatggaa aaagaaaagc tatgctcacc 840
 gatacggctg tagggtacag cacgctcatg cctcgcgccg agattacgta tcaattigt 900
 gaagatgtca tcagcagact tgcgcgaata tcgcttcgc cttatatca tctgggtggc 960
 gatgaatcta acgcaacgic ggctgccgac tatgattatt ttttggcag agttacggct 1020
 attgctaaca gttacggcaa gaaagtcgtt ggctgggacc cgtccgatac gicaagcggg 1080
 gcaactagcg atctgttct gcagaactgg acttgcagcg cctcaaccgg aactgcggca 1140
 aaagcaaaag ggatgaaggt catcgtatct ccigcaaatg cttatcttga catgaaatac 1200
 tacagtgatt cgccaattgg ttacaatgg agaggatttg tcaatacaaa cagagcttat 1260
 aattgggatc cgaccgattg catcaaggga gcgaatatt acggagtga aagtacatta 1320
 tggacagaaa cctttgtaac acaagatcat ttggattata tgcctatcc gaaattatta 1380
 tcaaatgctg aagtcggctg gactgcccg ggagatcgaa actgggatga ttttaaagaa 1440
 aggcigatcg aacatacgcc aagattgcaa aataaaggaa ttaaattttt tgccgacct 1500
 attggtggg agcttccgat tctccagatt aattcagaat ggaagatgga tgaaggaacc 1560
 ggcaccgctg tgaaggacac ttccggttat ttaaaccggaa ctttagttgg cggcgcaaag 1620
 tggacagcgg gcaacaagg aaatggggta agctttgatg gaagctcggg ctacataaat 1680
 ttagcggctc aggatataac agggaaactgg accgcagcag tatgggttta cggccagcca 1740
 aatacaacga ataataaac gctgctgagc ggcacaactt cagcaatcaa gatcaaccag 1800
 tataataaaa caggtaaagt cgggattacc atttacggta cgaaagacta tacgtacaat 1860
 tatagcattc catccaataa atggactcat ctgacgttcg taggcacaag cacggggact 1920
 gcgctttatg aaaacggcgt gctgaaagaa acaatcgccg caaaaatgaa tggccaatg 1980
 gctttgggtg gagcggaaaa aacgggagga tccggagatt taacctctta ttccagagga 2040
 agctcggatg aatigaaaa atccaacaga gcgctaagcg caagcaggt tgttgaattg 2100
 gcaaaatcgc cggcgccgaa ggcgtcgtc acaggtcctc aatcggcgaa tcccggctca 2160
 tccttcgatg taaaaatggg gttagcgcac gtttcccaa gcgaattcgg acaaatgtat 2220
 gctcaagact ggacgattaa ctatgattcg gcgaagtgc agttagattc gattacatcg 2280
 ctgcaagata agttcaagt gatcgaccaa aaggagtgg cggcgggaca aatccggatt 2340

10

20

30

40

gtggctgcga atgcagctgc gaaccaagga gtgactccgc aaggcgattt gttcgcatic 2400
 aaatttacag ttaaagcggg aaccgatgic aagacgacaa tttcggcaga ccatatgitt 2460
 attggcaacg cacaggggaa agaattggag atcgcggggg ccactcacga gatccaggic 2520
 agcatcccag tagacaaaac gcaattgaat gtactgattg cgaacgctca agccaagcat 2580
 gatgcggcgg tggaaggaaa tgaagacggg ttgtacgccg caggttccaa agcgcaatig 2640
 caaacggcta ttcatacagc caaagcggta gcagacaatt cgaatgcate tcaacaacag 2700
 gtggatagtg cgaaatccgc attggaagag gccgttcaag tatttgaaag caagaaaata 2760
 tctgcagacg taaacggaga tggtcaggic tctattggag atttggcaat cattgcgggt 2820
 gcttacggca aagaggaagg tcaggctggc tggaataaaa aagcggatgt gaatcacgac 2880
 ggcaagggtg acattataga ccttacaate gtagccaaag cgatcttgca gatataa 2937

10

<210> 8

<211> 978

<212> PRT

20

<213> Paenibacillus sp.

<400> 8

Met Met Ser Phe Ile Pro Glu Ser Ala Ser Ala Ser Thr Ser Gln
 5 10 15
 Pro Ser Ile Leu Pro Lys Pro Val Ser Tyr Thr Val Gly Ser Gly
 20 25 30
 Gln Phe Val Leu Thr Lys Asn Ala Ser Ile Phe Val Ala Gly Asn
 35 40 45
 Asn Val Gly Glu Thr Asp Glu Leu Phe Asn Ile Gly Gln Ala Leu
 50 55 60
 Ala Lys Lys Leu Asn Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Val Val
 65 70 75
 Lys Ser Asn Gln Pro Thr Ala Gly Ser Ile Tyr Leu Thr Thr Val
 80 85 90
 Gly Gly Asn Ala Ala Leu Gly Asn Glu Gly Tyr Asp Leu Ile Thr

30

40

	95	100	105	
Thr Ser Asn Gln Val Thr Leu Thr Ala Asn Lys Pro Glu Gly Val				
	110	115	120	
Phe Arg Gly Asn Gln Thr Leu Leu Gln Leu Leu Pro Ala Gly Ile				
	125	130	135	
Glu Lys Asn Thr Val Val Ser Gly Val Gln Trp Val Ile Pro His				
	140	145	150	10
Ser Asn Ile Ser Asp Lys Pro Glu Tyr Glu Tyr Arg Gly Leu Met				
	155	160	165	
Leu Asp Val Ala Arg His Phe Phe Thr Val Asp Glu Val Lys Arg				
	170	175	180	
Gln Ile Asp Leu Ala Ser Gln Tyr Lys Ile Asn Lys Phe His Met				
	185	190	195	
His Leu Ser Asp Asp Gln Gly Trp Arg Ile Glu Ile Lys Ser Trp				20
	200	205	210	
Pro Asp Leu Ile Glu Ile Gly Ser Lys Gly Gln Val Gly Gly Gly				
	215	220	225	
Pro Gly Gly Tyr Tyr Thr Gln Glu Gln Phe Lys Asp Ile Val Ser				
	230	235	240	
Tyr Ala Ala Glu Arg Tyr Ile Glu Val Ile Pro Glu Ile Asp Met				
	240	245	255	30
Pro Gly His Thr Asn Ala Ala Leu Ala Ser Tyr Gly Glu Leu Asn				
	260	265	270	
Pro Asp Gly Lys Arg Lys Ala Met Arg Thr Asp Thr Ala Val Gly				
	275	280	285	
Tyr Ser Thr Leu Met Pro Arg Ala Glu Ile Thr Tyr Gln Phe Val				
	290	295	300	
Glu Asp Val Ile Ser Glu Leu Ala Ala Ile Ser Pro Ser Pro Tyr				40
	305	310	315	

Ile His Leu Gly Gly Asp Glu Ser Asn Ala Thr Ser Ala Ala Asp		
320	325	330
Tyr Asp Tyr Phe Phe Gly Arg Val Thr Ala Ile Ala Asn Ser Tyr		
335	340	345
Gly Lys Lys Val Val Gly Trp Asp Pro Ser Asp Thr Ser Ser Gly		
350	355	360
Ala Thr Ser Asp Ser Val Leu Gln Asn Trp Thr Cys Ser Ala Ser		10
365	370	375
Thr Gly Thr Ala Ala Lys Ala Lys Gly Met Lys Val Ile Val Ser		
380	385	390
Pro Ala Asn Ala Tyr Leu Asp Met Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Pro		
395	400	405
Ile Gly Leu Gln Trp Arg Gly Phe Val Asn Thr Asn Arg Ala Tyr		20
410	415	420
Asn Trp Asp Pro Thr Asp Cys Ile Lys Gly Ala Asn Ile Tyr Gly		
425	430	435
Val Glu Ser Thr Leu Trp Thr Glu Thr Phe Val Thr Gln Asp His		
440	445	450
Leu Asp Tyr Met Leu Tyr Pro Lys Leu Leu Ser Asn Ala Glu Val		
455	460	465
Gly Trp Thr Ala Arg Gly Asp Arg Asn Trp Asp Asp Phe Lys Glu		30
470	475	480
Arg Leu Ile Glu His Thr Pro Arg Leu Gln Asn Lys Gly Ile Lys		
485	490	495
Phe Phe Ala Asp Pro Ile Val Trp Glu Leu Pro Ile Val Gln Ile		
500	505	510
Asn Ser Glu Trp Lys Met Asp Glu Gly Thr Gly Thr Val Val Lys		40
525	520	525
Asp Thr Ser Gly Tyr Leu Asn Gly Thr Leu Val Gly Gly Ala Lys		

530	535	540	
Trp Thr Ala Gly Lys Gln Gly Asn Gly Val Ser Phe Asp Gly Ser			
545	550	555	
Ser Gly Tyr Ile Asn Leu Gly Gly Gln Asp Ile Thr Gly Asn Trp			
560	565	570	
Thr Ala Ala Val Trp Val Tyr Gly Gln Pro Asn Thr Thr Asn Asn			
575	580	585	10
Glu Thr Leu Leu Ser Gly Thr Thr Ser Ala Ile Lys Ile Asn Gln			
590	595	600	
Tyr Asn Lys Thr Gly Lys Val Gly Ile Thr Ile Tyr Gly Thr Lys			
605	610	615	
Asp Tyr Thr Tyr Asn Tyr Ser Ile Pro Ser Asn Lys Trp Thr His			
620	625	630	
Leu Thr Phe Val Gly Thr Ser Thr Gly Thr Ala Leu Tyr Glu Asn			20
635	640	645	
Gly Val Leu Lys Glu Thr Ile Ala Ala Lys Met Asn Gly Pro Met			
650	655	660	
Ala Leu Val Gly Ala Glu Lys Thr Gly Gly Ser Gly Asp Leu Thr			
665	670	675	
Ser Tyr Phe Arg Gly Ser Leu Asp Glu Leu Lys Ile Phe Asn Arg			
680	685	690	30
Ala Leu Ser Ala Ser Glu Val Val Glu Leu Ala Lys Ser Pro Ala			
695	700	705	
Pro Lys Ala Ser Leu Thr Gly Pro Gln Ser Ala Asn Pro Gly Gln			
710	715	720	
Ser Phe Asp Val Lys Met Gly Leu Ser Asp Val Ser Pro Ser Glu			
725	730	735	
Phe Gly Gln Met Tyr Ala Gln Asp Trp Thr Ile Asn Tyr Asp Ser			40
740	745	750	

Ala Lys Leu Gln Leu Asp Ser Ile Thr Ser Leu Gln Asp Lys Phe		
755	760	765
Gln Val Ile Asp Gln Lys Glu Leu Ala Pro Gly Gln Ile Arg Ile		
770	775	780
Val Ala Ala Asn Ala Ala Ala Asn Gln Gly Val Thr Pro Gln Gly		
785	790	795
Asp Leu Phe Ala Phe Lys Phe Thr Val Lys Ala Gly Thr Asp Val		10
800	805	810
Lys Thr Thr Ile Ser Ala Asp His Ile Val Ile Gly Asn Ala Gln		
815	820	825
Gly Lys Glu Leu Glu Ile Ala Gly Ala Thr His Glu Ile Gln Val		
830	835	840
Ser Ile Pro Val Asp Lys Ser Gln Leu Asn Val Leu Ile Ala Asn		20
845	850	855
Ala Gln Ala Lys His Asp Ala Ala Val Glu Gly Asn Glu Asp Gly		
860	865	870
Leu Tyr Ala Ala Gly Ser Lys Ala Gln Leu Gln Thr Ala Ile His		
875	880	885
Thr Ala Lys Ala Val Ala Asp Asn Ser Asn Ala Ser Gln Gln Gln		
890	895	900
Val Asp Ser Ala Lys Ser Ala Leu Glu Glu Ala Val Gln Val Phe		30
905	910	915
Glu Ser Lys Lys Ile Ser Ala Asp Val Asn Gly Asp Gly Gln Val		
920	925	930
Ser Ile Gly Asp Leu Ala Ile Ile Ala Gly Ala Tyr Gly Lys Glu		
935	940	945
Glu Gly Gln Ala Gly Trp Asn Lys Lys Ala Asp Val Asn His Asp		40
950	955	960
Gly Lys Val Asp Ile Ile Asp Leu Thr Ile Val Ala Lys Ala Ile		
965	970	975
Leu Gln Ile		
978		

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

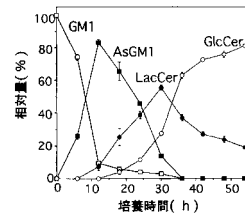
【図2】 TS12株によるGM1の分解様式を示す薄層クロマトグラフ。

【図3】 TS12株のNBD-GM1の分解様式を示す示すグラフ。

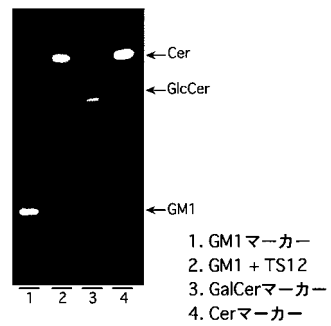
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(56)参考文献 MoI Gen Genet , 1 9 8 9 年 , vol.217 , pp.70-76

Database GenBank , 1 9 9 7 年 4 月 1 4 日 , Z94045 , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1938209?sat=0LD02&satkey=117256>

Database GenBank , 1 9 9 8 年 3 月 1 2 日 , U92808 , U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/2952029>

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

IPC

C12N 15/00-15/90

DB名

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

CiNii

WPI