

(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2003 - 61663

(P 2 0 0 3 - 6 1 6 6 3 A)

(43)公開日 平成15年 3月 4日 (2003.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 1/21	4B024
1/21		9/24	4B050
9/24		C12P 19/28	4B064
C12P 19/28		C12R 1:01	4B065
//(C12N 1/21		C12N 15/00	ZNA A

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 249782(P 2001 - 249782)

(22)出願日 平成13年 8月21日(2001.8.21)

(71)出願人 800000035
株式会社産学連携機構九州
福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

(72)発明者 伊東 信
福岡県福岡市西区愛宕浜4 - 34 - 1

(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

(74)代理人 100087675
弁理士 筒井 知

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)【要約】

【課題】 新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素を産生するエキソ型ガングリオシド分解酵素産生菌Paenibacillus sp.と、新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素と、新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素を生産する製造方法とを提供すること。

【解決手段】 新規なエキソ型ガングリオシド分解酵素は、エキソ型ガングリオシド分解酵素を生産するPaenibacillus sp. TS12 F E R M P - 1 8 4 1 6を培養することによって製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で示す塩基配列ならびに配列番号 2 で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- グルコシダーゼ遺伝子 (glc4)。

【請求項 2】 配列番号 3 で示す塩基配列ならびに配列番号 4 で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- グルコシダーゼ遺伝子 (glc8)。

【請求項 3】 配列番号 5 で示す塩基配列ならびに配列番号 6 で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- グルコシダーゼ遺伝子 (glc28)。

【請求項 4】 配列番号 7 で示す塩基配列ならびに配列番号 8 で示すアミノ酸配列を有することを特徴とする

- ヘキササミニダーゼ遺伝子 (hex36)。

【請求項 5】 エキソ型ガングリオシド分解酵素 (- グルコシダーゼ、 - ヘキササミニダーゼ、シアリダーゼおよび - ガラクトシダーゼ) を生産する *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P - 18416。

【請求項 6】 *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P - 18416 由来の - ヘキササミニダーゼ遺伝子および - グルコシダーゼ遺伝子の大腸菌による組み換え体ポリペプチド。

【請求項 7】 エキソ型ガングリオシド分解酵素産生菌 *Paenibacillus* sp. TS12 FERM P - 18416 を粗ガングリオシドと共培養して各種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 (Ledeen, R. W. (1989) Biosynthesis, metabolism, and biological effects of gangliosides, In *Neurobiology of Glycoconjugates*; 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., Chapas-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。ラクシセラミド (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ン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ス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 FERM P-18416 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を実験室で大腸菌で大量発現させ、糖脂質の糖鎖に作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 FERM P-18416 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。

【0008】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。

50 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) 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%K₂ HPO₄, 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 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ジアロGM1、アジアロGM2、ラクシセラミド(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、 - ガラクトシダーゼ、 - 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))。次に、セラミドの脂肪酸の 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 - 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) 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 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FERMに P - 1 8 4 1 6 として寄託している。

【 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 % N a C l 中での生育	+
0 . 5 % N a C l 中での生育	+
3 % N a C l 中での生育	+
5 % N a C l 中での生育	-
7 % N a C l 中での生育	-
10 コロニーの色	乳白色
O F テスト	-
G C 含量	4 9 %

【 0 0 1 1 】 (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、 - ガラクトシダーゼ、 - 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。

【 0 0 1 2 】 (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 - 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。

【 0 0 1 3 】 (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株は各種ガングリオシドおよびLacCerを分解してGlcCerに変換したが、グロボシド、スルファチドは分解しなかった。また、LacCerの分解速度はガングリオシド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、単独で各種ガングリオシド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ガングリオシドを分解・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シーケンサーの開発、特定のガングリオシド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ターで播き、30 で2日間培養した。生えてきたコロニーを2 cm四方のバイオダインA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, 10mM 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Sepaglas 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。

【 0 0 1 7 】 (- N - アセチルヘキサ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 - アセチルヘキササミニダーゼと同定された。2,934 bpからなる - N - アセチルヘキサ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 - ヘキササミニダーゼとそれぞれ41%, 26%, 26%, 25%一致した。TS12株のヘキササミニダーゼは他のヘキサ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。

【 0 0 1 8 】 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 - ヘキサ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、ヘキササミニダーゼの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 [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ササミニダーゼの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 μg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pBluscript II 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、DH5αに導入し、ヘキササミニダーゼの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株のヘキササミニダーゼの基質特異性) GM2 (1 μg GM2, 0.1% TDC) 10 μl とHex36Tのライセート10 μl 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、クロロホルム/メタノール (2/1) 5 μl 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N-アセチルヘキササミニダーゼ36 (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、この発明に係るヘキササミニダーゼは、糖脂質に作用することが示されたので、新規のヘキササミニダーゼであるといえる。

【0020】(グルコシダーゼの発現クローニング) さらに、4MU-Glcを用いて、N-アセチルヘキサ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-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。

【0021】(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 μl と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 μl を37℃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 μl 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。

【0022】(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) にてチェイ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。

【0023】

【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。

11

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。

12

TS12株には、グルコシダーゼおよびヘキササミニダーゼ
 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

<130> P0446T

<160> 8

<210> 1

<211> 2496

<212> DNA

<213> Paenibacillus sp.

<400> 1

```

gtggcgcaac tcacgcttga agaaaaagcc ggcctctgtt cgggggaaag cttttggagg 60
accaaagcaa ttgatcgtct ggggattccg tccatcatga tgacagacgg acctcacggc 120
ttgcgcaagc aagcggggga agcggacat ctgggactga acgagagcat tccggcaacg 180
tgctttccga ccgcccggg gcttgcgagc tcctgggacc gcgaactggt gcgaaaggta 240
ggagaagcgc tgggaaagga aagccaggca gagaacgtct ccatcctgct gggacctggc 300
gcgaatatta aacgttcgcc actgtgcggg aggaacttcg agtatttctc ggaagatccg 360
tatctgacgg gcgagttggc cgcggcgcat attgcaggcg ttcaaagcca ggggtgcggc 420
acgtcgtgta agcatttcgc tgtcaacaac caggagcatc gccggatgac gacggatgct 480
gtggtggacg aacggacgct gcgcgaaatt tatttgaccg gcttcgagat tgccgtgaag 540
aaatcgcagc catggacggt catgtcggcg tacaaccgga tgaacggaac ctactgctcc 600
gaaaacgaaa cgttgctgac ccgcatctctg aaggaggaaat ggggccacga gggcatcgtc 660
gtatcggact ggggcgccgt caacgaagcg gctgcgagcg tggcggccgg catggagctg 720
gagatgccgt ccagccatgg catcgccaa aggaaaatcg tggcgccggg gaaagcggga 780
gaactgtccg tcgaggcgtt ggatcgggca gtgacgcggc ttttgactgt gattttcaaa 840
gctgtcgaca gccggaagac ggacgccact tacgacaagg aagcgcatca ctacttgcc 900
cgcgaaatcg ccccgcaatc gatgtgtgct ctcaaaaatg aaggcaatct gctcccgtg 960
gcaaagacgg gcaaaactggc gatcatcgga gccatggctg agcagggttcg ataccaaggt 1020
ggcggaagct cccacatcaa gccgacaaag ctggatagca tcagggacga gatcgaaaaa 1080
tcggccagaa gtgcggaat ccgttattcg aaagggtatc ttctcgaag cgacgagagc 1140
gacgagcttt tgctgaacga ggcaagcaa gccgcagctg actctgatgt cgcggtgctg 1200
ttcgtcgggc tgccggaccg ttacgaatcg gaaggctacg atcggacgca tctgaatttg 1260
ccggctaacc acatcgaact gatcagcgg atcgcacccg ttacgccgaa cgtcgttgtg 1320
atcttgagca acggttctcc cgtcgttatg ccgtggctgg gtcatgcaaa ggccgtgctc 1380
gaagcttacc tggcgggtca ggctgcgggc ggagcagatc cggacctgtt gttcggcgac 1440
gcaaatccga gcgcaagct ggcgagacg ttcccgcata gcctgaagca caatccgtcc 1500
catccttttt atcctggcga gggcgatcgg acggaatacc ggggaaggcat ttttgcggt 1560
tatcgtattt tcgacgcgaa ggatatagag ccgctgtttc cgttcggaca cggcttaagc 1620
tatacggcgt tttcctattc cggattgaag ctggacaaaa gcgagatgac agaccgggac 1680
atcgtgcaag tcccggtcaa cgtgaagaac acggggggac ggttcggcaa ggaaccgtt 1740
cagctttacg tccacagtcg gaattccagc gtcatctgct cggaaaaaga gctgaaaggc 1800
tttgcgaagg tatcgttaaa cccggaggaa gaacagacgg ttacgttcgc gcttgataaa 1860
cgaagctttg cctattacaa cgcggaattg aaagagtggc atgctgaaac gggcgaata 1920
gaaatattga tcggcagctc ttcgcgcgat atcgcgcttc ggacggcatt gacggccag 1980

```


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		
	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		
	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
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		
	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
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		
	590	600 605
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

17

18

Ser Ser Ser Arg Asp Ile Ala Leu Arg Thr Ala Leu Thr Val Gln
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
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
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
800 805 810
Gln Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Ile Ser Thr Ile Val Thr Asp
815 820 825
Leu Ser Val Val Arg Gly
830

<210> 3

<211> 4101

<212> DNA

<213> Paramecium sp.

<400> 3

atgaggatag gcctgaatat atcctttcag aaagcgttga gtgCGgtatt ggttttaacg 60
gtcgtgctag gactttggag cggttatcgt cctgttgta gCGctgCGgc cgctaataaa 120
tttacggtaa cctttgattc caatggatgc tcgataacgg caccagcagc ggatacggtt 180
aacgggaagc tagcttcgat tcctcttctt gcaaggaag gttatacatt tgaaggatgg 240
tatgaaagca agaatcctgc cattaacgca acagccatta acagcaaacac cgtgttcacc 300
aagaacacaa cagtatatgc catttggcaa gcgactatg ccaagctggc aacaaaatat 360
aaggatcagg aagtaacatt atcctacgct ccctcttcgg gagtcaagct gatcaaggaa 420
gacgggaccg cattaaccaa agccgaaatt tcggcctatg accaatcctt tccgatcttt 480
aaagatctga ataaaaacgg taaattggac cttatgaag attggcggct gccctataaa 540
gagcgtgctc tgaatttggc gtcgctgatg gccggcGcaa gcgataacgt cgaacaaatt 600
gcgggactga tgctgtacag cgcccattat gCGtaacat cCGcatgCC gaccgatgCG 660
cagaagcaat acctcgacgc cgaccatttg cgccatgttc tggtcacgac aagctcgtcg 720
ccggaatga atcgaaaatg gaataataac gtacaagcct ttacggaaaag cacctcattc 780
ggcattcctg ccaataactc ttcgatccg cgccattcag ccaacacgac atccggagtg 840
gaatactacg tggagaatgc gggcgtgtct gcatggcCGa cctcgtggg gctagcggcg 900
acttttaaatg tcgatacgat gaagcaattt ggtaaaatcg cctcgattga atatcgctcg 960
cttggcatat cgaccgCGct ttcacctcaa atcgatattg ctacggatcc tcgctggggc 1020
cggtttaacg gcacattcgg agaagacccc aagctcgcatt cCGctatggc aagagcttat 1080
gtagacgggt ttcagacgac ctatcgacag gggacgagca atacccgggt cgccggaggc 1140

19

20

tggggcatgg acagcgtcaa tgcgatgat aagcattggc cgggcggcgg cgccggagaa 1200
 ggcggacggg atgcgcatta tgattacggc aagtatgccg tgtaccggg agataatfff 1260
 gaagcgcatt taattccgtt cgtagacggc tctctgagtc tatccgacgg tacgggaatg 1320
 gcaacggcag ttatgcccta ttacaccatt tcttatatgc aaacgcctgg aagcgaacct 1380
 aacagctcca atcttccggg ggcaaagctg aatatggcga atgcctataa tgattacatg 1440
 atcaatggcg ttctgctga cgcttatcaa ttgaaggcg tctaacgac ggattggaac 1500
 gtatctggtc caaagactgc acccggcggc ggttttgaca gcgacattcc gggcatgac 1560
 tgggggcccg acgaccatta cggattaacg ggatttacga tggacgatat ggccgtaaga 1620
 gcgcccctgc ttcttgatgc cgggtctgat caattcgggg gacttaacac gaatgcgcca 1680
 atcgtaacgg cttacaacaa cgcaacgggc gaagataagg agaggctgct ggcacagctt 1740
 caagttagcg cctatcggct tctgatgaac gtcttcagaa cggggttatt cgaagatccg 1800
 tatctggacc cggctgagag caaagccacg gtcggccaag aagcgttcat ggctgccggc 1860
 taaaaagcgc agttggaatc gatggtattg ctaaaggata aaaacagcat cttgccctgta 1920
 tgcaccaata aaaaggtata tgcgcccga gcggatgcca ataccgttac ttgctgaag 1980
 gcatacttcg gcagtgaaaa cgtaattacg gaagcagcca acgcaaatgc ggccgattat 2040
 gcgatttgtt tcatgaactc cgtctctgca ggcggcgggt caaggaatgc ttcgcagcat 2100
 atcaacagct atacccgat taatctggac tttaaagctt ataccgacgac aaacgcgagc 2160
 gaaacgagca ttgcccgtta cccgctaaga gaaattccgg atgatttcac ctctgcgggt 2220
 ataggaatgg agaatcgtt ctacaggggc ctactacca atatttccgc tgcctccgca 2280
 acgatcaaca gcaacatagc cgccccaag gccagcggaa aaccggtcat tctttccgtt 2340
 aatatgtcca accctatggt catgggagag gttgagcctc atgcggatgt aatgctcgtc 2400
 aacttcggag ctcaaaaatc cgccatactg gatatgctta cgggctctac tgcctacggc 2460
 aagcaaggcg gtccatctc ggctgtctat cctaccggca tgcctgcaat gcaattgcct 2520
 aaagatatgg atgaagtcga gctgcaatat gaagatgccc ctccgcatat ggtcagctac 2580
 acggacagcc agggaaatgt ttacgacttt ggctttggac tgacctgga ggcaggtatg 2640
 aagaggattg atgcatcgg aaatcccgt tatactcctt tctgtgccgg aaatacgtg 2700
 ccgatgactc atcccgttaa tatgggcacc aatgaaaaca gcccttatct gattgccaat 2760
 cgggcaaaag tgaatttga tttcggctat aaggaatcgg cagccgataa ggaaaatgca 2820
 aaaatcacca aaatagtaaa taaaggttca accgtaactc ctgccgaacc gccatcccgc 2880
 gccggacaag cattcgggg ctggtataac ggaaccgaca aatttgattt ctccaaccg 2940
 attactgaag atatcgttct tacagcaaaa tggggtgaag aaggagcggc tccgacgac 3000
 acggctccag cctcgtcgt ggtcggacag gacttcgac ttacattgg cattaaaggc 3060
 atcaggaag ggtttgactc cctggcggta gtcgtgaatt atgatccgga gcaggctcag 3120
 ttgacactg taagcgtgc ggaaggcgca ctgagcttga gtgagcaagc ggtcgttccg 3180
 ctgcttccg atcttcacgt tctcggaaaca ggcgtcaagc ccgacgagg acaaatctg 3240
 attatctgt caacgacagg tcaactggc gagctggac gcgactctg ggttctccat 3300
 ggcaaggcca gagctggcg tgcagcagg acgactatta tagctttaag cgattttgaa 3360
 gtatcggcta acggctctc ccaatcgtg aatacggatg gtagttcgg ctccattcaa 3420
 attcgtttgg ctgatcatgc ggcgctggca tccgcatca gcgaagccga gcagctgctt 3480
 gccaggctg tgcagggctc gcagccgggt cagtaccgg ctggcaccaa agcggcgtg 3540
 cggcttggc ttaatcaggc gattcggctc agggataac ctctggcgat aaatgaacag 3600
 attgctcaag cggcgggtgc gctcaacaat gccattaaac tattcaagag ctggtggaac 3660
 ccggatctt ctccctcggc agacaagatt gcgttgaat cggcgatcgc ggcggcgcag 3720
 acgaagctgg gtcaggcgaa ggaaggcacg aagggtggct aatatccgc atcggccatc 3780
 gctgctgta aagcggctgt tcaaacggct aacgcagtga agaattgatt gacggcatcg 3840
 caatatccg ttgatcaagc gacggcaaaa ttaaagcagg cggttgccga attcaccgag 3900
 aagatgatta cgctgttcc cgggtcaaac ggagtgacgc tgagcgactt gtcctattg 3960
 gcgaagtact acggcgtaaa atcgaccgat ccggaatgga gcaatgtcga gaaggcagac 4020
 ctcttcgaca gcggtgaaat tacgattcgc gagctggcgg caattgcaag aatgatgtc 4080
 gacaactggc tggatcaata a 4101

	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
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			
	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			
	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			
	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			
	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			
	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
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			
	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
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			
	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			
	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			
	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			
	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			

	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
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	
	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
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	
	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

<210> 5

<211> 1716

<212> DNA

<213> Paenibacillus sp.

<400> 5

```

gtggttaatt tacgagcgaa accattttat ctggatgatg atgccgtgat ttgggtgcaa 60
agcacattag aaaaaatgga tatacgagcc aaggttggcc aattgttttg tgaaattgtg 120
tgggacaagc cgggcatgga catagacagt ctgtttactg atatcgaacc gggcggaatt 180
atgtttcgtc ctgatacagg ggccaacatt caaaaatcgg ccaggtatgt gcagcagaag 240
gctcaaattc cgctgttaat tgccgtaat ctcgaacgtg gcggcagcgg tggaaacggt 300
gggtttaagg acgggacctt ctttggttcg cccatgcaag ttgctgctac cgatgatgaa 360

```


31

32

Asp Leu Asn Arg Ile Leu Arg Met Ala Lys Gly Tyr Met Arg Gly		
	170	175
Ala Tyr Glu Cys Gly Val Ala Val Ser Ile Lys His Trp Pro Gly		
	185	190
Asp Gly Val Asp Phe Arg Asp Gln His Leu Leu Ala Ser Val Asn		
	200	205
Ser Met Ser Val Glu Glu Trp Asn Ala Ser Phe Gly Trp Leu Tyr		
	215	220
Lys Glu Met Ile Asp Ala Gly Ala Asn Thr Leu Met Ala Ser His		
	230	235
Ile Lys Leu Pro Ala Tyr Ser Arg Lys Leu Arg Pro Gly Ile Lys		
	245	250
Asp Glu Glu Ile Met Pro Ala Ser Leu Ala Pro Glu Leu His His		
	260	265
Gln Leu Leu Arg Glu Gln Leu Gly Phe Asn Gly Leu Ile Val Ser		
	275	280
Asp Ala Thr Gln Met Ala Gly Phe Thr Val Ser Met Glu Arg Glu		
	290	295
Lys Ala Val Pro Ala Ala Ile Ala Ala Gly Cys Asp Met Phe Leu		
	305	310
Phe Thr Ile Asn His Arg Glu Asp Val Gln Tyr Met Leu Arg Gly		
	320	325
Val Glu Gln Gly Ile Ile Ser Gln Glu Arg Leu Asn Glu Ala Val		
	335	340
Thr Arg Ile Leu Ala Leu Lys Ala Ser Leu Gly Leu His Arg Lys		
	350	355
Gln His Glu His Asn Leu Val Pro Gly Thr Asp Ala Leu Gln Leu		
	365	370
Leu Leu Cys Asp Gln His Val Ser Trp Ala Lys Glu Cys Ala Asp		
	380	385
Gln Ala Ile Thr Leu Ile Lys Asp Arg Glu Gln Leu Leu Pro Leu		
	395	400
Ser Thr Glu Arg His Lys Arg Ile Leu Leu Gln Thr Ile Thr Asn		
	410	415
Glu Pro Thr Asp Glu Gln Gly Phe Thr Ala Glu Ser Leu Gln Phe		
	425	430
Lys Arg Leu Leu Glu Gln Ser Gly Phe Glu Ile Thr Asp Phe Arg		
	440	445
Ser Glu Glu Met Pro Gly Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ser Ile Ser		
	455	460
Glu Leu Lys Gln Gln Thr Asp Leu Ile Val Tyr Tyr Val Asn Met		
	470	475
Arg Val Ala Ser Asn Gln Asn Ser Val Arg Leu Ser Trp Ala Asp		
	485	490
Phe Leu Gly Glu Asp Ser Pro Lys Tyr Ala Lys Asp Ile Pro Val		
	500	505
Val Phe Ile Ser Ala Ser Asn Pro Tyr His Leu Ile Asp Val Pro		
	515	520
Met Val Ser Thr Tyr Ile Asn Ala Tyr Ser Ser Asn Gln Tyr Val		
	530	535
		540

33

34

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 gcctcaacaa gtcagccttc aattttgcca 60
 aagcctgtaa gctatacagt gggatccggg caatttgttt taacaaagaa cgcttccatc 120
 ttgtagccg gcaataacgt aggagaaacg gatgagctgt tcaacattgg acaagccctc 180
 gccaaaaaac tgaatgcatc gaccgggtat accatcagtg tcgtcaaatc aaaccagccg 240
 acggctggaa gtatttattt gactacagtt ggcgaaatg ccgcccctgg caatgaaggg 300
 tatgatttaa tcacgacttc caatcaggtt acgcttactg caaataaacc ggaaggagtc 360
 tttagaggca atcaaacctt atgacagctc ttgccggcgg gtattgaaa gaacaccggt 420
 gtttccggcg tgcaatgggt aatcccccat tccaatatta gcgacaagcc cgaatatgaa 480
 tatcgcgac ttatgcttga tgtggctcga cacttcttta ccgtggatga agttaaactg 540
 cagattgac tggcctcgca gtataagatc aacaaatttc atatgcattt gctgacgat 600
 cagggctggc gtattgaaat taaatcatgg cctgatctca tagagatcgg aagcaagga 660
 caggtaggcg gcggtcccgg cggatattat acgcaggagc agttcaaaga tattgtcagc 720
 tatgcccgtg aacgatacat tgaagttatt ccggaaatcg atatgcccgg tcatacgaat 780
 gccgcttag cttcttatgg tgaacttaat cctgatggaa aaagaaaagc tatgcccacc 840
 gatacggctg taggtacag cagcctcatg cctcgcgccg agattacgta tcaatttgtt 900
 gaagatgca tcagcgagct tgcccgaata tcgccttcgc cttatattca tctgggtggc 960
 gatgaatcta acgcaacgtc ggctgccgac tatgattatt tttttggcag agttacggct 1020
 attgctaaca gttacggcaa gaaagtcgtt ggctgggacc cgtccgatac gtcaagcgga 1080
 gcaactagcg atctgttct gcagaactgg acttgacgcg cctcaaccgg aactgcggca 1140
 aaagcaaaag ggatgaaggt catcgtatct cctgcaaatg cttatcttga catgaaatac 1200
 tacagtgatt cgccaattgg ttacaatgg agaggatttg tcaatacaaa cagagcttat 1260
 aattgggacg cgaccgattg catcaagga gcgaatattt acggagttga aagtacatta 1320
 tggacagaaa cctttgtaac acaagatcat ttggattata tgctctatcc gaaattatta 1380
 tcaaatgctg aagtcggctg gactgcccg ggagatcgaa actgggatga ttttaaagaa 1440
 aggctgatcg aacataccc aagattgcaa aataaaggaa ttaaattttt tgccgaccct 1500
 atgtgtggg agcttccgat tgtccagatt aattcagaat ggaagatgga tgaaggacc 1560
 ggcaccgctg tgaaggacac ttccggttat ttaaaccgaa ctttagttgg cggcgcaaag 1620
 tggacagcgg gcaacaagg aaatgggta agctttgatg gaagctcggg ctacataaat 1680
 ttaggcggtc aggatataac agggaactgg accgcagcag tatgggttta cggccagcca 1740
 aatacaacga ataataaac gctgctgagc ggcaaacctt cagcaatcaa gatcaaccag 1800
 tataataaaa caggtaaagt cgggattacc atttacgta cgaaagacta tacgtacaat 1860
 tatagcattc catccaataa atggactcat ctgacgttcg taggcacaag cacggggact 1920
 gcgctttatg aaaacggcgt gctgaaagaa acaatcgccc caaaaatgaa tggccaatg 1980
 gctttggtgg gagcggaaaa aacgggagga tccggagatt taaccttta tttagagga 2040
 agtctggatg aattgaaat attcaacaga gcgctaagcg caagcgaggt tgttgaattg 2100
 gcaaaatcgc cggcgcgcaa ggctcgctc acaggtcctc aatcggcgaa tcccgtcaa 2160
 tccttcgatg taaaaatggg gttgagcgac gtttcccaa gcgaattcgg acaaatgtat 2220
 gctcaagact ggacgattaa ctatgattcg gcgaagtgc agttagattc gattacatcg 2280
 ctgcaagata agtttcaagt gatcgaccaa aaggagtgg cgccgggaca aatccgatt 2340

35

36

gtggctgcga atgcagctgc gaaccaagga gtgactccgc aaggcgattt gttcgcattc 2400
 aaatttacag ttaaagcggg aaccgatgac aagacgacaa tttcggcaga ccatattggt 2460
 attggcaacg cacaggggaa agaattggag atcgcggggg ccactcacga gatccaggtc 2520
 agcatcccag tagacaaatc gcaattgaat gtactgattg cgaacgctca agccaagcat 2580
 gatgcccggg tggaggaaa tgaagacggg ttgtacgccg caggttccaa agcgcaattg 2640
 caaacggcta ttcatacagc caaagcggta gcagacaatt cgaatgcatc tcaacaacag 2700
 gtggatagtg cgaatccgc attggaagag gccgttcaag tatttgaaag caagaaaata 2760
 tctgcagacg taaacggaga tggtcaggtc tctattggag atttggcaat cattgcccgt 2820
 gcttacggca aagaggaagg tcaggctggc tggataaaa aagcggatgt gaatcacgac 2880
 ggcaaggttg acattataga ccttacaatc gtagccaagc cgatcttgca gatataa 2937

<210> 8

<211> 978

<212> PRT

<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
				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
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
				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
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			
	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			
	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			
	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			
	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			
	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
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			

	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
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			
	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			
	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			
	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			
	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			
	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		

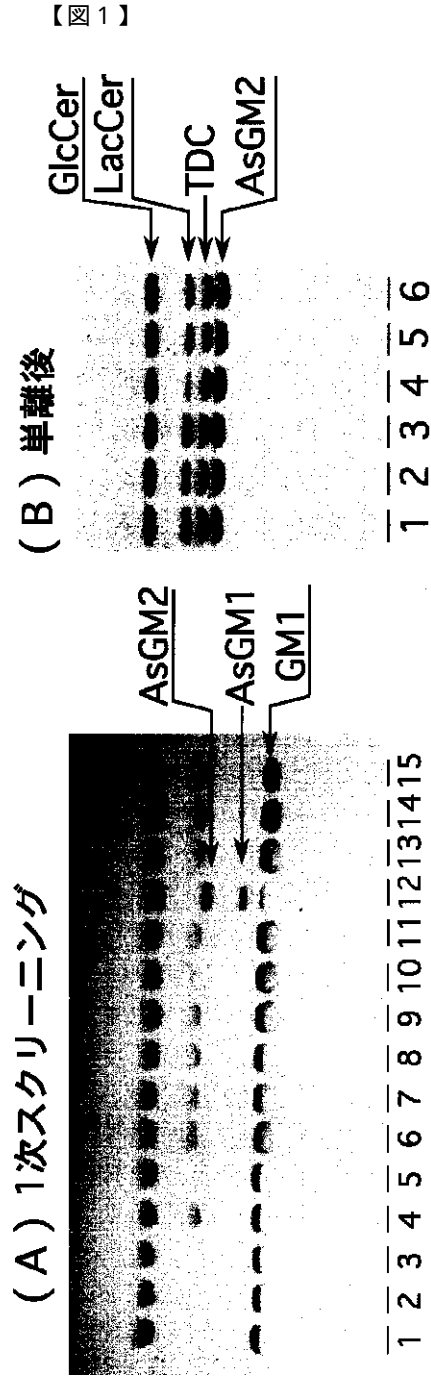
【図面の簡単な説明】

【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。

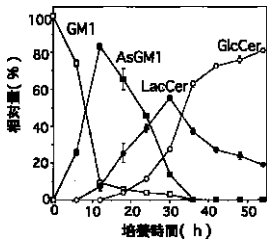
【図 2】 T S 1 2 株による G M 1 の分解様式を示す薄層クロマトグラフ。

50 【図 3】 T S 1 2 株の N B D - G M 1 の分解様式を示す

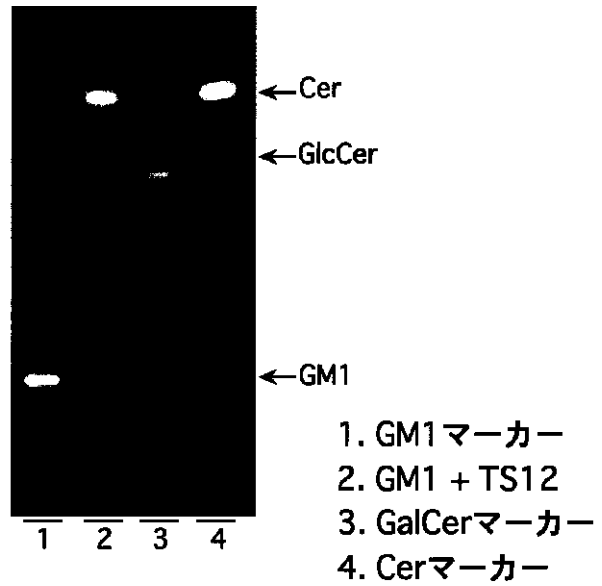
示すグラフ。



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
C 1 2 R 1:01)

識別記号

F I

テームコード(参考)

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA12 CA04 DA05 DA06
EA04 FA02 GA11 HA03
4B050 CC01 CC03 DD02 LL05
4B064 AF21 CA02 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01Y AA26X AB01 BA01
CA16 CA19 CA44