

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3709435号
(P3709435)

(45) 発行日 平成17年10月26日(2005.10.26)

(24) 登録日 平成17年8月19日(2005.8.19)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 9/10

請求項の数 7 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-307067 (P2001-307067)
(22) 出願日 平成13年10月3日(2001.10.3)
(65) 公開番号 特開2003-111590 (P2003-111590A)
(43) 公開日 平成15年4月15日(2003.4.15)
 審査請求日 平成13年10月3日(2001.10.3)

特許法第30条第1項適用 平成13年8月20日 日本応用糖質科学会発行の「JOURNAL OF APPLIED GLYCOSCIENCE 第48巻 第4号」に発表

(73) 特許権者 501145295
 独立行政法人食品総合研究所
 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12
(74) 代理人 100074077
 弁理士 久保田 藤郎
(74) 代理人 100086221
 弁理士 矢野 裕也
(72) 発明者 舟根 和美
 茨城県つくば市観音台2丁目1-12 独立行政法人 食品総合研究所内
(72) 発明者 小林 幹彦
 茨城県つくば市観音台2丁目1-12 独立行政法人 食品総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変デキストランスクラーゼ、その遺伝子組み換え体、グルカンの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼのスクロース・デキストラン結合リシン部位を、同菌の異種のデキストランスクラーゼのスクロース・デキストラン結合リシン部位と交換してなる改変デキストランスクラーゼ。

【請求項2】

ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼのムタン結合部位を、同菌の異種のデキストランスクラーゼのムタン結合部位と交換してなる改変デキストランスクラーゼ。

【請求項3】

ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼのデキストラン結合リシン部位を、同菌の異種のデキストランスクラーゼのデキストラン結合リシン部位と交換してなる改変デキストランスクラーゼ。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかの改変デキストランスクラーゼをコードする遺伝子を挿入したベクター。

【請求項5】

請求項4のベクターで形質転換された遺伝子組み換え体。

【請求項6】

請求項1～3のいずれかの改変デキストランスクラーゼを基質に作用させることを特徴

とするグルカンの製造法。

【請求項 7】

請求項 5 記載の遺伝子組み換え体が生産する改変デキストランスクラーゼを基質に作用させることを特徴とするグルカンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、改変デキストランスクラーゼ、その遺伝子組み換え体およびグルカンの製造法に関し、詳しくはロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼの活性中心領域の一部を、同菌の異種のデキストランスクラーゼの活性中心領域と交換してなる改変デキストランスクラーゼ、その遺伝子組み換え体およびグルカンの製造法に関する。

10

本発明の改変デキストランスクラーゼを用いて製造されるグルカンは、 α -1,3 結合、 α -1,4 結合および α -1,6 結合の割合が、本来のものとは異なるという特性を有している。

【0002】

【従来の技術】

グルカンは、デンプンやセルロース等の D - グルコースを構成単位とする多糖（デキストラン等）の総称であり、微生物や植物の細胞壁の主要構成成分として知られているものもある。

20

様々な構造を有するグルカンを生産するために、これまでは異なった構造のグルカンを生産する菌をスクリーニングし、それらの菌株を培養してグルカンの発酵生産を行う方法が採用されている。

また、ロイコノストック (Leuconostoc) 属菌のデキストラン生産性向上を目的としてニトロソグアニン等を用いた変異処理も試みられている。さらには、ロイコノストック属菌やストレプトコッカス (Streptococcus) 属菌によって産生されるデキストランスクラーゼ [EC 2.4.1.5] (以下、DS と略記することがある。) あるいはグルコシルトランスフェラーゼ [EC 2.4.1.125] (以下、GTF と略記することがある。) をコードする遺伝子を大腸菌に導入して、該酵素を生産させ、この酵素を用いてデキストランを生産することは研究室レベルで行われている。

30

【0003】

DS は、前記の微生物等により生産される分子量 16 万前後の酵素で、基質であるスクロースを分解する反応を触媒し、フルクトースを遊離すると同時にグルコース部分を多糖またはオリゴ糖に転移して、 α -1,6 結合を主体とする高分子の水溶性 α -D - グルカンであるデキストランを合成する酵素である。

また、ロイコノストック属菌由来のグルカン合成酵素には、水溶性のグルカンを合成する酵素の他に、 α -1,3 結合を主体とする非水溶性のグルカンを合成する酵素が存在し、いずれも GTF と呼ばれている。複数の GTF の作用で、固着性の強いムタンと呼ばれるグルカンを形成する。

本来のデキストランとは異なる構造を有するデキストランを得るには、これまでは目的の構造を有するデキストランを生産する菌株を、スクリーニングにより探し出すこと以外には有効な方法がなく、膨大な時間と労力を必要としていた。

40

【0004】

DS や GTF によって生産されるグルカンの構造を変化させるために、これらの酵素をコードする遺伝子に、3' - 末端のグルカン結合領域のデレーション処理を行い、該結合領域を異なる酵素同士で交換する、部位特異的変異法を用いて特定のアミノ酸残基を別のアミノ酸に置き換える等の処理を行い、変異酵素を作製することが行われている。

ここで、グルカン結合領域とは、カルボキシ末端の繰り返し構造を持った領域を言い、これをデレーション処理することによって、カルボキシ末端が短くなった酵素が生産されるのである。

50

【 0 0 0 5 】

しかし、上記した 3' - 末端のグルカン結合領域のデレーション処理や異なる酵素間での同領域の交換等の従来の方法では、生産するグルカンの構造をほとんど変えることはできなかった。これは、グルカン結合領域の役割が、単純にグルカンと結合するのみで、酵素反応自体には関与していないことが明らかとなったことから裏付けられている。

また、部位特異的変異法では、生産するグルカンの構造をある程度変えることが可能であるが、構造を大きく変化させることは未だ成功していない。そのため、酵素の転移反応様式を決める部位が特定されておらず、生産物の構造制御を行うことは困難である。

【 0 0 0 6 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明の目的は、DS や GTF において、従来注目されていなかった重要な酵素の活性中心部位を探索し、これらの部位を異なる酵素同士で交換して改変酵素を得ることにより、生産されるグルカンの構造を大きく変えることである。

【 0 0 0 7 】

【 課題を解決するための手段 】

請求項 1 記載の本発明は、ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼのスクロース・デキストラン結合リシン部位を、同菌の異種のデキストランスクラーゼのスクロース・デキストラン結合リシン部位と交換してなる改変デキストランスクラーゼである。

請求項 2 記載の本発明は、ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼのムタン結合部位を、同菌の異種のデキストランスクラーゼのムタン結合部位と交換してなる改変デキストランスクラーゼである。

請求項 3 記載の本発明は、ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼのデキストラン結合リシン部位を、同菌の異種のデキストランスクラーゼのデキストラン結合リシン部位と交換してなる改変デキストランスクラーゼである。

請求項 4 記載の本発明は、請求項 1 ~ 3 のいずれかの改変デキストランスクラーゼをコードする遺伝子を挿入したベクターである。

請求項 5 記載の本発明は、請求項 4 のベクターで形質転換された遺伝子組み換え体である。

請求項 6 記載の本発明は、請求項 1 ~ 3 のいずれかの改変デキストランスクラーゼを基質に作用させることを特徴とするグルカンの製造法である。

請求項 7 記載の本発明は、請求項 5 載の遺伝子組み換え体が生産する改変デキストランスクラーゼを基質に作用させることを特徴とするグルカンの製造法である。

【 0 0 0 8 】

【 発明の実施の形態 】

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の改変 DS は、ロイコノストック・メセンテロイデスの DS のムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位またはデキストラン結合リシン部位を、同菌の異種の DS のムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位およびデキストラン結合リシン部位のうち対応する部位と交換してなるものである。すなわち、DS の N 末端側に存在するデキストランおよび / またはスクロースの結合に関与するリシンを含む部位、硫酸アンモニウム存在下でムタンに結合する部位およびその近傍を含む部位を、遺伝子組み換え技術により 2 種類の DS 酵素分子間で交換したキメラ酵素である。

【 0 0 0 9 】

本発明の改変 DS を得るには、まず改変していない DS をコードする遺伝子を取得する必要がある。具体的には、公知のロイコノストック・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) 株、たとえば NRRL B - 512F 株の DS 遺伝子 (DDBJ アクセッション・ナンバー: U81374)、NRRL B - 1299 株の DS 遺伝子 (DDBJ アクセッション・ナンバー: U38181, AF030129)、NRRL B - 1355 株の DS 遺伝子 (DDBJ アクセッション・ナンバー: AJ250172)、NRRL

10

20

30

40

50

B-742CB株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:AF294469)等およびDS様遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:AB020020)に塩基補完をして活性型DSをコードするよう改変した遺伝子(K. Funane et al., Bioschi. Biotechnol, Biochem., 64(2000)29-38)を用いることができる。ここで、DS様遺伝子とは、DSをコードする領域中に塩基の欠損が存在するためにフレームシフトが生じ、この欠損部分の直後(欠損箇所から4塩基下流)に終止コドンが現れるため、通常のDSよりも分子量が3分の2程度と小さく、グルカン結合領域のすべてを欠損したタンパクをコードする遺伝子のことである。

【0010】

ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の場合、まず改変していないDS遺伝子を組み込んだ組み換えDNAを、舟根らの方法(K. Funane et al., Bioschi. Biotechnol, Biochem., 64(2000)29-38)に従って作製する。すなわち、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株を2%グルコースを含む培地(組成:2%グルコース, 1.5%リン酸水素二カリウム, 0.5%酵母エキス, 0.25%ペプトン, 0.005%CaCl₂・2H₂O, 0.001%MgSO₄・7H₂O, 0.001%MnCl₂・4H₂O, 0.001%NaClを塩酸でpH7.4に調整したもの)等で嫌氣的に25~30℃、好ましくは30℃で、12~24時間、好ましくは一晩培養する。

【0011】

培養した該菌株からのゲノムDNAの精製は、Wilsonらの方法(Wilson et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (1987)2.4.1-2.4.2, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)に従って行う。すなわち、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株を2%グルコースを含む培地(組成:2%グルコース, 1.5%リン酸水素二カリウム, 0.5%酵母エキス, 0.25%ペプトン, 0.005%CaCl₂・2H₂O, 0.001%MgSO₄・7H₂O, 0.001%MnCl₂・4H₂O, 0.001%NaClを塩酸でpH7.4に調整したもの)5mlに植菌し、嫌氣的に30℃で一晩培養する。

培養終了後、遠心分離により集菌し、これを12mgリゾチーム, 10mMトリス-塩酸(pH8.0), 1mMEDTA溶液567μlを加え、37℃で3時間インキュベートし、菌体を溶解(溶菌)する。さらに、10%SDSを30μlと20mg/mlプロテアーゼKを3μl加え、37℃で1時間インキュベートする。

続いて、CTAB/NaCl(10%セチルトリメチルアンモニウムクロリド, 0.7M NaCl)80μlを加え、65℃で10分間インキュベート後、常法に従いフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、目的とするゲノムDNAを回収する。

【0012】

DSをコードする遺伝子は、該遺伝子を有する菌株から上記の方法により抽出したゲノムDNAを鋳型として、ポリメラーゼチェーンリアクション(以下、PCRと略記することがある。)法を行うことによっても取得することができる。PCRを行う際のプライマーは、たとえばロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)の場合、DS遺伝子の上流と下流について明らかになっている塩基配列を基に設計した30ベース(塩基)前後の長さの1対を用いる。具体的には、配列表の配列番号1および2記載の1対のプライマーを用いる。また、プライマーとしては、適当な制限酵素認識部位、たとえば5'-末端側にNcoI認識部位、3'-末端側にXhoI認識部位を導入するように設計されたプライマー(配列表の配列番号3および4)を用いることもできる。

このとき行うPCRについては、長鎖DNAの増幅に適したDNAポリメラーゼ、たとえばTakara LA Taq(タカラ酒造社製)等を用いて、常法に従って行うことができる。たとえば、PCRについては、DNAの変性は94℃で1分間、プライマーとのアニーリングは50℃で1分間、ポリメラーゼ伸長反応72℃で5分間のサイクルを30回行う。

【0013】

10

20

30

40

50

また、DSをコードする遺伝子は、上記の方法の他に、ゲノムDNAを適当な制限酵素で切断してから、ファージベクター等に挿入したゲノムDNAライブラリーより得ることもできる。具体的には、たとえば制限酵素EcoRIでゲノムDNAを完全に切断し、EcoRI認識部位を有するファージであるgt10(Stratagene社製)等にライゲーションした後、Gigapack II gold packaging extract (Stratagene社製)等と共にパッケージングする。

上記によって得られたゲノムDNA断片を組み込んだバクテリオファージが、ゲノムDNAライブラリーである。これを、常法によってコンピテントセルとした大腸菌NM514株等にインフェクションし、形質転換した大腸菌を得る。

【0014】

たとえば、大腸菌NM514株の場合、0.2%マルトース、10mM MgSO₄を含むTB培地(0.5%NaCl, 1%トリプトンをNaOHでpH7.4に調整)に植菌し、37℃で4~6時間培養する。

培養後、該大腸菌をNZY固体培地(組成: 0.5%NaCl, 0.2%MgSO₄・7H₂O, 0.5%酵母エキス, 1%NZアミンをNaOHでpH7.5に調整したもの)に植菌し、37℃で一晩培養する。培養後のプレートからコロニーを1つ取り、これを上記の0.2%マルトース、10mM MgSO₄を含むTB培地に接種して、37℃で4~6時間程度培養する。

【0015】

培養後、遠心分離(2000rpm、10分間)により沈殿した該大腸菌を集菌し、これをOD₆₀₀が0.5となるように10mM MgSO₄に懸濁し、これをコンピテントセルとする。この大腸菌懸濁液600μlに、上記で調製したロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のゲノムDNAのEcoRI断片を含むgt10等のバクテリオファージ1~5μlを加え、37℃で15分間保温する。

続いて、NZY固体培地に2%アガーロースを添加したトップアガー4mlを溶解した後に48℃以下に冷却したものを加えて混合し、固まらないうちにNZY固体培地のプレートに重層する。トップアガーが固まった後、30~37℃、好ましくは37℃で、6~12時間、好ましくは8時間培養する。これにより得られたプラークは、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のゲノムDNAのEcoRI断片を組み込んだgt10等のバクテリオファージによるものであり、このプラークをナイロン膜等にトランスファーさせ、これをスクリーニングする。

【0016】

スクリーニングは、次の手順で行う。まず、先に抽出したゲノムDNAを鋳型として、一般的にDS遺伝子を検出するために相同性のあるアミノ酸配列から設計したプライマー(配列表の配列番号5)およびロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー: U81374)配列から設計したプライマー(配列表の配列番号6)を用いて、DNA断片をPCR法で増幅する。なお、配列番号5記載のプライマーについては、7番目のチミン(t)をシトシン(c)に置換したものについても同様に用いることができる。PCRについては、DNAの変性は92~96℃、好ましくは94℃で、30秒~1分間、好ましくは1分間、プライマーとのアニーリングは50~60℃、好ましくは50℃で、1~2分間、好ましくは1分間、ポリメラーゼ伸長反応70~76℃、好ましくは72℃で、1~2分間、好ましくは1分30秒間のサイクルを25~30回、好ましくは25回行う。

こうして得たPCR増幅産物を、Dig DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim社製)等を用いてジゴキシゲニンでラベルし、これをDNAプローブとする。このDNAプローブと同キット等を用いて、ナイロン膜等にトランスファーさせたプラークをスクリーニングすることにより、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー: U81374)を含むクローンを得ることができる。

【0017】

10

20

30

40

50

上記の方法で得られるロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)のクローンは、配列表の配列番号7記載の塩基配列において、4067番目のアデニン(a)のところにEcoRI認識部位があるため、これより上流のDNA断片、すなわち4067番目のアデニン(a)以降が欠損している1~4066番目までのDS遺伝子の断片しか得られない。このため、再びゲノムDNAを鋳型として、4067番目より上流に位置する配列を基に設計したプライマー(配列表の配列番号8)と終止コドン(taa)の下流にXhoI認識部位を導入するように設計されたプライマー(配列表の配列番号9)を用いてPCR法により増幅することにより、4067番目以降のDS遺伝子のDNA断片を得た後、2つのDNA断片をつなげ、完全長のクローンとする必要がある。

10

【0018】

すなわち、上記によって作製したXhoI認識部位を導入した4067番目以降のDS遺伝子のDNA断片については、制限酵素であるEcoRIとXhoIで切断してEcoRI-XhoI断片とした後、1~4066番目までのEcoRI断片において塩基が欠損している3'-末端部分とつなげることによって、塩基の欠損を補う。

上記によって得られた1~4066番目までのEcoRI断片と4067番目以降のEcoRI-XhoI断片で3'-末端部分を補ったものを、pBluescript SK⁺(Stratagene社製)等に制限酵素処理およびライゲーション処理を行うことにより、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)を含むクローンを得ることができる。

20

なお、PCRについては、DNAの変性は92~96℃、好ましくは94℃で、30秒~1分間、好ましくは1分間、プライマーとのアニーリングは50~60℃、好ましくは50℃で、1~2分間、好ましくは1分間、ポリメラーゼ伸長反応70~76℃、好ましくは72℃で、1~2分間、好ましくは1分30秒間のサイクルを25~30回、好ましくは25回行う。

【0019】

得られたDS遺伝子をプラスミド等のベクター(たとえばpET23d(Novagen社製))に挿入した組み換えベクターを作製し、該組み換えベクターを大腸菌等の宿主に取り込ませて形質転換することにより、DS遺伝子を保持した遺伝子組み換え体得られる。

組み換えプラスミドの調製は、得られたDS遺伝子のDNA断片を適当な制限酵素で切断した後、同じ制限酵素で切断したpET23dベクター(Novagen社製)等のベクターにライゲーションすることにより、完全なDSをコードするDNAフラグメントを含む組み換えベクターを作製することができる。

30

【0020】

また、鋳型とするDNAによっては、塩基を補完する必要がある。たとえば、DDBJにおいてアクセッション・ナンバー:AB020020として登録されている塩基配列については、翻訳領域中に5塩基(cagat)の欠損があり、フレームシフトが生じるため、通常的位置とは異なる位置に現れる終止コドンによって通常のDSの3分の2程度の長さしかコードされていない。このため、C末端の繰り返し配列であるグルカン結合領域すべてが、欠損したものとなる。

40

このような場合、欠損している塩基を補完する変異を導入することによって、フレームシフトが生じず、通常の長さの繰り返し構造を有するDSが得られる。このため、塩基の欠損がある場合には、欠損している塩基を補完する変異を導入することが好ましい。

【0021】

上記の塩基を補完する変異を導入する場合には、塩基を補完した後に、組み換えベクターにライゲーションする。

塩基を補完した組み換えベクターの作製は、まず上記した方法により、塩基を補完していないDNAフラグメントを含む組み換えベクターを作製する。次に、該組み換えベクターを鋳型として、配列表の配列番号10記載のプライマーとMutant-super kmキット(タカラ酒造社製)等のキットを用い、欠損している塩基を補完する変異を入れ

50

たDNA断片を作製し、該変異部分を含む部位を適当な制限酵素で切断し、これと塩基を補完していないDNAフラグメントを含む組み換えベクターの相当する部分と交換することによって行う。

【0022】

本発明において、交換導入するDSの活性中心領域としては、次の3種類が存在する。すなわち、ムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位およびデキストラン結合リシン部位である。

DSのN末端活性中心領域中におけるスクロースおよびデキストランと結合するリシン残基を含むと考えられる部位は、酵素の種類によって多少異なるが、既に公知である(K. Funane et al., Oyo Toshitsu Kagaku., 42(1995)27-35)。たとえば配列表の配列番号11に示すように、塩基を補完したDS(DDBJアクセッション・ナンバー: AB020020)では、322番目のアミノ酸であるアスパラギン(Asn)から341番目のトリプトファン(Trp)付近、391番目のイソロイシン(Ile)から410番目のセリン(Ser)付近である。

10

また、配列番号12記載のDS(DDBJアクセッション・ナンバー: U81374)では、355番目のアミノ酸であるアスパラギン(Asn)から374番目のトリプトファン(Trp)付近、424番目のイソロイシン(Ile)から443番目のアラニン(Ala)付近である。

【0023】

デキストランのみと結合するリシン残基を含むと考えられる部位も、酵素の種類によって多少異なるが、既に公知であり(K. Funane et al., Oyo Toshitsu Kagaku., 42(1995)27-35)、たとえば配列表の配列番号11に示すように、塩基を補完したDS(DDBJアクセッション・ナンバー: AB020020)では、957番目のアミノ酸であるセリン(Ser)から971番目のグリシン(Gly)付近、1000番目のアラニン(Ala)から1019番目のアスパラギン(Asn)付近である。

20

また、DS(DDBJアクセッション・ナンバー: U81374)では、配列表の配列番号12に示すように、970番目のアミノ酸であるセリン(Ser)から984番目のグリシン(Gly)付近、1013番目のアラニン(Ala)から1032番目のアスパラギン(Asn)付近である。

【0024】

N末端の活性中心領域におけるムタンと結合する部位も、同様に酵素の種類によって多少異なるが、既に公知であり(K. Funane et al., Bioschi. Biotechnol, Biochem., 62(1998)123-127)、たとえば配列表の配列番号11記載のアミノ酸配列に示すように、塩基を補完したDS(DDBJアクセッション・ナンバー: AB020020)では、278番目のアミノ酸であるグルタミン酸(Glu)から293番目のセリン(Ser)付近、681番目のフェニルアラニン(Phe)から701番目のプロリン(Pro)付近、1000番目のアラニン(Ala)から1009番目のメチオニン(Met)付近である。また、配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列に示すように、DS(DDBJアクセッション・ナンバー: U81374)では、311番目のアミノ酸であるグルタミン酸(Glu)から326番目のアラニン(Ala)付近、709番目のチロシン(Tyr)から729番目のプロリン(Pro)付近、1013番目のアラニン(Ala)から1022番目のイソロイシン(Ile)付近である。

30

【0025】

上記の活性中心部位を、ロイコノストック・メセンテロイデスのDSと、同菌の異種のDSの間で交換して種々の改変DSを作製する。

40

【0026】

改変酵素群を作製するためには、置換すべきアミノ酸配列をコードする遺伝子を適当な制限酵素で切断した後、これを異種のDSまたはGTFをコードする遺伝子を同じ制限酵素で切断した置換すべきアミノ酸配列をコードする遺伝子を除いた部分と互いに結合させることにより、他のDS遺伝子に交換導入することができる。

50

適当な制限酵素認識部位が存在しない場合には、PCR技術を応用することにより、コードするアミノ酸を変化させずに制限酵素部位を導入し、同様に遺伝子の交換導入を行うことができる。

また、公知のストレプトコッカス属菌由来のGTF遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー：M17361、M29296、M17391、D90213、M30943、U12643、M64111、L35495、L35928、D13928、M22054、Z11872、Z11873等)間での部分的交換、あるいはDS遺伝子とGTF遺伝子間での部分的交換によって作製した改変DSを用いても、本発明によるグルカンの生産を行うことができる。

【0027】

他のDS遺伝子のムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位および/またはデキストラン結合リシン部位と交換した改変DS遺伝子を、プラスミド等のベクター(たとえばpET23d(Novagen社製))に挿入し、大腸菌(たとえばBL21(DE3))等の宿主に取り込ませることによって、形質転換された遺伝子組み換え体を得ることができる。この組み換え体を常法に従い適当な条件下で培養後、遠心分離(5000rpm、10分間)等の固-液分離により微生物菌体を回収する。

回収した菌体を超音波処理等によって細胞破碎をした後、遠心分離(15000rpm、20分間)等を行い、改変されたDSを含む上清を回収し、これを粗酵素液とする。粗酵素液は、必要に応じて、常法による精製を行うことによって改変されたDSの精製物とすることもできる。

本発明においては、改変DS、特に遺伝子組み換え体から産生される改変DSを用いてグルカンを製造するが、上記粗酵素液のまま用いてもよく、精製された改変DSを使用してもよい。

【0028】

得られた改変DS酵素液を用いてグルカンを製造する方法は通常の方法を適用すればよい。1例を示すと、改変DS粗酵素液を10%スクロースを含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.2)50~100ml、好ましくは100mlに、緩衝液100mlあたり0.05~0.3U/ml、好ましくは0.1U/ml以上添加し、30℃で一晩インキュベートする。インキュベート終了後、反応液と等量のエタノールを加え、沈殿した画分を遠心分離によって回収する。なお、1Uはスクロースを基質として、1分間に1μmoleのグルコースに相当する還元糖を生じる酵素量である。

この沈殿を再び蒸留水に溶解させ、50%エタノール沈殿を行う。この操作を2回繰り返し、得られた沈殿を蒸留水に溶解した後、蒸留水に対して一晩透析を行い、得られたグルカン溶液を常法により凍結乾燥することにより、本発明のグルカンを得ることができる。本発明のグルカンの製造方法によれば、本来のDSが生産するグルカンとは異なる構造を有するグルカンを安定的に生産することができる。

【0029】

【実施例】

以下において、実施例により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1(サイト1の交換)

配列表の配列番号11記載のロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS(DDBJアクセッション・ナンバー：AB020020)アミノ酸配列の307番目のチロシン(Tyr)から477番目のアスパラギン(Asn)と配列表の配列番号12記載の同菌株のDS(DDBJアクセッション・ナンバー：U81374)アミノ酸配列の340番目のチロシン(Tyr)から510番目のアスパラギン(Asn)の2つのスクロース・デキストラン結合リシン部位を含む領域をそれぞれサイト1と名づけ、これを交換導入することによって、改変していないDS遺伝子を組み込んだ組み換えDNAを作製した。

【0030】

10

20

30

40

50

(1) ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株(DDBJアクセッション・ナンバー: AB020020) 遺伝子を含むクローン作製

ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株について、改変していないDS遺伝子を組み込んだ組み換えDNAを、舟根らの方法(K. Funane et al., Biosci. Biotechnol, Biochem., 64(2000)29-38)に従って作製した。

まず、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株(NRRL社製)を2%グルコースを含む培地(組成: 2%グルコース, 1.5%リン酸水素二カリウム, 0.5%酵母エキス, 0.25%ペプトン, 0.005%CaCl₂·2H₂O, 0.001%MgSO₄·7H₂O, 0.001%MnCl₂·4H₂O, 0.001%NaClを塩酸でpH7.4に調整したもの)5mlに植菌し、嫌氣的に30℃で一晩培養した。

10

【0031】

培養した該菌株からのゲノムDNAの精製は、Wilsonらの方法(Wilson et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (1987)2.4.1-2.4.2, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)に従って行った。すなわち、上記の培養終了後、遠心分離により集菌し、これを12mgリゾチーム, 10mMトリス-塩酸(pH8.0), 1mMEDTA溶液567μlを加え、37℃で3時間インキュベートし、菌体を溶解(溶菌)した。さらに、10%SDSを30μlと20μg/mlプロテアーゼKを3μl加え、37℃で1時間インキュベートした。

続いて、CTAB/NaCl(10%セチルトリメチルアンモニウムクロリド, 0.7M NaCl)80μlを加え、65℃で10時間インキュベート後、常法に従いフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、目的とするゲノムDNAを回収した。また、DSをコードする遺伝子は、上記のゲノムDNAを制限酵素EcoRI(ニッポンジーン社製)で完全に切断してから、EcoRI認識部位を有するファージであるgt10(Stratagene社製)にライゲーションした後、Gigapack II gold packaging extract(Stratagene社製)と共にパッケージングし、これをゲノムDNAライブラリーとした。

20

【0032】

大腸菌NM514株(Stratagene社製)をライゲーションし、該大腸菌を0.2%マルトース, 10mM MgSO₄を含むTB培地(0.5%NaCl, 1%バクトトリプトンをNaOHでpH7.4に調整)に植菌し、37℃で4~6時間培養した。培養後、遠心分離(2000rpm, 10分間)により集菌し、これをOD₆₀₀が0.5となるように10mM MgSO₄に懸濁し、コンピテントセルとしたものに、前記において調製したロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDSをコードするDNAフラグメントを導入したバクテリオファージを感染させ、形質転換した大腸菌を得た。該大腸菌をNZY固体培地で37℃で8時間培養することによって得られたプラークを、ナイロン膜にトランスファーさせ、スクリーニングを行う。

30

【0033】

スクリーニングは、次の手順で行った。ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDS(DDBJアクセッション・ナンバー: AB020020)DNAをスクリーニングするために用いるDNAプローブとしては、通常のDSの内部アミノ酸配列のうち、種間の相同性の高いものから設計したオリゴヌクレオチド(配列表の配列番号13および14、15および16)を用い、先に得たゲノムDNAを鋳型としてPCRで増幅したものをを用いた。なお、配列番号13記載のプライマーについては、6番目のチミン(t)をグアニン(g)に、15番目のチミン(t)をシトシン(c)に置換したのものについても同様に用いることができた。配列番号14記載のプライマーについては、4番目のチミン(t)をシトシン(c)に置換したのものについても同様に用いることができた。配列番号15記載のプライマーについては、7番目のチミン(t)をシトシン(c)に置換したのものについても同様に用いることができた。PCRについては、DNAの変性は94℃で1分間、プライマーとのアニーリングは50℃で1分間、ポリメラーゼ伸長反応72℃で、1~2分間で1分30秒間のサイクルを25回行った。

40

こうして得たPCR増幅産物を、Dig DNA labeling and detection kit(Boehringer Mann

50

heim社製)を用いてジゴキシゲニンでラベルし、これをDNAプローブとした。このDNAプローブと同キット等を用いて、ナイロン膜(商品名:Hybond-N⁺、Amersham社製)にトランスファーさせたブランクをスクリーニングした。

【0034】

次に、スクリーニングにより得られた5.2kbと4.3kbの2本のEcoRI DNA断片を、プラスミドpBluescript SK⁺(Stratagene社製)にライゲーションした。すなわち、制限酵素EcoRI(ニッポンジーン社製)で上記のDNA断片を処理した後、プラスミドの制限酵素サイトにライゲーション処理した。

これにより、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDS(DDBJアクセッション・ナンバー:AB020020)遺伝子を含むクローンを得た。

10

【0035】

(2)同菌株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)遺伝子を含むクローン作製

DDBJにアクセッション・ナンバー:U81374として登録されているロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS遺伝子について、サイト1の交換に必要な制限酵素認識部位を作製するのに支障をきたした。しかも、該遺伝子については、他のDSやGTF間で相同性が高い部分に異なる箇所がいくつか見られた。このため、確認のために該遺伝子の塩基配列について、シーケンシングを行った。この結果、数カ所の塩基が異なっていることがわかった。このため、以下のサイト1の交換においては、配列表の配列番号7記載の塩基配列を用いて行った。

20

(1)と同様に、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株について、改変していないDS遺伝子を組み込んだ組み換えDNAを得た後、ゲノムDNAライブラリーを作製し、形質転換した大腸菌を得た。該大腸菌をNZY固体培地で37℃で8時間培養することによって得られたブランクを、ナイロン膜にトランスファーさせ、以下の手順でスクリーニングを行った。

【0036】

すなわち、配列表の配列番号7記載のロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDSのDNAをスクリーニングするために用いるプライマーとしては、先に抽出したゲノムDNAを鋳型として、一般的にDS遺伝子を検出するために相同性のあるアミノ酸配列から設計したプライマー(配列表の配列番号5)およびロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)配列から設計したプライマー(配列表の配列番号6)を用い、PCR法で増幅した。PCRについては、DNAの変性は94℃で1分間、プライマーとのアニーリングは50℃で1分間、ポリメラーゼ伸長反応72℃で、1~2分間で1分30秒間のサイクルを25回行った。

30

こうして得たPCR増幅産物を、Dig DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim社製)を用いてジゴキシゲニンでラベルし、これをDNAプローブとした。このDNAプローブと同キット等を用いて、ナイロン膜(商品名:Hybond-N⁺、Amersham社製)にトランスファーさせたブランクをスクリーニングした。

40

【0037】

次に、スクリーニングにより得られた7kbのEcoRI-EcoRI DNA断片を、プラスミドpBluescript SK⁺(Stratagene社製)にライゲーションした。すなわち、制限酵素EcoRI(ニッポンジーン社製)で上記のDNA断片を処理した後、プラスミドのEcoRIサイトに常法によりライゲーション処理した。

これにより、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株のDS(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)遺伝子を含むクローンを得た。

しかし、上記のDS遺伝子(DDBJアクセッション・ナンバー:U81374)遺伝子を含むクローンは、配列表の配列番号7記載の塩基配列において、4067番目のアデニン(a)のところにEcoRI認識部位があるため、4067番目のアデニン(a)以降

50

が欠損している1～4066番目までのDS遺伝子の断片しか得られなかった。

【0038】

このため、再びゲノムDNAを鋳型として、4067番目より上流に位置する配列を基に設計したプライマー（配列表の配列番号8）と終止コドンの下流にXhoI認識部位を導入するように設計されたプライマー（配列表の配列番号9）を用いてPCR法により増幅することにより、4067番目以降のDS遺伝子のDNA断片を得た。PCRについては、DNAの変性は94℃で1分間、プライマーとのアニーリングは50℃で1分間、ポリメラーゼ伸長反応72℃で1分30秒間のサイクルを25回行った。

こうして得た4067番目以降のDS遺伝子のDNA断片については、制限酵素であるEcoRI（ニッポンジーン社製）とXhoI（ニッポンジーン社製）で切断してEcoRI-XhoI断片とした後、塩基が欠損している3'-末端部分を補った。すなわち、上記によって作製したXhoI認識部位を導入した4067番目以降のDS遺伝子のDNA断片については、制限酵素であるEcoRI（ニッポンジーン社製）とXhoI（ニッポンジーン社製）で切断してEcoRI-XhoI断片とした後、1～4066番目までのEcoRI断片において塩基が欠損している3'-末端部分とつなげることによって、塩基の欠損を補った。

10

【0039】

上記によって得られた1～4066番目までのEcoRI断片と4067番目以降のEcoRI-XhoI断片で3'-末端部分を補ったものを、pBluescript SK⁺（Stratagene社製）等に制限酵素処理およびライゲーション処理を行うことにより、ロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDS遺伝子（DDBJアクセス

20

【0040】

（3）組み換えプラスミドpDSRSの調製

上記（2）で得たロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDS（DDBJアクセス・ナンバー：U81374）遺伝子をpBluescript SK⁺（Stratagene社製）に結合したDNAを鋳型として、配列表の配列番号17および18記載の1対のプライマーを用いて、PCR法により増幅してDS（DDBJアクセス・ナンバー：U81374）の5'-末端より1408番目のcまでのDNA断片を得た。PCRは、DNAの変性を94℃で1分間、プライマーとのアニーリングを55℃で2分間、ポリメラーゼ伸長反応を72℃で1分間のサイクルを30回行った。これにより、遺伝子上流の余分な部分を取り除くと共に、NcoI認識部位を導入することができる。NcoI認識部位を導入すると、開始コドンのATGのすぐ後のシトシン（c）がグアニン（g）に置き換わり、アミノ酸配列についてもプロリン（Pro）からアラニン（Ala）に変わった。

30

【0041】

このDNA断片を、制限酵素NcoI（ニッポンジーン社製）およびSpeI（ニッポンジーン社製）で切断して得られたDNA断片と、XhoI（ニッポンジーン社製）およびSpeI（ニッポンジーン社製）で切断した鋳型として用いたDNA断片とを、NcoI（ニッポンジーン社製）およびXhoI（ニッポンジーン社製）で切断したpET23dベクター（Novagen社製）にライゲーションすることにより、完全なDS（DDBJアクセス・ナンバー：U81374）をコードするDNAフラグメントを含む組み換えDNAを作製し、これをpDSRSと名づけた。

40

【0042】

（4）組み換えプラスミドpDSRT5の調製

前記（1）で得たロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512F株の完全なDS（DDBJアクセス・ナンバー：AB020020）遺伝子をpBluescript SK⁺（Stratagene社製）に結合したDNAを鋳型として、配列表の配列番号13および14記載の1対のプライマーを用いて、PCR法により増幅してDS（DDBJアクセス・ナンバー：AB020020）のDNA断片を得た。PCRは、DNAの変性を

50

94 で1分間、プライマーとのアニーリングを55 で2分間、ポリメラーゼ伸長反応を72 で1分間のサイクルを30回行った。このDNA断片を、制限酵素NcoI(ニッポンジーン社製)およびPstI(ニッポンジーン社製)で切断し、NcoI-PstIフラグメントを作製した。

同様に、前記(1)で得たロイコノストック・メセンテロイデスNRRL B-512 F株の完全なDS(DDBJアクセッション・ナンバー:AB020020)遺伝子をpBluescript SK⁺(Stratagene社製)に結合したDNAを鋳型として、配列表の配列番号15および16のプライマーを用いて、PCR法により増幅してDS(DDBJアクセッション・ナンバー:AB020020)のDNA断片を得た。PCRは、上記と同様に行った。このDNA断片を、制限酵素SphI(ニッポンジーン社製)およびXhoI(ニッポンジーン社製)で切断し、SphI-XhoIフラグメントを作製した。

10

【0043】

こうして得たNcoI-PstIフラグメント、SphI-XhoIフラグメントおよび前記(1)で得たプラスミドpBluescript SK⁺(Stratagene社製)に組み込まれたDS(DDBJアクセッション・ナンバー:AB020020)遺伝子を、制限酵素PstI(ニッポンジーン社製)およびSphI(ニッポンジーン社製)で切断した。これらのフラグメントを、制限酵素NcoI(ニッポンジーン社製)とXhoI(ニッポンジーン社製)で切断したpET23dベクター(Novagen社製)にライゲーション処理することにより、組み換えDNAであるpDSRTを作製した。

【0044】

続いて、pDSRTを鋳型として、配列表の配列番号10記載のプライマーとMutant-super kmキット(タカラ酒造社製)を用い、欠損している5塩基(cagat)を補完する変異を入れたDNA断片を作製した。

20

次に、該変異部分を含む部位を制限酵素SphI(ニッポンジーン社製)およびAflII(ニッポンジーン社製)で切断し、0.347kbのSphI-AflII断片を作製した。これを、pDSRTの相当する部分である、配列表の配列番号19記載の塩基配列の3003番目のグアニン(g)から3054番目のグアニン(g)と交換し、これを5塩基(cagat)の補完された組み換えDNAであるpDSRT5とした。

【0045】

(5)DS活性中心部位(サイト1)の交換導入

30

次に、こうして得たpDSRSとpDSRT5について、DSの活性中心の1つであるサイト1の交換導入を行った。

サイト1の交換を行うにあたり、pDSRSについては、配列表の配列番号7記載の塩基配列において、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素KpnI認識部位を導入するために、1017番目のシトシン(c)をグアニン(g)に、1020番目のチミン(t)をシトシン(c)に、1021番目のチミン(t)をシトシン(c)にする変異を導入した。

同様に、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素BstXI認識部位を導入するため、1533番目のシトシン(c)をチミン(t)に、1536番目のチミン(t)をグアニン(g)にする変異を導入した。

40

pDSRT5については、すでに存在するKpnI認識部位およびBstXI認識部位を利用した。

【0046】

pDSRSおよびpDSRT5について、それぞれ制限酵素KpnI(ニッポンジーン社製)およびBstXI(ニッポンジーン社製)で切断した。切断後、生成した約500bp断片とベクターDNAを含む約7.5bp断片をそれぞれ抽出した後、常法により精製した。

pDSRT5由来の500bp断片をpDSRS由来の7.5bp断片にライゲーションすることにより作製した改変pDSRSをpS1と名づけた。また、pDSRS由来の500bp断片をpDSRT5由来の7.5bp断片にライゲーションすることによって作

50

製した改変 p D S R T 5 を p T 1 と名づけた。

【 0 0 4 7 】

(6) D S の酵素タンパクの発現

上記 (5) で作製した p S 1 と p T 1 を、それぞれコンピテントセルとした大腸菌 B L 2 1 (D E 3) (Novagen 社製) に取り込ませ、形質転換体である大腸菌 B L 2 1 (D E 3) を作製した。これをアンピシリン 2 0 0 μ g / m l を含む Luria-Bertani 平板培地で 3 7 ° C で 9 時間から一晩培養し、これをアンピシリン 2 0 0 μ g / m l を含む Luria-Bertani 培地 3 m l を用いて 3 7 ° C で一晩振盪培養した。培養後、同培地 1 5 0 m l に 1 : 6 0 となるように培養後の培地を加えたのち、 3 7 ° C で 2 時間振盪培養した。

【 0 0 4 8 】

いったん培養を止め、イソプロピル - β - D (-) - チオガラクトピラノシド (以下、 I P T G と略記することがある。) (ワコー社製) を 0 . 5 m M となるように加え、さらに 3 0 ° C で 8 時間培養を続け、タンパクの生産誘導を行った。培養終了後、培養物を遠心分離 (5 0 0 0 r p m 、 1 0 分間、 4 ° C) することにより菌体を沈殿として回収した。続いて、回収した菌体を 3 0 % グリセリンを含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム溶液 (p H 5 . 2) に懸濁し、超音波によって細胞破碎をした。細胞破碎後、遠心分離 (1 5 0 0 0 r p m 、 2 0 分間、 4 ° C) を行い、上清を回収し、これを粗酵素液とした。

なお、それぞれの粗酵素液に含まれている酵素タンパクについて、 p S 1 から得られたものを S 1 、 p T 1 から得られたものを T 1 とそれぞれ名づけた。

【 0 0 4 9 】

実施例 2 (サイト 2 の交換)

配列表の配列番号 1 1 記載のロイコノストック・メセンテロイデス N R R L B - 5 1 2 F 株の D S (D D B J アクセション・ナンバー : A B 0 2 0 0 2 0) アミノ酸配列の 6 6 8 番目のリシン (L y s) から 7 4 0 番目のグリシン (G l y) と配列表の配列番号 1 2 記載の同菌株の D S (D D B J アクセション・ナンバー : U 8 1 3 7 4) アミノ酸配列の 6 9 6 番目のリシン (L y s) から 7 6 8 番目のグリシン (G l y) のムタン結合部位を含む領域をそれぞれサイト 2 と名づけ、これを交換導入することによって、改変していない D S 遺伝子を組み込んだ組み換え D N A を作製した。

【 0 0 5 0 】

実施例 1 で作製した p D S R S と p D S R T 5 について、 D S の活性中心の 1 つであるサイト 2 の交換導入を行った。サイト 2 の交換導入以外は、すべて実施例 1 と同様に行った。

サイト 2 の交換を行うにあたり、 p D S R S については、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列において、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素 D r a I 認識部位を導入するために、 2 0 8 5 番目のシトシン (c) をチミン (t) にする変異を導入した。また、 B a l I 認識部位については、すでに存在するものを利用した。

同様に、 p D S R T 5 については、配列表の配列番号 1 9 記載の塩基配列において、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素 B a l I 認識部位を導入するため、 2 2 1 7 番目のシトシン (c) をチミン (t) に、 2 2 2 0 番目のグアニン (g) をシトシン (c) にする変異を導入した。

【 0 0 5 1 】

p D S R S および p D S R T 5 について、それぞれ制限酵素 D r a I (ニッポンジーン社製) および B a l I (ニッポンジーン社製) で切断した。切断後、生成した約 2 0 0 b p 断片とベクター D N A を含む約 7 . 8 b p 断片をそれぞれ抽出した後、常法により精製した。

p D S R T 5 由来の 2 0 0 b p 断片を p D S R S 由来の 7 . 8 b p 断片にライゲーションすることによって作製した改変 p D S R S を p S 2 と名づけた。また、 p D S R S 由来の 2 0 0 b p 断片を p D S R T 5 由来の 7 . 8 b p 断片にライゲーションすることによって作製した改変 p D S R T 5 を p T 2 と名づけた。

実施例 1 と同様に、改変された D S の酵素タンパクの発現を行い、サイト 2 を交換導入し

10

20

30

40

50

た粗酵素液を得た。なお、それぞれの粗酵素液に含まれている酵素タンパクについて、p S 2 から得られたものをS 2、p T 2 から得られたものをT 2 とそれぞれ名づけた。

【0052】

実施例3 (サイト3 の交換)

本実施例においては、配列表の配列番号11記載のロイコノストック・メセンテロイデス NRRL B - 512 F 株のDS (DDBJ アクセション・ナンバー : AB020020) アミノ酸配列の902番目のヒスチジン (His) から1118番目のリシン (Lys) と配列表の配列番号12記載の同菌株のDS (DDBJ アクセション・ナンバー : U81374) アミノ酸配列の915番目のヒスチジン (His) から1131番目のリシン (Lys) の2つのデキストラン結合リシン部位を含む領域をそれぞれサイト3と名づけて、これを交換導入した。

10

【0053】

実施例1で作製したpDSRSとpDSRT5について、DSの活性中心の1つであるサイト3の交換導入を行った。サイト3の交換導入以外は、すべて実施例1と同様に行った。

サイト3の交換を行うにあたり、pDSRSについては、配列表の配列番号7記載の塩基配列において、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素NspV認識部位を導入するために、2748番目のアデニン (a) をグアニン (g) にする変異を導入した。また、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素AflII認識部位を導入するために、3388番目のチミン (t) をシトシン (c) に、3390番目のグアニン (g) をチミン (t) に、3393番目のアデニン (a) をグアニン (g) にする変異を導入した。

20

同様に、pDSRT5については、配列表の配列番号19記載の塩基配列において、コードするアミノ酸を変異させることなく制限酵素NspV認識部位を導入するため、2709番目のアデニン (a) をグアニン (g) にする変異を導入した。制限酵素AflII認識部位については、すでに存在する部位を用いた。

【0054】

pDSRSおよびpDSRT5について、それぞれ制限酵素NspV (Stratagene社製) およびAflII (Stratagene社製) で切断した。切断後、生成した約600bp断片とベクターDNAを含む約7.4bp断片をそれぞれ抽出した後、常法により精製した。

30

pDSRT5由来の600bp断片をpDSRS由来の7.4bp断片にライゲーションすることによって作製した改変pDSRSをpS3と名づけた。また、pDSRS由来の600bp断片をpDSRT5由来の7.4bp断片にライゲーションすることによって作製した改変pDSRT5をpT3と名づけた。

実施例1と同様に、改変DSの酵素タンパクの発現を行い、サイト3を交換導入した粗酵素液を得た。なお、それぞれの粗酵素液に含まれている酵素タンパクについて、pS3から得られたものをS3、pT3から得られたものをT3とそれぞれ名づけた。

【0055】

実施例4

実施例1～3で調製した粗酵素液について、SDSポリアクリルアミド電気泳動 (以下、SDS-PAGEと略記することがある。) およびウエスタンブロット分析を行った。

40

SDS-PAGEは、Laemmliの方法 (Laemmli, U. K., Nature, 227, 680-685) に従って行った。すなわち、電気泳動装置としてはミニスラブゲル電気泳動槽 (アトー社製) を使用し、7.5%アクリルアミドゲル (ワコー社製) および0.1%SDSを含む25mMトリス-グリシン緩衝液を用いて20mAで2時間電気泳動を行った。分子量マーカーとして、HMW Calibration kit for SDS Electrophoresis (Pharmacia社製) を用いた。電気泳動終了後、ゲルをクマシー ブリリアントブルー (以下、CBBと略記することがある。) (Fluka社製) でタンパク質の泳動パターンを染色した。

【0056】

また、ウエスタンブロット分析は、Towbinらの方法 (Towbin et al., Proc. Natl. Acad.

50

Sci. USA, 76, 4350-4354(1979))に従って行った。すなわち、電気泳動装置としてはミニスラブル電気泳動槽(アトー社製)を使用し、7.5%ゲル(ワコー社製)および0.1% SDSを含む25 mM トリス-グリシン緩衝液を用いて20 mAで2時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、同じ緩衝液を満たしたプロットング装置(日本エイドー社製)にセットしプロットングを行い、電気泳動したタンパク質をPVDF膜(ミリポア社製)にトランスファーさせた。プロットングは室温で2.5 mA/cm²で20分間で行った。なお、PVDF膜は、あらかじめメタノールに数秒浸漬した後、25 mM トリス, 20%メタノール, 40 mM 6-アミノカプロン酸(pH 9.4)に浸漬した。

【0057】

プロットング終了後、PVDF膜は、1%スキムミルクを含む20 mM トリス-塩酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5) 20 mlに一晩浸漬した。次に、第1抗体(10 mg/ml)を、0.5%スキムミルクを含む20 mM トリス-塩酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5)に1/1000(v/v)となるように加え、これにPVDF膜を1時間30分浸漬した。続いて、スキムミルクを含まない20 mM トリス-塩酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5) 20 mlで5分間洗浄し、これを4回繰り返した。洗浄後、第2抗体をスキムミルクを含まない20 mM トリス-塩酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5)に1/3000(v/v)となるように加え、これにPVDF膜を1時間浸漬した。浸漬後、スキムミルクを含まない20 mM トリス-塩酸, 0.15 M NaCl (pH 7.5) 20 mlで5分間洗浄し、これを3回繰り返した。

【0058】

なお、第1抗体としてはマウス抗グルコシルトランスフェラーゼ(日本大学(千葉県松戸市)の福島教授より供与)、第2抗体としてはペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG(-ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ-マウスIgG(BRL社製))を用いた。

抗体と反応させたPVDF膜は、生乾きした後、ECL Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia biotech社製)を用いて、hyperfilm (Amersham LIFE SCIENCE社製)に感光した。

図1は、SDS-PAGE終了後のタンパク質の泳動パターンを染色したものである。また、図2は、ウエスタンブロット分析の結果を示したものである。

【0059】

SDS-PAGEを行った結果、pS1から生産されたタンパクS1はpDSRSより生産されたDSRSタンパクと、pT1から生産されたタンパクT1はpDSRT5より生産されたDSRT5タンパクと分子量が同じであることが明らかとなった。S1の分子量は200 kDa、T1の分子量は210 kDaであった。

また、pS2から生産されたタンパクS2、pS3から生産されたタンパクS3、pT2から生産されたタンパクT2およびpT3から生産されたタンパクT3についても、上記したS1とT1の場合と同様の結果であった。S2の分子量は200 kDa、S3の分子量は200 kDa、T2の分子量は210 kDa、T3の分子量は210 kDaであった。

一方、ウエスタンブロット分析においても、SDS-PAGEの結果と同様の傾向を示し、図中の矢印の位置にバンドが認められた。

【0060】

実施例5

実施例1~3で調製した粗酵素液20 mlを、20 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.2) 1000 ml中で一晩透析し、これを精製DSとした。

この精製DS 150 μlを、12.5%スクロースを含む20 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.2)溶液100 μlに添加し、30℃で20分~1時間反応を行った。反応終了後、スクロースの分解によって生じる還元糖の増加をネルソン・ソモギー法(M. Somogyi, J. Biol. Chem., 160(1945)69-73)で測定し、これをスクロース分解活性とした。結果を第1表に示す。表中、DSRSはpDSRSから生産されたタンパク、DSRT5はpD

10

20

30

40

50

S R T 5 から生産されたタンパクを、それぞれ表している。D S 酵素 1 ユニット (U) は、1 分間に $1 \mu\text{mole}$ のグルコースに相当する還元糖を生産する酵素量である。

【 0 0 6 1 】

【 表 1 】

第 1 表

D S	活性 (U/m g)
D S R S	0. 0 0 3 4
S 1	0. 0 0 3 2
S 2	0. 0 0 2 7
S 3	0. 0 0 0 9
D S R T 5	0. 0 0 8 5
T 1	0. 0 0 1 3
T 2	0. 0 0 5 8
T 3	0. 0 0 0 3

10

20

【 0 0 6 2 】

第 1 表から明らかのように、発現させたすべての酵素タンパクについて、スクロース分解活性があることが明らかとなった。このうち、S 1、S 2 および T 2 については、D S R S または D S T R 5 とそれぞれ同等の活性を保持していた。しかし、S 3 については D S R S の 2 6 %、T 1 については D S R T 5 の 1 5 %、T 3 については D S T R 5 の 4 % 程度に、活性が低下していることが明らかとなった。

【 0 0 6 3 】

実施例 6

実施例 5 で透析を行い精製した各種 D S 0. 0 5 ~ 0. 3 U を、1 0 % スクロースを含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 5. 2) 緩衝液 1 0 0 m L 中で 3 0 の恒温器でゆるく振盪させながら 8 時間反応を行った。

上記によって生成したグルカン (デキストラン) を 5 0 % エタノールで沈殿させた後、これを遠心分離 (1 0 0 0 0 r p m、3 0 分間) して回収した。次いで、この沈殿を蒸留水 5 0 m l に溶解し、さらに 5 0 % エタノール沈殿を 3 回繰り返した。最後のグルカン水溶液を蒸留水 2 0 m l に対して一晚透析した。

透析終了後、遠心分離 (1 8 0 0 0 r p m、3 0 分間) を行い、上清と沈殿に分けた。すなわち、上清を水溶性画分として、沈殿を非水溶性画分として、それぞれ凍結乾燥して重量を測定し、各 D S を作用させることによって得られたグルカンについて、水溶性画分と非水溶性画分の存在比率を算出した。結果を第 2 表に示す。

【 0 0 6 4 】

【 表 2 】

第 2 表

30

40

	水溶性画分	非水溶性画分
DARSを作用させたグルカン	90	10
S1を作用させたグルカン	95	5
S2を作用させたグルカン	70	30
S3を作用させたグルカン	10	90
DSRT5を作用させたグルカン	10	90
T1を作用させたグルカン	30	70
T2を作用させたグルカン	30	70
T3を作用させたグルカン	95	5

10

【0065】

第2表から明らかなように、DARSを作用させたグルカンまたはDSRT5を作用させたグルカンと比較して、S1を作用させたグルカンおよびT1を作用させたグルカンとも

20

に水溶性画分が増えることが明らかとなった。また、S2を作用させたグルカンは非水溶性画分が増加し、T2を作用させたグルカンは水溶性画分が増加していることが明らかとなった。

さらに、DARSを作用させたグルカンが主に水溶性グルカンであるのに対し、S3を作用させたグルカンは非水溶性画分が増加していることが明らかとなった。また、DSRT5を作用させたグルカンが主に非水溶性グルカンであるのに対し、T3を作用させたグルカンは主に水溶性グルカンであることが明らかとなった。

したがって、本発明のようにDSの活性中心部位を交換導入することによって、生産されるグルカンの性質を変化させることが可能であることが示された。

【0066】

30

実施例7

実施例6で調製した各種グルカンについて、化学構造をメチル化分析法(W. S. York et al., Methods Enzymol., 118(1985)3-40)により、グルカンの結合様式の比率について分析した。

常法により凍結乾燥したグルカン100~150 μ gを脱水DMSO(ワコー社製)0.5mlに溶解した。グルカン溶解液にN₂充填した後、70 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、一晚攪拌した。次に、150 μ mol K⁺DMSO⁻(水素化カリウムはアルドリッチ社製、DMSOはワコー社製)を100 μ l加え、2時間室温で攪拌した後、氷中で冷却し、1.5 μ mol MeI(関東化学)を100 μ lを加え、室温で一晩攪拌し、メチル化反応を行った。

40

蒸留水を0.5ml加えて反応をとめ、N₂をバブリングすることにより、CH₃Iを除去した。これを蒸留水1000mlに対して一晚透析し、常法に従って凍結乾燥した。

【0067】

凍結乾燥したものに、2Mトリフルオロ酢酸(以下、TFAと略記することがある。)(ワコー社製)250 μ lを加え、121 $^{\circ}$ Cで1時間加温した。加温終了後、直ちに冷却し、イソプロピルアルコール(ワコー社製)250 μ lを加え、室温でエバポレートしてTFAを除去すると共に、乾固した。

次に、50%メタノール(ワコー社製)100 μ lを加え、1.5M NH₄OH(ワコー社製)に10mg/ml NaBD₄(シグマ化学社製)を溶解した溶解液を200 μ l加え、室温で1時間放置した。

50

放置後、酢酸（ワコー社製）50 μ lを加え、さらに酢酸：メタノール（1：9）200 μ lを加え、混和した後に室温でエバポレートし、この操作を3回繰り返した。続いて、メタノール（ワコー社製）200 μ lを加え、室温でエバポレートし、この操作を3回繰り返した。これに、無水酢酸（ワコー社製）50 μ lを加えて121 で3時間反応させた後、直ちに冷却した。冷却後、蒸留水500 μ lを加え、固体Na₂CO₃（ワコー社製）を泡が出なくなるまで加えた。

【0068】

続いて、CH₂Cl₂（ワコー社製）500 μ lを加えて混和した後に生じた有機層を別の試験管へ移し、室温でエバポレートした。これをアセトン500 μ lに溶解し、再度室温でエバポレートした。エバポレート後、アセトン20 μ lに溶解したもののうち、1 μ lを試料としてガスクロマトグラフィー（島津製作所製、GC-14A）を用いて分析した。このとき、分析用カラムとしてカラムSP-2330（内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.2 μ m）（スペルコ社製）を用い、カラム温度170 で分離し、クロマトパック（島津製作所製、C-R126A）で検出した。

また、ガスクロマトグラフィー質量分析（以下、GC/MSと略記することがある。）についても、上記の試料1 μ lを用いて行い、それぞれのピークに由来する物質について同定した。GC/MSには、HP6890シリーズ GCシステム、Benchtop Quadrupole Mass Spectrometer JEOL Automass SystemII（いずれもヒューレットパッカー社製）およびカラムSP-2330（スペルコ社製）を用いた。

【0069】

グルカンの結合様式の構成比率（%）についての結果を、第3表に示す。表中、T-Glcpは末端のグルコース残基、3-Glcpは - 1 3直鎖結合、4-Glcpは - 1 4直鎖結合、6-Glcpは - 1 6直鎖結合、3,6-Glcpは - 1 3, 6分岐結合、4,6-Glcpは - 1 4, 6分岐結合を表している。また、たとえばS-S1はS1を作用させることによって得られる水溶性画分に含まれるグルカン、I-S1はS1を作用させることによって得られる非水溶性画分に含まれるグルカンという意味である。

【0070】

【表3】

第3表

10

20

	T-Glcp	3-Glcp	4-Glcp	6-Glcp	3,6-Glcp	4,6-Glcp
S-DSRS	1 2	1	1 3	6 4	9	1
I-DSRS	9	3	1 4	6 6	7	1
S-S1	1 1	1	2	8 0	4	2
I-S1	1 2	1	1 2	6 1	7	7
S-S2	7	2	8	5 5	1 0	1 8
I-S2	1 8	3	2	5 6	9	1 2
S-S3	1 7	1 7	2 4	2 6	9	7
I-S3	2 1	8	4 3	1 4	2	1 2
S-DSRT5	8	1 9	1 5	4 1	1 5	2
I-DSRT5	4	4 3	—	4 7	5	1
S-T1	1 6	4	5 2	1 0	2	1 6
I-T1	4	1	8 7	1	—	7
S-T2	2 0	1 0	2 5	2 9	7	9
I-T2	4	5 2	3	3 4	6	1
S-T3	1 4	2 4	2 7	2 3	3	9
I-T3	9	3 0	3 3	1 3	4	1 1

10

20

30

- : 痕跡程度

S- : 水溶性画分

I- : 非水溶性画分

【 0 0 7 1 】

この結果、S1グルカンの主成分である水溶性画分に含まれるS-S1グルカンは、DSRSを作用させることによって得られるDSRSグルカンよりも - 1 6直鎖結合が増加する一方で、分岐結合が減少していることが明らかとなった。

また、T1グルカンの主成分である非水溶性画分I-T1グルカンは、DSRT5グルカンやDSRSグルカンとは全く異なり、ほとんどが - 1 4直鎖結合となり、 - 1 3結合および - 1 3, 6分岐結合が減少していることが明らかとなった。

40

【 0 0 7 2 】

S2グルカンは、DSRSグルカンよりも - 1 6直鎖結合がやや減少する一方で、 - 1 4, 6分岐結合が増加していることが明らかとなった。

また、T2グルカンは、DSRT5グルカンよりも - 1 6直鎖結合がやや減少するが、 - 1 4直鎖結合がやや増加していることが明らかとなった。

S3グルカンは、 - 1 6直鎖結合が減少するが、 - 1 3直鎖結合が増加していることが明らかとなった。また、T3グルカンは、水溶性画分および非水溶性画分について、 - 1 6直鎖結合および - 1 3直鎖結合が減少するが、 - 1 4直鎖結合が増加していることが明らかとなった。

【 0 0 7 3 】

50

以上のことから、改変DSであるS1を作用させることによって得られるグルカンは、酵素活性中心部位の改変を行っていないDSRSやDSRT5を作用させることによって得られる従来のグルカンとは糖の結合様式の割合が異なっているため、生産されるグルカンの構造自体も異なるものであることが明らかとなった。このS1グルカンは、従来のグルカンよりも水溶性が高いため、代用血漿やサイクロデキストラン等の製造に適したデキストランを安定的に生産できると考えられる。

さらに、改変DSであるT1は、ほぼアミロースに近い構造のグルカンを生産することから、植物体からアミロースを調製するよりも純度の高い - 1 - 4 直鎖結合のグルカンを、スクロースから1段階の反応で生産するのに有効であると考えられる。

【0074】

改変DSであるS2またはT2が生産するグルカンは、DSRSやDSRT5が生産するグルカンと比較して、糖の結合様式の割合がわずかに異なるため、グルカンの構造においてもわずかな変化が起こっているものと考えられる。

また、改変DSであるS3およびT3は、DSRSやDSRT5が生産するグルカンと比べて、糖の結合様式の割合が異なった、かなり構造の異なるグルカンを生産することが明らかとなった。

【0075】

【発明の効果】

本発明によれば、ロイコノストック・メセンテロイデスのデキストランスクラーゼ(DS)のムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位またはデキストラン結合リシン部位を、同菌の異種のDSのムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位およびデキストラン結合リシン部位のうち対応する部位と交換して作製した改変DSと、この改変DSをコードする遺伝子を挿入したベクター、該ベクターにより形質転換された遺伝子組み換え体が提供される。

さらに、改変DSを基質に作用させることによって、糖の結合様式の割合が変化し、構造が改変されたグルカンを安定的に製造する方法が提供される。

また、改変DSを作製する際に交換導入する部位をムタン結合部位、スクロース・デキストラン結合リシン部位およびデキストラン結合リシン部位の中から選択することにより、酵素反応生産物の構造や性質を大きく変化させることが可能で、様々な用途への応用が期待される。

【0076】

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> 独立行政法人 食品総合研究所

<120> 改変デキストランスクララーゼ、その遺伝子組み換え体、グルカンの製造法

<130> P131203K

<160> 19

10

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

cgatttgta ttgaaatitit tactg 25

20

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

cctttggctt ttcactatat atacag 26

30

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<400> 3

atccatggca ttacag 17

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<400> 4

atctcgagag aaagcttatg ctgac 25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<221> modified_base

<222> 9

<220>

<221> modified_base

<222> 18

10

<400> 5

gaatggytia aagatgciat ggc 23

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gtacttggaa tgttatattg tgtg 24

<210> 7

<211> 4581

30

<212> DNA

<213> *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

<400> 7

atgccattta cagaaaaagt aatgctggaaa aagctttata aagttagggaa aagttaggta 60

gttgggtgggg tttgtgcttt tgcattaacc gccctatttg ctttagcaac accaagtggt 120

ttaggagaca gtagtgtacc tgatgtgagt gccaataacg ttcaatctgc tttagataat 180

40

acaacggata cgcagcagaa cactacgggt accgaagaaa atgataaagt acagtcigca 240

gctactaatg	acaatgtaac	aacagcigca	agcgacacaa	cacaatctgc	tgataataat	300	
gtgacagaaa	aacagtcaga	tgatcatgca	cttgataatg	aaaaagtcga	taacaaacaa	360	
gatgaagtcg	ctcaaaccaa	tgttacttagc	aaaaatgagg	aatcagcagc	tgcttcaact	420	
gacactgatac	ctgctgaaac	gacaactgac	gaaacacaaac	aagttagcgg	caagtagctt	480	
gaaaaagacg	gtagttggta	ttattatitit	gatgatggca	aaaatgctaa	aggittatca	540	
acgatagaca	acaatattca	atattititac	gagagtggta	aacaagccaa	aggacagtat	600	
gtcacaattg	ataatcaaac	atattatitit	gataagggct	caggtgatga	gitaactggc	660	10
ctgcaaagca	tigatgggaa	catagttgct	tttaacgatg	aagggcaaca	aattititaa	720	
caatattacc	aatctgaaaa	tggtaacaaca	tactactitg	atgataaagg	acacgcigct	780	
accggtatta	agaatatcga	gggcaaaaaat	tattatititg	ataatctitg	gcaactaaaa	840	
aaaggctict	ctggctgat	tgatggtaaca	ataatgacat	tigatcagga	aacagggcaa	900	
gaagtittca	acacaacttc	tgaataaaaa	gaaggtitga	cgactcaaaa	cacggattat	960	
agcgaacata	atgcagccca	cggtaacggat	gcigaggact	tigaaaatat	tgacggctat	1020	
ttaacagcta	gttcatggta	tcgtccaaca	ggtatititac	gtaacggaac	agactgggaa	1080	20
ctttctacag	atacagattt	cagaccaata	tgtcagttg	ggtggccaga	taagaacacc	1140	
caggtcaatt	attiaaatta	catggctgat	ttagggitta	tcagtaatgc	ggacagttit	1200	
gaaactgggg	atagccaaag	cttattaat	gaagcaagta	actatgttca	aaaatcaatt	1260	
gaaatgaaaa	ttagtgcgca	acaaaagtaca	gagtggttaa	aggatgcaat	ggcggcttc	1320	
atgtcgcgc	aaccacagtg	gaatgaaact	agtgaagata	tgagcaatga	ccatttaca	1380	
aatggcgcct	taacttatgt	caacagttca	ctgacacctg	acgctaattc	aaactttaga	1440	
ctacttaatc	ggacaccaac	aaaccagact	ggtgaacaag	cgtataattt	agataattca	1500	30
aaaggttggt	tigaattggt	gtagccaat	gacgttgata	attcaaacc	tgtagtaca	1560	
gcagaacaat	tgaattggt	atattatitit	atgaattitg	gtacgattac	ggccaacgac	1620	
gcggatgcta	attitgatgg	tattcgtgta	gatgcagtcg	acaatgtgga	tgctgattitg	1680	
ttacaaattg	ctgccgatta	tttcaaacta	gcttacggtg	tigatcaaaa	tgatgctact	1740	
gctaactcagc	atctttcaat	tttgggaagat	tggagtcaca	atgatecttt	gtatgtaaca	1800	
gatcaaggaa	gcaatcaatt	aaccatggat	gattatgtgc	acacacaatt	aatctggctt	1860	
ctaacaaaat	catctgacat	acgaggtaca	atgcagcgtt	tcgtggatta	ttatatggitg	1920	40
gatcgatcta	atgatagtac	agaaaacgaa	gccatttcta	attacagctt	tgtacgtgca	1980	

cacgacagcg aagigcaaac ggttatigcc caaatigiti ccgattigta tccitgatgii 2040
 gaaaatagti tagcaccaac aacagaacaa ttggcagctg ctttcaaagt atacaatgaa 2100
 gatgaaaaat tagcagacaa aaagiacaca caatataata tggctagigc ttatgcgatg 2160
 ttgctaacca ataaggatac tgttccctgt gtctattatg gcgatttata tacagatgat 2220
 ggtcaatata tggcaacaaa gtcaccatac tatgatgcga ttaacactii gctaaaggct 2280
 agagttcagt atgttgcctg tggccaatcg atgtccgttg atagtaatga cgtgittaaca 2340
 agtgttcgct atggtaaaga tgccatgaca gcttctgaca ctggaacatc tgagacgcgt 2400
 acggaaggta ttggagtcac cgtcagcaat aacgcggagc tacaattaga ggatgggcat 2460
 actgtcacat tgcataatggg ggcagctcat aagaaccaag cttatcgtgc ttigtatca 2520
 acaactgcag atggattagc ttattatgat actgatgaaa atgcacctgt ggcgtacaca 2580
 gatgctaacg gcgattigat ttttacgaat gaatcaatii atggigtaca aaatccacaa 2640
 gtttctgggt acttggcagt ttgggttccg gtaggtgcgc aacaagatca agatgcacga 2700
 acggcctcig atacaacaac aaacacgagt gataaaggti tccattcaaa cgtcgtcctt 2760
 gattctcaag tcatctacga aggtttctca aacttccaag catttgctac agacagcagt 2820
 gaatatacaa acgtatgcat cgtcagaat gcggaccaat ttaagcaatg gggigtgaca 2880
 agcttccaat tggcaccaca atatcgttca agtacagata caagtittctt ggattcaatt 2940
 attcaaaacg ggtatgcatt cacggatcgt tatgacttag gttatggcac accgacaaaa 3000
 tatggaactg ctgatcagti gcgcgatgct attaaagcct tacatgctag cggatttcaa 3060
 gccatigccg attgggtgcc ggaccaaatt tataatttgc cagagcaaga attagctact 3120
 gtcacaagaa caaattcatt tggagatgac gatacagatt ctgatattga caatgccitta 3180
 tatgtigtac aaagtcgtgg ggggtgtcaa tatcaagaga tgtatgggtg tgccttctta 3240
 gaagagtiac aggcactcta tccatcccta tttaaagtga atcaaatctc aactggcgii 3300
 ccaattgatg gcagtgtaaa gattactgag tgggcggcta agtacttcaa tggctctaac 3360
 atccaaggta aaggigtctgg atacgtattg aaagatatgg gttctaataa gtactttaag 3420
 gtcgtttcga acactgagga tggtgactac ttacaaaac agttaactaa tgatcgtca 3480
 gaaactggct ttacacacga tgataaagga atcactatit atacattaag tggttatcgt 3540
 gcccaaatg cattattca agatgatgat aataactatt actatttga taaaacaggt 3600
 catttagtaa caggtttgca aaagattaat aaccatacct acttcttctt acctaatggt 3660
 atcgaactgg tcaagagctt cttaacaaaac gaagatggta caattgttta ttctgataag 3720

10

20

30

40

aaaggtcatc aagtttttga tcaatatata acigatcaaa atggaaatgc giattactit 3780
 gatgatgctg gtgtaatgct taaatcaggg ctigcaacga ttgatggaca tcaacagtat 3840
 ttgatcaaa atgggtgtgca ggtaaggat aagtttgiga ttggcactga tggttataag 3900
 tattactitg aaccaggtag tggtaactta gctatcctac gttatgtgca aaatagtaag 4960
 aatcaatggt tctattttga tggtaatggc catgctgtca ctggttcca aacaattaat 4020
 ggtaaaaaac aatattttcta taatgatggt catcaaagta aaggatgaatt cattgatgca 4080
 gacggggata ctcttatac gagtgccact gatggctgcc tagtaactgg tgttcagaag 4140 10
 attaatggta ttacctatgc ttttgataac acaggaaatt tgatcacaaa tcagtattat 4200
 caattagcag atggtaaata tatgttgta gatgatagtg gtcgtgcaa aacagggitt 4260
 gtattgcaag atgggtgtact aagatacttc gatcaaaaacg gtgagcaagt gaaagatgct 4320
 atcatgtgg atccagatac taacttgagt tattatttca atgcaacaca aggtgtcgtc 4380
 gtaaaaaatg attatttcga gtatcaaggt aattggatt taacagatgc taattatcaa 4440
 ctatcaaag gttttaaagc agttgacgac agcttacaac atttgatga agtcactggt 4500
 gtacaaacaa aagatagtgc ttttaataagt gctcagggtta aggtttacca atttgataat 4560 20
 aatggaaatg ctgtgtcagc a 4581

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 8

gccatgctgt cactggtttc 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<400> 9

atctcgagaa agcttatgct gac 23

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<400> 10

gattgggtac cagatcagat ttataatttg aaagg 35

<210> 11

<211> 1499

<212> PRT

<213> *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

20

<400> 11

Met Tyr Lys Ser Gly Lys Met Leu Val Ile Ala Gly Ser Val Ser Ile

5

10

15

Ile Gly Val Thr Ser Phe Ile Gln Gln Ala Gln Ala Asp Val Ser Gln

20

25

30

30

Asn Asn Gly Val Val Val Ala Thr Ala Val Asp Gln Ser Asn Leu Asp

35

40

45

Ala Thr Thr Ser Asp Lys Ser Ile Thr Thr Asp Asp Lys Ala Ala Thr

50

55

60

Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Thr Thr Thr Ala Asp Thr Ser

65

70

75

80

Thr Asp Asp Lys Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys

85

90

95

40

Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Thr Thr Ala	
100	105
Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Ala Thr Thr Ala Asp Thr Ser Thr	
115	120
Asp Asp Lys Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala	
130	135
Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Thr Thr Thr Ala	10
145	150
Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Ala Thr Thr Ala Asp Thr Ser Thr	
165	170
Asp Asp Lys Thr Ala Thr Thr Val Gly Thr Ser Asp Asn Asn Asn Ser	
180	185
Thr Thr Ala Ser Asp Lys Asp Val Ser Ser Ser Ala Gln Lys Ser Gln	20
195	200
Thr Ile Asp Asn Asn Ser Lys Thr Ala Asp Thr Thr Ala Ala Leu Glu	
210	215
Ala Ser Ser Lys Asn Leu Lys Thr Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Tyr Tyr	
225	230
Asp Asp Asp Asp Gln Val Lys Lys Asn Phe Ala Thr Val Ile Asp Gly	
245	250
Lys Val Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Thr Gly Ala Leu Ala Asp Thr Asn	30
260	265
Asp Tyr Gln Phe Leu Glu Gly Leu Thr Ser Glu Asn Asn Thr Tyr Thr	
275	280
Glu His Asn Ala Ser Val Gly Thr Thr Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Val	
290	295
Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Asp Ser Trp Tyr Arg Pro Lys Asp Ile Leu	40
305	310
Val Asn Gly Gln Asn Trp Glu Ser Ser Lys Asp Asp Asp Leu Arg Pro	

325 330 335
 Leu Leu Met Thr Trp Trp Pro Asp Lys Ala Thr Gln Val Asn Tyr Leu
 340 345 350
 Asn Ala Met Lys Tyr Leu Asp Ala Thr Glu Thr Glu Thr Val Tyr Thr
 355 360 365
 Ser Asp Asp Ser Gln Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ala Gln Asn Ile Gln
 370 375 380
 Val Lys Ile Glu Glu Lys Ile Ser Gln Glu Gly Gln Thr Gln Trp Leu
 385 390 395 400
 Lys Asp Asp Ile Ser Lys Phe Val Asp Ser Gln Ser Asn Trp Asn Ile
 405 410 415
 Ala Ser Glu Ser Lys Gly Thr Asp His Leu Gln Gly Gly Ala Leu Leu
 420 425 430
 Tyr Val Asn Ser Asp Lys Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asp Tyr Arg Leu
 435 440 445
 Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Thr Pro Leu Tyr Thr Thr
 450 455 460
 Asp Pro Thr Gln Gly Gly Tyr Asp Phe Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp
 465 470 475 480
 Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Met Tyr Tyr
 485 490 495
 Leu Leu Asn Phe Gly Ser Ile Thr Asn Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe
 500 505 510
 Asp Ser Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu
 515 520 525
 Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Ala Ala Tyr Gly Val Asp Lys Ser
 530 535 540
 Asp Ala Ile Ser Asn Gln His Val Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser Asp
 545 550 555 560

10

20

30

40

Asn Asp Ala Glu Tyr Val Lys Asp Asn Gly Asp Asn Gln Leu Ser Met	
565	570
Asp Asn Lys Leu Arg Leu Ser Leu Lys Tyr Ser Leu Thr Met Pro Ala	
580	585
Val Asp Gln Tyr Gly Asn Lys Arg Ser Gly Leu Glu Pro Phe Leu Thr	
595	600
Asn Ser Leu Val Asp Arg Thr Asn Asp Ser Thr Asp Asn Thr Ala Gln	10
610	615
Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val	
625	630
Ile Ala Glu Ile Ile Lys Gln Arg Ile Asp Pro Asp Ser Asp Gly Leu	
645	650
Ser Pro Thr Met Asp Gln Leu Thr Glu Ala Phe Lys Ile Tyr Asn Ala	20
660	665
Asp Gln Leu Lys Thr Asp Lys Glu Phe Thr Gln Tyr Asn Ile Pro Ser	
675	680
Thr Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr	
690	695
Tyr Gly Asp Met Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser	
705	710
Leu Tyr Tyr Asp Ala Ile Asp Thr Leu Leu Lys Ser Arg Ile Lys Tyr	30
725	730
Val Ser Gly Gly Gln Thr Met Ser Met Lys Tyr Met Gln Gly Asp Ser	
740	745
Ser Met Ala Ala Asp Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Thr Ser Val Arg Tyr	
755	760
Gly Asn Gly Ala Met Thr Ala Thr Asp Ala Gly Thr Asn Glu Thr Arg	40
770	775
Thr Gln Gly Ile Ala Val Ile Glu Ser Asn Asn Pro Asp Leu Lys Leu	
	780

Val Val Ala Val Gln Arg Val Asn Asn Ser Gly Ile Tyr Asn Gln Asp	
1025	1030 1035 1040
Ser Val Ile Asn Lys Thr Leu Tyr Ala Ser Gln Ile Ile Gly Gly Gly	
	1045 1050 1055
Glu Tyr Gln Ala Leu Tyr Gly Gly Glu Phe Leu Asp Glu Ile Lys Lys	
	1060 1065 1070
Leu Tyr Pro Ala Leu Phe Glu Lys Asn Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro	10
	1075 1080 1085
Met Asp Ala Ser Glu Lys Ile Lys Glu Trp Ser Ala Lys Tyr Phe Asn	
	1090 1095 1100
Gly Thr Asn Ile Gln Gly Arg Gly Ala Tyr Tyr Val Leu Lys Asp Trp	
1105	1110 1115 1120
Ala Thr Asn Glu Tyr Phe Lys Val Ser Thr Ser Ser Asn Ser Asn Val	
	1125 1130 1135
Phe Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Glu Glu Ser Asn Thr Gly Phe Ile	20
	1140 1145 1150
Ser Thr Asp Gly Gly Met Thr Tyr Tyr Ser Thr Ser Gly Tyr Gln Ala	
	1155 1160 1165
Lys Asp Thr Phe Ile Gln Asp Asp Lys Ser Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp	
	1170 1175 1180
Lys Asn Gly Tyr Met Thr Tyr Gly Phe Gln Thr Val Asn Asp Asn Asn	30
1185	1190 1195 1200
Tyr Tyr Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Gln Asp Ala Ile Leu Glu	
	1205 1210 1215
Asp Ser Lys Gly Asn Val Tyr Tyr Phe Asn Gln Tyr Gly Lys Gln Ala	
	1220 1225 1230
Val Asp Gly Tyr Tyr Met Leu Ala Asn Lys Thr Trp Arg Tyr Phe Asp	
	1235 1240 1245
Lys Asn Gly Val Met Ala Asn Ala Gly Leu Thr Thr Val Thr Val Asp	40

1250	1255	1260	
Gly Gln Val His Ile Gln Tyr Phe Asp Lys Asn Gly Ile Gln Val Lys			
1265	1270	1275	1280
Gly Thr Ser Val Lys Asp Ala Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Phe Asp Thr			
1285	1290	1295	
Asp Ser Gly Asp Met Val Thr Asn Arg Phe Gly Glu Asn Thr Asp Gly			
1300	1305	1310	10
Thr Trp Ser Tyr Phe Gly Ala Asp Gly Ile Ala Val Thr Gly Ala Gln			
1315	1320	1325	
Thr Ile Ser Gly Gln Lys Leu Phe Phe Asp Ala Asp Gly Gln Gln Ile			
1330	1335	1340	
Lys Gly Lys Glu Ala Thr Asp Lys Lys Gly Lys Val His Tyr Tyr Asp			
1345	1350	1355	1360
Ala Asn Ser Gly Glu Met Ile Thr Asn Arg Phe Glu Lys Leu Ser Asp			20
1365	1370	1375	
Gly Ser Trp Ala Tyr Phe Asn Lys Lys Gly Asn Ile Val Thr Gly Ala			
1380	1385	1390	
Gln Val Ile Asn Gly Gln His Leu Phe Phe Glu Ser Asn Gly Asn Gln			
1395	1400	1405	
Val Lys Gly Arg Glu Tyr Thr Ala Thr Asp Gly Lys Met Arg Tyr Tyr			
1410	1415	1420	30
Asp Ala Asp Ser Gly Asp Met Val Thr Asn Arg Phe Glu Arg Ile Ser			
1425	1430	1435	1440
Asp Gly Ser Trp Ala Tyr Phe Asp Ala Asn Gly Val Ala Val Thr Gly			
1445	1450	1455	
Glu Gln Asn Ile Asn Gly Gln Gln Leu Tyr Phe Asp Ala Asn Gly His			
1460	1465	1470	
Gln Val Lys Gly Ala Ala Val Lys Gln Ala Asp Gly Ser Gln Lys Tyr			40
1475	1480	1485	

Tyr Asp Ala Asn Ser Gly Glu Leu Ile Lys Ser
 1490 1495

<210> 12

<211> 1527

<212> PRT

<213> *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

10

<400> 12

Met Pro Phe Thr Glu Lys Val Met Arg Lys Lys Leu Tyr Lys Val Gly
 1 5 10 15

Lys Ser Trp Val Val Gly Gly Val Cys Ala Phe Ala Leu Thr Ala Ser
 20 25 30

Phe Ala Leu Ala Thr Pro Ser Val Leu Gly Asp Ser Ser Val Pro Asp
 35 40 45

20

Val Ser Ala Asn Asn Val Gln Ser Ala Ser Asp Asn Thr Thr Asp Thr
 50 55 60

Gln Gln Asn Thr Thr Val Thr Glu Glu Asn Asp Lys Val Gln Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Asp Asn Val Thr Thr Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Ser
 85 90 95

30

Ala Asp Asn Asn Val Thr Glu Lys Gln Ser Asp Asp His Ala Leu Asp
 100 105 110

Asn Glu Lys Val Asp Asn Lys Gln Asp Glu Val Ala Gln Thr Asn Val
 115 120 125

Thr Ser Lys Asn Glu Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Asp Thr Asp Pro
 130 135 140

Ala Glu Thr Thr Thr Asp Glu Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val
 145 150 155 160

40

Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala
 165 170 175
 Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser
 180 185 190
 Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile
 210 215 220
 Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn
 225 230 235 240
 Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys
 245 250 255
 Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr
 260 265 270
 Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp
 275 280 285
 Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn
 290 295 300
 Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr
 305 310 315 320
 Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn
 325 330 335
 Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile
 340 345 350
 Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg
 355 360 365
 Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr
 370 375 380
 Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe

10

20

30

40

385		390		395		400													
Glu	Thr	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	Ala	Ser	Asn	Tyr	Val				
				405					410					415					
Gln	Lys	Ser	Ile	Glu	Met	Lys	Ile	Ser	Ala	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Trp				
				420					425					430					
Leu	Lys	Asp	Ala	Met	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Ala	Gln	Pro	Gln	Trp	Asn				
				435					440					445					10
Glu	Thr	Ser	Glu	Asp	Met	Ser	Asn	Asp	His	Leu	Gln	Asn	Gly	Ala	Leu				
				450					455					460					
Thr	Tyr	Val	Asn	Ser	Pro	Leu	Thr	Pro	Asp	Ala	Asn	Ser	Asn	Phe	Arg				
465										470				475					
Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Pro	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Glu	Gln	Ala	Tyr	Asn				
				485						490				495					
Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Gly	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp	Val				
				500						505				510					20
Asp	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Val	Gln	Ala	Glu	Gln	Leu	Asn	Trp	Leu	Tyr				
				515						520				525					
Tyr	Leu	Met	Asn	Phe	Gly	Thr	Ile	Thr	Ala	Asn	Asp	Ala	Asp	Ala	Asn				
				530										540					
Phe	Asp	Gly	Ile	Arg	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Leu				
545										550				555					30
Leu	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ala	Tyr	Gly	Val	Asp	Gln				
				565						570				575					
Asn	Asp	Ala	Thr	Ala	Asn	Gln	His	Leu	Ser	Ile	Leu	Glu	Asp	Trp	Ser				
				580						585				590					
His	Asn	Asp	Pro	Leu	Tyr	Val	Thr	Asp	Gln	Gly	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr				
				595						600				605					
Met	Asp	Asp	Tyr	Val	His	Thr	Gln	Leu	Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Lys	Ser				
				610						615				620					40

Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val	
325	630
Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser	
	645
Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile	
	660
Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr	10
	675
Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu	
	690
Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met	
705	710
Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu	
	725
Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp	20
	740
Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly	
	755
Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr	
	770
Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg	30
785	790
Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu	
	805
Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn	
	820
Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr	
	835
Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly	40

850	855	860	
Asp Leu Ile Phe Thr	Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val	Gln Asn Pro Gln	
865	870	875	880
Val Ser Gly Tyr Leu	Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala	Gln Gln Asp	
	885	890	895
Gln Asp Ala Arg Thr	Ala Ser Asp Thr Thr Thr	Asn Thr Ser Asp Lys	
	900	905	910
Val Phe His Ser Asn	Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val	Ile Tyr Glu Gly	10
	915	920	925
Phe Ser Asn Phe Gln	Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser	Glu Tyr Thr Asn	
	930	935	940
Val Val Ile Ala Gln	Asn Ala Asp Gln Phe Lys	Gln Trp Gly Val Thr	
	945	950	955
945	950	955	960
Ser Phe Gln Leu Ala	Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr	Asp Thr Ser Phe	20
	965	970	975
Leu Asp Ser Ile Ile	Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr	Asp Arg Tyr Asp	
	980	985	990
Leu Gly Tyr Gly Thr	Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala	Asp Gln Leu Arg	
	995	1000	1005
Asp Ala Ile Lys Ala	Leu His Ala Ser Gly Ile Gln	Ala Ile Ala Asp	
	1010	1015	1020
1010	1015	1020	1025
Trp Val Pro Asp Gln	Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln	Glu Leu Ala Thr	
	1025	1030	1035
1025	1030	1035	1040
Val Thr Arg Thr Asn	Ser Phe Gly Asp Asp Asp Thr	Asp Ser Asp Ile	
	1045	1050	1055
Asp Asn Ala Leu Tyr	Val Val Gln Ser Arg Gly Gly Gly	Gln Tyr Gln	
	1060	1065	1070
1060	1065	1070	1075
Glu Met Tyr Gly Gly	Ala Phe Leu Glu Glu Leu	Gln Ala Leu Tyr Pro	40
	1075	1080	1085
1075	1080	1085	

Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly	
1090	1095 1100
Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn	
1105	1110 1115 1120
Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn	
	1125 1130 1135
Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro	
	1140 1145 1150
Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp	
	1155 1160 1165
Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala	
	1170 1175 1180
Phe Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly	
	1185 1190 1195 1200
His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe	
	1205 1210 1215
Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp	
	1220 1225 1230
Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln	
	1235 1240 1245
Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala Gly	
	1250 1255 1260
Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln Gln Tyr	
	1265 1270 1275 1280
Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val Ile Gly Thr	
	1285 1290 1295
Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile	
	1300 1305 1310
Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly	

10

20

30

40

1315	1320	1325	
Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln			
1330	1335	1340	
Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala			
1345	1350	1355	1360
Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Ser Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr			
	1365	1370	1375
Gly Val Gln Lys Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly			10
	1380	1385	1390
Asn Leu Ile Thr Asn Gln Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met			
	1395	1400	1405
Leu Leu Asp Asp Ser Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp			
	1410	1415	1420
Gly Val Leu Arg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala			20
1425	1430	1435	1440
Ile Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Tyr Phe Asn Ala Thr			
	1445	1450	1455
Gln Gly Val Ala Val Lys Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr Gln Gly Asn Trp			
	1460	1465	1470
Tyr Leu Thr Asp Ala Asn Tyr Gln Leu Ile Lys Gly Phe Lys Ala Val			
	1475	1480	1485
Asp Asp Ser Leu Gln His Phe Asp Glu Val Thr Gly Val Gln Thr Lys			30
	1490	1495	1500
Asp Ser Ala Leu Ile Ser Ala Gln Gly Lys Val Tyr Gln Phe Asp Asn			
1505	1510	1515	1520
Asn Gly Asn Ala Val Ser Ala			
	1525		

40

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified_base

<222> 9

10

<400> 13

gtscckcgig tctaytatgg 20

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<221> modified_base

<222> 13

<400> 14

rcyyttagcr tgiarngc 18

30

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<221> modified_base

<222> 9

<220>

<221> modified_base

<222> 18

10

<400> 15

caatggytia aagatgciat ggc 23

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<400> 16

ctgtcagcag ccatactact a 21

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<400> 17

atccatggca tttacagc 18

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<400> 18

gactgttgac ataagttaat g 21

<210> 19

<211> 4497

<212> DNA

<213> *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

<400> 19

atgtataaat ctgggaaaat gttagtcatt gcagggagtg tttcaataat tgggtgcacc 60
 agttttattc aacaagcaca agctgatgtt tcacaaaaca atggggtagt agtggccacg 120
 gcagtcgata aatcgaatit ggatgcgact acgtctgaca aatcaatcac aacagatgat 180
 aaagctgcaa cagcagctac atcaacagat gataaggcta caacaacagc agatacatca 240
 acagatgata aagctgcaac aacagcagct acatcaacag atgataaggc tacaacaaca 300
 gcagctacat caacagatga taaggctaca acagcagcta catcaacaga tgataaagct 360
 gcaacaacag cagatacatic aacagatgat aaggctacaa caacagcagc tacatcaaca 420
 gatgataagg ctacaacaac agcagctaca tcaacagatg ataaggctac aacaacagca 480
 gctacatcaa cagatgataa agctgcaaca acagcagaca catcaacgga tgataaaaaca 540
 gcaacaacag tcggcacatic tgataataac aattcaacta cagcgagcga taaagatgia 600
 agttcatcgg cacaaaaaag tcaaacgatt gataacaatt cgaagacggc cgatactact 660
 gcagcattag aagctagttc aaagaatctg aaaacgattg atggcaaac atattattac 720
 gacgatgatg atcaagtaaa aaagaacttt gctaccgtaa ttgatggtaa ggtactttat 780
 ttigataaag agactggcgc attagctgat acaaatgact atcaatitit agaaggatig 840
 actagtgaaa ataatactta tacggagcat aatgcctcag ttggtacaac tictgatagt 900
 tatacaaacg ttgacgggia cctaacagcc gacagtiggt acaggcctaa ggacatatta 960
 gtcaacggtc aaaactggga atcatcaaag gatgacgatt tacgaccatt gitaatgact 1020
 tggtggccag ataaggcaac acaagtaaac tatttgaatg cgatgaagta tttagatgcc 1080

10

20

30

40

actgaaacgg	aaactgttta	tacttcagat	gacagtcaag	acgctttgaa	caaagcagca	1140	
cagaacattc	aagtgaaaat	tgaagaaaaa	attagtcaag	aaggccaaac	acaatggcta	1200	
aaggatgata	ttcaaaatt	tgttgatagc	caatcaaatt	ggaatatgic	tagtgaatca	1260	
aaaggaactg	atcatttgca	aggtaggtgca	ttgttgtatg	tcaatagtga	taaaacacca	1320	
gatgcccaatt	ctgattatcg	attacttaat	cgcacaccaa	caaatcaaac	aggcacgcct	1380	
ttgtatacga	cagatccaac	tcaaggtagt	tatgacttcc	tcttggccaa	tgatgtggat	1440	
aattcaaacc	cagttgttca	agcagaacaa	ctaaattgga	tgtattactt	gttaaacttt	1500	10
ggatcaatta	ctaataacga	tgcagatgct	aactttgata	gtattcgagt	agatgctggt	1560	
gataacgttg	atgccgactt	attgcaaatt	gcagctgatt	atttcaaggc	agcataatggc	1620	
gtcgacaaga	gtgatgcaat	ttcgaatcaa	catgtttcca	ttcttgaaga	ctggagtgcac	1680	
aatgatgctg	aatatgtgaa	agacaatggc	gacaatcaat	tgtcaatgga	taataaatig	1740	
cgtttgtcat	taaaatactc	actcactatg	ccagcagtcg	atcaatatgg	taataaaaga	1800	
agtaggattag	aaccattttt	gacaaatagt	ttagttgatc	gtacaaatga	ttcgacagat	1860	
aataccgcac	aaccecaatta	ttcttttgg	cgtagcactg	atagtgaagt	acaaacagtt	1920	20
attgctgaaa	ttattaacaa	aagaattgat	ccggattctg	atggcttatac	accaacgatg	1980	
gaccaattaa	cagaagcatt	taaaatttat	aatgctgatac	aattgaaaac	agataaagaa	2040	
ttcacacaat	ataacattcc	aagtacttat	gccacaatac	taacgaataa	agatacagig	2100	
ccacgttgtg	actatgggga	tatgtataca	gatgatggtc	aatacatggc	aacaaagtca	2160	
ctttattacg	atgcaattga	tactttgctg	aagtctcgta	tcaagtatgt	ttctggcggg	2220	
caaacaatgt	ctaigaaata	tatgcaaggt	gatagtagta	tggctgctga	cagttataga	2280	
ggcatttiga	catcagttcg	ttatggtaat	ggtagcatga	ctgctaccga	tgcagggaca	2340	30
aatgaaacac	gtacgcaagg	tattgcagta	attgaaagta	ataaccaga	tttgaagtig	2400	
agcagtacag	atcaagtatg	tgtagatatg	ggcatagcgc	acaaaaatca	ggcttatcgt	2460	
cctgctttgt	taacaactaa	agatggcata	gatacttatg	tatctgatag	tgatgtctca	2520	
caaagcttaa	taagatatac	aaatagtaat	gggcaactta	ttttcaatag	ttcagatatt	2580	
gttggtagac	caaatccaca	agtttctgga	tacttggcgg	tctgggtacc	cgttgggtgct	2640	
tcagatactc	aagatgcgcg	aactgaaagt	agtacagcaa	caactactga	tggacaaaca	2700	
ttacattcaa	atgccgcact	tgattctcaa	gttatttatg	aaagttctc	taacttccaa	2760	40
ttacaccaa	caacagaagc	tgaatatgct	aatgtgcaaa	ttgcaaacaa	tactgattta	2820	

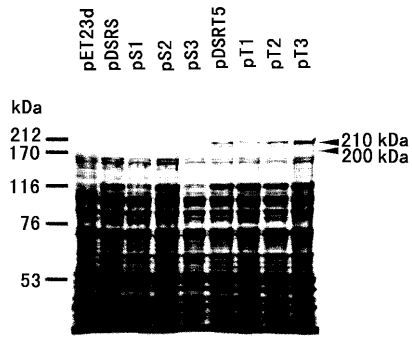
tacaagagtt ggggaattac gaacttcgag tticcaccac aatategttc aagtacggat 2880
agtagtttct tagattcaat tattcaaaat ggttatgcat ttactgatcg ttatgatcct 2940
ggattcaata caccaacgaa gtatggiact gtagatcaac tccgtacagc tattaaagct 3000
ttgcatgcga caggtatcaa ggcaatggca gattgggtac cagatcagat ttataatttg 3060
aaaggtaaag aagtggttgc ggtacaacgt gtcaacaact caggaatcta taatcaagat 3120
tctgtaatta ataaaacatt atatgcttca caaatcattg gtggcggaga atatcaggca 3180
ctatatggig gagagttcct tgatgaaatc aagaaattgt acctgctct attcgaaaaa 3240 10
aaccaaaatt caaccggcgt accaatggat gctagtgaaa agataaaaga atggtcgct 3300
aagtacttta acggtactaa cattcaaggt cgigggtcct actatgtcct taaggactgg 3360
gctacaaatg agtacttcaa ggtaagcaca tcaagcaata gcaatgtatt ttgccaag 3420
cagttgacga atgaagaatc aaacacigga ttatttcaa ctgatgggtg gatgacatat 3480
tattctaciaa gttgatacca ggcaaaagat acattcatcc aagatgacaa atctaattgg 3540
tattactttg acaagaatgg ttatatgaca tatggtttcc agacagtcaa tgataataat 3600
tattacttct tgcctaattg tattgaatta caagatgcta tcttagaaga tagtaaagga 3660 20
aatgtttatt atttcaatca atatggcaaa caagctgttg atggatacta catgttggct 3720
aataaaaactt ggcgttactt tgacaaaaat ggigttatgg ctaatgctgg citaacaacc 3780
gtgactgttg atgggcaggt gcatatccaa tactttgata agaacggat tcaggitcaa 3840
gggacttccg tgaagatgc agacggaaaag ctacgctact ttgacactga ttctgggtgat 3900
atggtgacga accgctttgg tgaaaacaca gatggatcat ggtcatactt tggtgctgac 3960
ggtatcgcctg taactgggtgc acagacaatt agtgggcaaa aattgttctt tgatgctgac 4020
ggacaacaga ttaaaggtaa ggaagcgact gataaaaagg gcaaagtgca ttattatgat 4080 30
gctaattctg gtgaaatgat cactaatcgt ttigaaaagi tateagatgg atcatgggcg 4140
tactttaata aaaaaggtaa catcgttaacc ggcgacacaag tcattaatgg tcaacatttg 4200
ttctttgaaa gcaatggtaa ccaagttaag ggicgtgaat acacggctac tgatgggaag 4260
atgcgctact acgatgcaga ttctgggtgat atggtgacga atcgctttga acgaatatca 4320
gacggatcat gggcatattt tgatgctaatt ggigtgtctg taactgggga acaaaatata 4380
aatggacaac aacigtattt tgatgccaat ggicatcaag ttaagggagc cgcagtaaaa 4440
caagctgacg gtagccaaaa atattatgac gcaaatctg gagagctgat taaaagc 4497 40

【図面の簡単な説明】

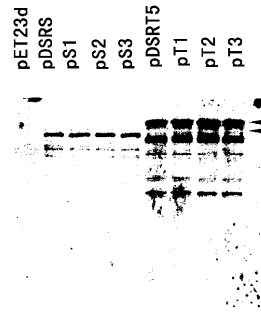
【図 1】 実施例 4 における SDS - PAGE 終了後のタンパク質の泳動パターンを示したものである。

【図 2】 実施例 4 におけるウエスタンブロット分析の結果である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
C 1 2 N 9/10	C 1 2 P 19/04 C
C 1 2 P 19/04	C 1 2 N 5/00 A

(72)発明者 北村 義明
茨城県つくば市観音台2丁目1-12 独立行政法人 食品総合研究所内

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特開2000-316571(JP,A)
特開昭64-85078(JP,A)
J. Bacteriol., 1992年, 174 [17], p.5639-5646
Oyo Toshitsu Kagaku, 1995年, 42 [1], p.27-35
Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998年, 62 [1], p.123-127
Appl. Environ. Microbiol., 1998年, 64 [5], p.1644-1649
Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997年, 48, p.465-472

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 9/00-9/99
C12N 15/00-15/90
C12P 1/00-41/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed