

(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2003-111590
(P2003-111590A)

(43) 公開日 平成15年4月15日 (2003. 4. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 4
1/21		9/10	4 B 0 6 5
5/10		C 1 2 P 19/04	C
審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 28 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)

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

(71) 出願人 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

(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

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 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) 【要約】

【課題】 デキストランスクラーゼやグルコシルトランスフェラーゼについて、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開発すると共に、当該酵素を用いることによって構造を大きく変化させたグルカンを生産する方法を確立すること。

【解決手段】 デキストランスクラーゼの活性中心領域の一部を、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、当該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と当該ベクターで形質転換された遺伝子組み換え体並びに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。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 デキストランスクラーゼの活性中心領域の一部を、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。

【請求項2】 交換する活性中心領域が、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である請求項1記載の改変デキストランスクラーゼ。

【請求項3】 請求項1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4】 請求項3のベクターで形質転換された遺伝子組み換え体。

【請求項5】 請求項1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6】 請求項4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、詳しくはデキストランスクラーゼの活性中心領域の一部を、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。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、-1,3結合、-1,4結合および-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。様々な構造を有するグルカンを生産するために、これまでは異なる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。

【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、-1,6結合を主体とする高分子の水溶性-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、-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。

【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。

【0005】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。

【0006】

【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。

【0007】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、デキストランスクラーゼの活性中心領域の一部を、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である。請求項2記載の本発明は、交換する活性中心領域が、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である請求項1記載の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、請求項1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4記載の本発明は、請求項3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5記載の本発明は、請求項1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6記載の本発明は、請求項4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である。

【0008】

【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、DSの活性中心領域の一部を、異種のDSの活性中心領域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。

【0009】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 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、好ましくは一晚培養する。

【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 LAQ (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】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ブランクは、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、このブラン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)に置換したの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ブラン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】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。

【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。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を得られる。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。

【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。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。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。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。

【0025】上記の活性中心部位を1つあるいは複数含

む数十個から200数十個のアミノ酸を含む部位を、異なる2種類のDS間で交換して種々の改変DSを作製することができる。

【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と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。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遺伝子の活性中心領域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り改変された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1μmol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、蒸留水に対して一晚透析を行い、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NRRLB-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】(1)ロイコノストック・メセンテロイデスNRRLB-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NRRLB-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NRRLB-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。

【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20 µg/ml プロテアーゼKを3 µl 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) 80 µl 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、GigapackII 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。

【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。

【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。こうして得たPCR増幅産物を、Dig DNA labeling and detec

tion 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プラー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。

【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。(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プラークを、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。こうして得たPC

R増幅産物を、Dig DNA labeling and detection kit(B oehringer 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。

【0037】次に、スクリーニングにより得られた7 kb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。

【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アクセッション・ナンバー:U81374)を含むクローンを得た。

【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アクセッション・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アクセッション・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。

【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アクセッション・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。

【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アクセッション・ナンバー:AB020020)遺伝子をpBluescript SK⁺(Stratagene社製)に結合したものの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アクセッション・ナンバー:AB020020)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-512F株の完全なDS(DDBJアクセッション・ナンバー:A

B020020) 遺伝子をpBluescript SK⁺ (Stratagene社製) に結合したものの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Sph I (ニッポンジーン社製) およびXho I (ニッポンジーン社製) で切断し、Sph I - Xho Iフラグメントを作製した。

【0043】こうして得たNco I - Pst Iフラグメント、Sph I - Xho I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Pst I (ニッポンジーン社製) およびSph I (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Nco I (ニッポンジーン社製) とXho I (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。次に、該変異部分を含む部位を制限酵素Sph I (ニッポンジーン社製) およびAfl I (ニッポンジーン社製) で切断し、0.347 kbのSph I - Afl I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

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Kpn I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Bst XI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。pDSRT5については、すでに存在するKpn I認識部位およびBst XI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Kpn I (ニッポンジーン社製) およびBst XI (ニッポンジーン社製) で切断した。切断後、生成した約500 bp断片とベクターDNAを含む約7.5 bp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500 bp断片をpDSRS由来の7.5 bp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500 bp断片をpDSRT5由来の7.5 bp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pT1と名づけた。

【0047】(6) DSの酵素タンパクの発現
上記(5)で作製したpS1とpT1を、それぞれコンピテントセルとした大腸菌BL21 (DE3) (Novagen社製) に取り込ませ、形質転換体である大腸菌BL21 (DE3) を作製した。これをアンピシリン200 μg/mlを含むLuria-Bertani平板培地で37 °Cで9時間から一晩培養し、これをアンピシリン200 μg/mlを含むLuria-Bertani培地3 mlを用いて37 °Cで一晩振盪培養した。培養後、同培地150 mlに1:60となるように培養後の培地を加えたのち、37 °Cで2時間振盪培養した。

【0048】いったん培養を止め、イソプロピル - D (-) - チオガラクトピラノシド (以下、IPTGと略記することがある。) (ワコー社製) を0.5 mMとなるように加え、さらに30 °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 (5000 rpm、10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30%グリセリンを含む20 mM酢酸ナトリウム溶液 (pH 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 (15000 rpm、20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、pS1から得られたものをS1、pT1から得られたものをT1とそれぞれ名づけた。

【0049】実施例2 (サイト2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NRRLB-512F株のDS (DDBJアクセッション・ナンバー: AB020020) アミノ酸配列の668番目のリシン (Lys) から740番目のグリシン (Gly) 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696番目のリシン (Lys) から768番目のグリシン (Gly) 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DS遺伝子を組み込んだ組み換えDNAを作製した。

【0050】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、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DraI認識部位を導入するために、2085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、Bali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、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Bali認識部位を導入するため、2217番目のシトシン(c)をチミン(t)に、2220番目のグアニン(g)をシトシン(c)にする変異を導入した。

【0051】pDSRSおよびpDSRT5について、それぞれ制限酵素DraI(ニッポンジーン社製)およびBali(ニッポンジーン社製)で切断した。切断後、生成した約200bp断片とベクターDNAを含む約7.8bp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200bp断片をpDSRS由来の7.8bp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pS2と名づけた。また、pDSRS由来の200bp断片をpDSRT5由来の7.8bp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pT2と名づけた。実施例1と同様に、改変されたDSの酵素タンパクの発現を行い、サイト2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、pS2から得られたものをS2、pT2から得られたものをT2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-512F株のDS(DDBJアクセス・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アクセス・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、これを交換導入した。

【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。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。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。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. Sci. US A, 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ゲル電気泳動槽(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。電気泳動終了後、同じ緩衝液を満したプロテティング装置(日本エイドー社製)にセットしプロテティングを行い、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。ブロッティングは室温で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、2.5 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】ブロッティング終了後、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pDSRT5から生産されたタンパクを、それぞれ表している。DS酵素1ユニット(U)は、1分間に1 μmol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。

【0061】

【表1】第1表

DS	活性 (U/mg)
DSRS	0.0034
S1	0.0032
S2	0.0027
S3	0.0009
DSRT5	0.0085
T1	0.0013
T2	0.0058
T3	0.0003

【0062】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、S1、S2およびT2については、DSRSまたはDSRT5とそれぞれ同等の活性を保持していた。しかし、S3についてはDSRSの26%、T1についてはDSRT5の15%、T3についてはDSRT5の4%程度に、活性が低下していることが明らかとなった。

【0063】実施例6

実施例5で透析を行い精製した各種DS 0.05~0.3 Uを、10%スクロースを含む20 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.2)緩衝液100 ml中で30℃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50%エタノールで沈殿させた後、これを遠心分離(10000 rpm、30分間)して回収した。次いで、この沈殿を蒸留水50 mlに溶解し、さらに50%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20 mlに対して一晩透析した。透析終了後、遠心分離(18000 rpm、30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DS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。

【0064】

【表2】第2表

	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

【0065】第2表から明らかなように、DSRS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、DSRS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】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。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。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0.25mm、長さ30m、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ド社製)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

	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

- : 痕跡程度

S- : 水溶性画分

I- : 非水溶性画分

【0071】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。

【0072】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。

【0073】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、デキストランスクラーゼ(DS)の活性中心領域の一部を、異種のDSの活性中心領域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活性中心領域を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】

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ーゼ、その遺伝子組み換え体、グルカンの製造法
 <;130>; P131203K
 <;160>; 19
 <;210>; 1
 <;211>; 25
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 1
 cgattgtgta ttgaaatttt tactg 25

 <;210>; 2
 <;211>; 26
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 2
 cctttggcctt ttcactatat atacag 26
 <;210>; 3
 <;211>; 17
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 3
 atccatggca tttacag 17
 <;210>; 4
 <;211>; 25
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 4
 atctcgagag aaagcttatg ctgac 25
 <;210>; 5
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence

 <;220>;
 <;221>; modified_base
 <;222>; 9
 <;220>;
 <;221>; modified_base
 <;222>; 18
 <;400>; 5
 gaatggytia aagatgciat ggc 23

<;210>; 6
 <;211>; 24
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 6
 gtacttggaa tgttatattg tgtg 24
 <;210>; 7
 <;211>; 4581
 <;212>; DNA
 <;213>; *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F
 <;400>; 7
 atgccattta cagaaaaagt aatgcggaaa aagctttata aagtgggaa aagtgggta 60
 gtgtgtgggg tttgtgcttt tgcattaacc gcctcatttg cttagcaac accaagtgtt 120
 ttaggagaca gtagtgtagt gtagtgtagt gcgaataacg ttcaatctgc ttcagataat 180
 acaacggata cgcagcagaa cactacggtt accgaagaaa atgataaagt acagctcgca 240
 gctactaatg acaatgtaac aacagctgca agcgacacaa cacaatctgc tgataataat 300
 gtgacagaaa aacagtcaga tgatcatgca ctgataatg aaaaagtcca taacaaacaa 360
 gatgaagtcg ctcaaaccac tggtactagc aaaaatgagg aatcagcagt tgcttcaact 420
 gacactgatc ctgctgaac gacaactgac gaaacacaac aagttagcgg caagtacgtt 480
 gaaaaagacg gtagttggta ttattatttt gatgatggca aaaaagttaa aggtttatca 540
 acgatagaca acaatattca atatttttac gagagtggta aacaagccaa aggacagtat 600
 gtcacaattg ataatacaac atattatttt gataagggtc cagggtgatga gttaaactgg 660
 ctgcaaacga ttgatgggaa catagttgct ttaacgatg aagggcaaca aatttttaat 720
 caatattacc aatctgaaaa tggtaacaac tactactttg atgataaagg acacgctgct 780
 accggtatta agaatatcga gggcaaaaat tattattttg ataactctgg gcaactaaaa 840
 aaaggcttct ctggtgtgat tgatggtcaa ataatgacat ttgatcagga aacagggcaa 900
 gaagtttcta acacaacttc tgaataaaaa gaaggttga cgactcaaaa cacggattat 960
 agcgaacata atgcagccca cggtagcggat gctgaggact ttgaaaatat tgacggctat 1020
 ttaacagcta gttcatggta tgcgtccaaca ggtattttac gtaacggaac agactgggaa 1080
 ccttctacag atacagattt cagaccaata ttgtcagtg ggtggccaga taagaacacc 1140
 cagggtcaatt atttaatta catggctgat ttagggttta tcagtaatgc ggacagtttt 1200
 gaaactgggg atagccaaag cttattaaat gaagcaagta actatgttca aaaaatcaatt 1260
 gaaatgaaaa ttagtgcgca acaaagtaca gagtggttta aggatgcaat ggcggccttc 1320
 atgtgcgagc aaccacagtg gaatgaaact agtgaagata tgagcaatga ccatttaca 1380
 aatggcgcac taacttatgt caacagtcca ctgacacctg acgctaattc aaactttaga 1440
 ctacttaatc ggacaccaac aaaccagact ggtgaacaag cgtataattt agataattca 1500
 aaagggtggt ttgaattggt gttagccaat gacggtgata attcaaacc ttagtagaca 1560
 gcagaacaat tgaattggtt atattattta atgaattttg gtacgattac ggccaacgac 1620
 gcggatgcta atttgatgg tattcgtgta gatgcagtcg acaatgtgga tgctgatattg 1680
 ttacaattg ctgccgatta tttcaaacct gcttacgggt ttgatcaaaa ttagtgctact 1740
 gtaatcagc atctttcaat tttggaagat tggagtcaca atgatccttt gtatgtaaca 1800
 gatcaaggaa gcaatcaatt aacctggat gattatgtgc acacacaatt aatctggtct 1860
 ctaacaaaat catctgacat acgaggtaca atgcagcgtc tcgtggatta ttatatggtg 1920
 gatcgatcta atgatgtac agaaaacgaa gccattccta attacagctt ttagctgca 1980
 cagcagcagc aagtgcaaac ggttatggc caaattgttt ccgattttga tcctgatgtt 2040
 gaaaatagtt tagcaccaac aacagaacaa ttggcagctg ctttcaaagt atacaatgaa 2100
 gatgaaaaat tagcagacaa aaagtacaca caatataata tggctagtgc ttatgcatg 2160
 ttgctaacca ataaggatc tgttcctcgt gtctattatg gcgatttata tacagatgat 2220
 ggtcaatata tggcaacaaa gtcaccatac tatgatgca ttaacacttt gctaaaggct 2280
 agagttcagt atgttgctgg tggccaatcg atgtccgtg atagtaatga cgtgttaaca 2340

agtgttcgct atggtaaaga tgccatgaca gcttctgaca ctggaacatc tgagacgcgt 2400
 acggaaggta ttggagtcac cgtcagcaat aacgcggagc tacaat taga ggatgggcat 2460
 actgtcacat tgcatatggg ggcagctcat aagaaccaag cttatcgtgc ttgttatca 2520
 acaactgcag atggattagc ttattatgat actgatgaaa atgcacctgt ggcgtacaca 2580
 gatgctaacg gcgatttgat ttttacgaat gaatcaattt atgggtgaca aaatccacaa 2640
 gtttctgggt acttggcagt ttgggttccg gtaggtgccc aacaagatca agatgcacga 2700
 acggcctctg atacaacaac aaacacgagt gataaagtgt tccattcaaa cgctgctctt 2760
 gattctcaag tcatctacga aggtttctca aacttccaag catttgctac agacagcagt 2820
 gaatatacaa acgtagtcac cgctcagaat gcggaccaat ttaagcaatg ggggtgacga 2880
 agcttccaat tggcaccaca atatcgttca agtacagata caagtttctt ggattcaatt 2940
 attcaaaacg ggtatgcatt cacggatcgt tatgacttag gttatggcac accgacaaaa 3000
 tatggaactg ctgatcagtt gcgcgatgct attaaagcct tacatgctag cggatttcaa 3060
 gccattgccg attgggtgcc ggaccaaatt tataatttgc cagagcaaga attagctact 3120
 gtcacaagaa caaattcatt tggagatgac gatacagatt ctgatattga caatgcctta 3180
 tatgtttgac aaagtcgtgg ggggtgtcaa tatcaagaga tgtatggtgg tgccttctta 3240
 gaagagttac aggcactcta tccatcccta tttaaagtga atcaaatctc aactggcgtt 3300
 ccaattgatg gcagtgtaaa gattactgag tgggaggcta agtacttcaa tggctctaac 3360
 atccaaggta aagggtgctg atacgtattg aaagatatgg gttctaataa gtactttaag 3420
 gtcgtttcga aactgagga tgggtactac ttacaaaac agttaactaa tgatctgtca 3480
 gaaactggct ttacacacga tgataaagga atcatctatt atacattaag tggttatcgt 3540
 gcccaaaatg cttttattca agatgatgat aataactatt actattttga taaaacaggt 3600
 catttagtaa caggtttgca aaagattaat aaccatacct acttcttctt acctaattgg 3660
 atcgaactgg tcaagagctt cttacaaaac gaagatggta caattgttta tttcgataag 3720
 aaaggatc acggttttga tcaatataata actgatcaaa atggaaatgc gtattacttt 3780
 gatgatgctg gtgtaatgct taaatcaggg cttgcaacga ttgatggaca tcaacagtat 3840
 tttgatcaaa atgggtgca ggtaaggat aagtttgtga ttggcactga tggttataag 3900
 tattactttg aaccaggtag tggtaactta gctatcctac gttatgtgca aaatagtaag 4960
 aatcaatggg tctattttga tggtaatggc catgctgtca ctggtttcca aacaat taat 4020
 ggtaaaaaac aatatttcta taatgatggc catcaaagta aaggatgaatt cattgatgca 4080
 gacgggggata ctttctatac gagtgccact gatggtcgcc tagtaactgg tgttcagaag 4140
 attaatggta ttacctatgc ttttgataac acaggaaatt tgatcacaaa tcagtattat 4200
 caattagcag atggtaataa tatgtgtta gatgatagtg gtcgtgcaa aacagggttt 4260
 gtattgcaag atgggtgact aagatacttc gatcaaaacg gtgagcaagt gaaagatgct 4320
 atcattgtgg atccagatc taacttgagt tattatttca atgcaacaca aggtgtcgct 4380
 gtaaaaaatg attatctcga gtatcaaggt aattggatatt taacagatgc taattatcaa 4440
 cttatcaaag gttttaaagc agttgacgac agcttacaac attttgatga agtcactggg 4500
 gtacaacaa aagatagtc ttttaataagt gctcagggta aggtttacca atttgataat 4560
 aatggaatg ctgtgtcagc a 4581

<;210>; 8

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;400>; 8

gccatgctgt cactggtttc 20

<;210>; 9

<;211>; 23

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;400>; 9


```

atctcgagaa agcttatgct gac      23
<;210>; 10
<;211>; 35
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;400>; 10
gattgggtac cagatcagat ttataatttg aaagg      35
<;210>; 11
<;211>; 1499
<;212>; PRT
<;213>; Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F
<;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
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
Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Thr Thr Ala
          100             105             110
Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Ala Thr Thr Ala Asp Thr Ser Thr
          115             120             125
Asp Asp Lys Ala Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala
          130             135             140
Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Thr Thr Thr Ala
          145             150             155             160
Ala Thr Ser Thr Asp Asp Lys Ala Ala Thr Thr Ala Asp Thr Ser Thr
          165             170             175
Asp Asp Lys Thr Ala Thr Thr Val Gly Thr Ser Asp Asn Asn Asn Ser
          180             185             190
Thr Thr Ala Ser Asp Lys Asp Val Ser Ser Ser Ala Gln Lys Ser Gln
          195             200             205
Thr Ile Asp Asn Asn Ser Lys Thr Ala Asp Thr Thr Ala Ala Leu Glu
          210             215             220
Ala Ser Ser Lys Asn Leu Lys Thr Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Tyr Tyr
          225             230             235             240
Asp Asp Asp Asp Gln Val Lys Lys Asn Phe Ala Thr Val Ile Asp Gly
          245             250             255
Lys Val Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Thr Gly Ala Leu Ala Asp Thr Asn
          260             265             270
Asp Tyr Gln Phe Leu Glu Gly Leu Thr Ser Glu Asn Asn Thr Tyr Thr
          275             280             285
Glu His Asn Ala Ser Val Gly Thr Thr Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Val
          290             295             300

```

Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Asp Ser Trp Tyr Arg Pro Lys Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 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
 Asn Asp Ala Glu Tyr Val Lys Asp Asn Gly Asp Asn Gln Leu Ser Met
 565 570 575
 Asp Asn Lys Leu Arg Leu Ser Leu Lys Tyr Ser Leu Thr Met Pro Ala
 580 585 590
 Val Asp Gln Tyr Gly Asn Lys Arg Ser Gly Leu Glu Pro Phe Leu Thr
 595 600 605
 Asn Ser Leu Val Asp Arg Thr Asn Asp Ser Thr Asp Asn Thr Ala Gln
 610 615 620
 Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Ala Glu Ile Ile Lys Gln Arg Ile Asp Pro Asp Ser Asp Gly Leu
 645 650 655
 Ser Pro Thr Met Asp Gln Leu Thr Glu Ala Phe Lys Ile Tyr Asn Ala
 660 665 670
 Asp Gln Leu Lys Thr Asp Lys Glu Phe Thr Gln Tyr Asn Ile Pro Ser
 675 680 685
 Thr Tyr Ala Thr Ile Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr
 690 695 700

Tyr Gly Asp Met Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser
 705 710 715 720
 Leu Tyr Tyr Asp Ala Ile Asp Thr Leu Leu Lys Ser Arg Ile Lys Tyr
 725 730 735
 Val Ser Gly Gly Gln Thr Met Ser Met Lys Tyr Met Gln Gly Asp Ser
 740 745 750
 Ser Met Ala Ala Asp Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Thr Ser Val Arg Tyr
 755 760 765
 Gly Asn Gly Ala Met Thr Ala Thr Asp Ala Gly Thr Asn Glu Thr Arg
 770 775 780
 Thr Gln Gly Ile Ala Val Ile Glu Ser Asn Asn Pro Asp Leu Lys Leu
 785 790 795 800
 Ser Ser Thr Asp Gln Val Val Val Asp Met Gly Ile Ala His Lys Asn
 805 810 815
 Gln Ala Tyr Arg Pro Ala Leu Leu Thr Thr Lys Asp Gly Ile Asp Thr
 820 825 830
 Tyr Val Ser Asp Ser Asp Val Ser Gln Ser Leu Ile Arg Tyr Thr Asn
 835 840 845
 Ser Asn Gly Gln Leu Ile Phe Asn Ser Ser Asp Ile Val Gly Thr Ala
 850 855 860
 Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala
 865 870 875 880
 Ser Asp Thr Gln Asp Ala Arg Thr Glu Ser Ser Thr Ala Thr Thr Thr
 885 890 895
 Asp Gly Gln Thr Leu His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile
 900 905 910
 Tyr Glu Ser Phe Ser Asn Phe Gln Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Glu
 915 920 925
 Tyr Ala Asn Val Gln Ile Ala Asn Asn Thr Asp Leu Tyr Lys Ser Trp
 930 935 940
 Gly Ile Thr Asn Phe Glu Phe Pro Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp
 945 950 955 960
 Ser Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp
 965 970 975
 Arg Tyr Asp Leu Gly Phe Asn Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Val Asp
 980 985 990
 Gln Leu Arg Thr Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Thr Gly Ile Lys Ala
 995 1000 1005
 Met Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Lys Gly Lys Glu
 1010 1015 1020
 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
 1075 1080 1085
 Met Asp Ala Ser Glu Lys Ile Lys Glu Trp Ser Ala Lys Tyr Phe Asn
 1090 1095 1100

<;210>; 12

<;211>; 1527

<;212>; PRT

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

<;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
 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
 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
 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				
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						
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					480				
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						
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					535						540							
Phe	Asp	Gly	Ile	Arg	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Leu				
545					550						555				560				
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						
Ser	Asp	Ile	Arg	Gly	Thr	Met	Gln	Arg	Phe	Val	Asp	Tyr	Tyr	Met	Val				
325						630					635				640				
Asp	Arg	Ser	Asn	Asp	Ser	Thr	Glu	Asn	Glu	Ala	Ile	Pro	Asn	Tyr	Ser				
				645						650				655					
Phe	Val	Arg	Ala	His	Asp	Ser	Glu	Val	Gln	Thr	Val	Ile	Ala	Gln	Ile				
		660							665				670						
Val	Ser	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asp	Val	Glu	Asn	Ser	Leu	Ala	Pro	Thr	Thr				
		675							680				685						
Glu	Gln	Leu	Ala	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Tyr	Asn	Glu	Asp	Glu	Lys	Leu				
		690					695					700							
Ala	Asp	Lys	Lys	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Asn	Met	Ala	Ser	Ala	Tyr	Ala	Met				
705						710						715			720				
Leu	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Pro	Arg	Val	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Leu				
				725						730				735					
Tyr	Thr	Asp	Asp	Gly	Gln	Tyr	Met	Ala	Thr	Lys	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Asp				
		740								745				750					
Ala	Ile	Asn	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Arg	Val	Gln	Tyr	Val	Ala	Gly	Gly				

755	760	765
Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr		
770	775	780
Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg		
785	790	795
Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu		
	805	810
Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn		
	820	825
Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr		
	835	840
Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly		
850	855	860
Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln		
865	870	875
Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp		
	885	890
Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys		
	900	905
Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly		
	915	920
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
Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe		
	965	970
Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp		
	980	985
Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg		
	995	1000
Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp		
1010	1015	1020
Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr		
1025	1030	1035
Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile		
	1045	1050
Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln		
	1060	1065
Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro		
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
Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn		
	1125	1130
Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro		
	1140	1145
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
 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
 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
 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
 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

<;210>; 13

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;221>; modified_base
 <;222>; 9
 <;400>; 13
 gtsccckcgig tctaytatgg 20
 <;210>; 14
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;221>; modified_base
 <;222>; 13
 <;400>; 14
 rccytagcr tgiarmgc 18
 <;210>; 15
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;221>; modified_base
 <;222>; 9
 <;220>;
 <;221>; modified_base
 <;222>; 18
 <;400>; 15
 caatggytia aagatgciat ggc 23
 <;210>; 16
 <;211>; 21
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 16
 ctgtcagcag ccatactact a 21
 <;210>; 17
 <;211>; 18
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;400>; 17
 atccatggca ttacagc 18
 <;210>; 18
 <;211>; 21
 <;212>; DNA
 <;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 atgggtagt agtggccacg 120
gcagtcgac aatcgaattt 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 cagatacatc aacagatgat aaggctacaa caacagcagc tacatcaaca 420
gatgataagg ctacaacaac agcagctaca tcaacagatg ataaggctac aacaacagca 480
gctacatcaa cagatgataa agctgcaaca acagcagaca catcaacgga tgataaaaca 540
gcaacaacag tcgacacatc tgataataac aattcaacta cagcagcagc taaagatgta 600
agttcatcgg cacaaaaaag tcaaacgatt gataacaatt cgaagacggc cgatactact 660
gcagcattag aagctagttc aaagaatctg aaaacgattg atggcaaac atattattac 720
gacgatgatg atcaagtaaa aaagaacttt gctaccgtaa ttgatggtaa ggtactttat 780
tttgataaag agactggcgc attagctgat acaaatgact atcaattttt agaaggattg 840
actagtgaat ataatactta tacggagcat aatgcctcag ttggtacaac ttctgatagt 900
tatacaaacg ttgacgggta cctaacagcc gacagttggt acaggcctaa ggacatatta 960
gtcaacggtc aaaactggga atcatcaaag gatgacgatt tacgaccatt gttaatgact 1020
tggtagccag ataaggcaac acaagtaaac tatttgaatg cgatgaagta tttagatgcc 1080
actgaaacgg aaactgttta tacttcagat gacagtcaag acgctttgaa caaagcagca 1140
cagaacattc aagtgaanaa tgaagaaaaa attagtcaag aaggccaaac acaatggcta 1200
aaggatgata tttcaaaaat tgttgatagc caatcaaatt ggaatattgc tagtgaatca 1260
aaaggaactg atcatttgca aggtgggtgca ttgttgatg tcaatagtga taaaacacca 1320
gatgccaatt ctgattatcg attacttaat cgcacacca caaatcaaac aggcacgcct 1380
ttgtatacga cagatccaac tcaaggtggt tatgacttcc tcttgccaa tgatgtggat 1440
aattcaaac cagttgttca agcagaacaa ctaaattgga tgtattactt gttaaacttt 1500
ggatcaatta ctaataacga tgcagatgct aactttgata gtattcgagt agatgctgtt 1560
gataacgttg atgccgactt attgcaaatt gcagctgatt atttcaaggc agcatatggc 1620
gtcgacaaga gtgatgcaat ttcgaatcaa catgtttcca tcttgaaga ctggagtgac 1680
aatgatgctg aatatgtgaa agacaatggc gacaatcaat tgtcaatgga taataaattg 1740
cgtttgtcat taaaatactc actcactatg ccagcagtcg atcaatatgg taataaaga 1800
agtggattag aaccattttt gacaaatagt ttagttgatc gtacaaatga ttcgacagat 1860
aataccgcac aaccaatta tcttttgtt cgtgcacatg atagtgaagt acaaacagtt 1920
attgctgaaa ttattaaaca aagaattgat ccggattctg atggcttacc accaacgatg 1980
gaccaattaa cagaagcatt taaaatttat aatgctgac aattgaaaac agataaagaa 2040
ttcacacaat ataacattcc aagtacttat gccacaatac taacgaataa agatacagtg 2100
ccacgtgtgt actatgggga tatgtataca gatgatggtc aatacatggc aacaaagtca 2160
ctttattacg atgcaatgta tactttgctg aagtctcgta tcaagtatgt tcttgccggg 2220
caaacaatgt ctatgaaata fatgcaaggt gatagtagta tggctgctga cagttataga 2280
ggcattttga catcagttcg ttatggtaat ggtgcatga ctgctaccga tgcagggaca 2340
aatgaaacac gtacgcaagg tattgcagta attgaaagta ataaccaga ttggaagttg 2400
agcagtacag atcaagtagt ttagatgatg ggcatagcgc acaaaaatca ggcttatcgt 2460
cctgctttgt taacaactaa agatggcata gatacttatg tatctgatag tgatgtctca 2520
caaagcttaa taagatatac aaatagtaat gggcaactta ttttcaatag ttcagatatt 2580
gttggtacag caaatccaca agtttctgga tacttgccgg tctgggtacc cgttggtgct 2640
tcagatactc aagatgcgag aactgaaagt agtacagcaa caactactga tggacaacaa 2700
ttacattcaa atgccgact tgattctcaa gttatttatg aaagtttctc taacttcaa 2760
tctacaccaa caacagaagc tgaatatgct aatgtgcaaa ttgcaacaa tactgattta 2820
tacaagagtt ggggaattac gaacttcgag ttccaccac aatatcgttc aagtacggat 2880
agtagtttct tagattcaat tattcaaaaat ggttatgcat ttactgatcg ttatgatctt 2940
ggattcaata caccaacgaa gtatggtact gtagatcaac tccgtacagc tattaaagct 3000

```

ttgcatgcca caggatcaaa ggcaatggca gattgggtac cagatcagat ttataatttg 3060
aaaggtaaag aagtggttgc ggtacaacgt gtcaacaact caggaatcta taatcaagat 3120
tctgtaatta ataaaacatt atatgcttca caaatcattg gtggcggaga atatcaggca 3180
ctatatggtg gagagttcct tgatgaaatc aagaaattgt accctgctct attcgaaaaa 3240
aaccaaatTT caaccggcgt accaatggat gctagtgaaa agataaaaaga atggtccgct 3300
aagtacttta acggtactaa cattcaaggt cgtggtgctt actatgtcct taaggactgg 3360
gctacaaatg agtacttcaa ggtaagcaca tcaagcaata gcaatgtatt ttgccaaaag 3420
cagttgacga atgaagaatc aaacactgga ttattttcaa ctgatgggtg gatgacatat 3480
tattctacaa gtggatacca ggcaaaagat acattcatcc aagatgacaa atctaattgg 3540
tattactttg acaagaatgg ttatatgaca tatggtttcc agacagtcaa tgataataat 3600
tattacttct tgcctaattg tattgaatta caagatgcta tcttagaaga tagtaaagga 3660
aatgtttatt atttcaatca atatggcaaa caagctgttg atggatacta catgtttggct 3720
aataaaactt ggcgttactt tgacaaaaat ggtgttatgg ctaatgctgg cttacaacc 3780
gtgactgttg atgggcaggt gcataatcaa tactttgata agaacggtat tcaggTcaaa 3840
gggacttccg tgaagatgc agacggaaaag ctacgctact ttgacactga ttctggTgat 3900
atggtgacga accgctttgg tgaaaacaca gatggtacat ggtcatactt tggTgctgac 3960
ggtatcgctg taactggtgc acagacaatt agtgggcaaa aattgttctt tgatgctgac 4020
ggacaacaga ttaaaggtaa ggaagcgact gataaaaagg gcaaagtgca ttattatgat 4080
gctaattctg gtgaaatgat cactaatcgt ttgaaaagt tatcagatgg atcatggcg 4140
tactttaata aaaaaggtaa catcgtaacc ggcgcacaag tcattaatgg tcaacatttg 4200
ttctttgaaa gcaatgtaa ccaagttaag ggtcgtgaat acacggctac tgatgggaag 4260
atgcgctact acgatgcaga ttctggTgat atggtgacga atcgctttga acgaatatca 4320
gacggatcat gggcatatTT tgatgctaat ggtgttgctg taactgggga acaaaaatata 4380
aatggacaac aactgtatTT tgatgccaat ggtcatcaag ttaagggagc cgcagTaaaa 4440
caagctgacg gtagccaaaa atattatgac gcaaattctg gagagctgat taaaagc 4497

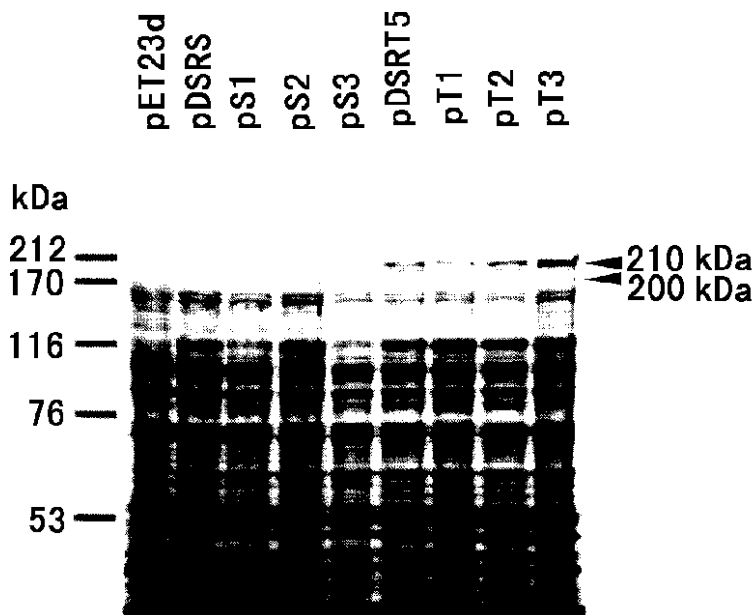
```

【図面の簡単な説明】

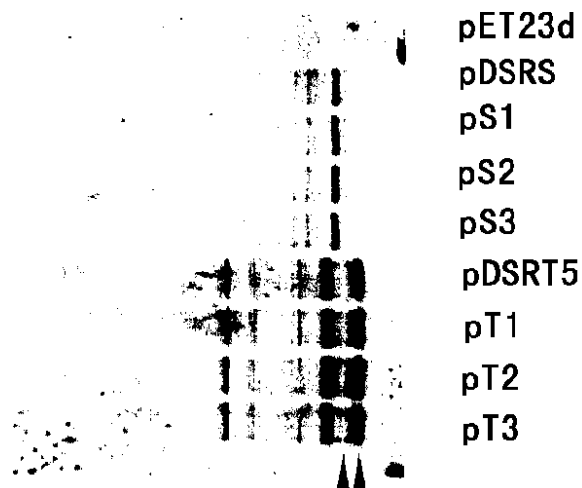
【図 1】 実施例 4 における SDS - PAGE 終了後のタンパク質の泳動パターンを示したものである。

【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	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
C 1 2 N 9/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 19/04		5/00	A

(72) 発明者 北村 義明	F タ-ム (参考)	4B024 AA03 BA10 CA04 DA05 EA04
茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 12 独立		FA02 GA11 HA01 HA03
行政法人 食品総合研究所内		4B050 CC03 CC04 DD02 FF02 LL05
		4B064 AF12 CA02 CA19 CC24 CE02
		4B065 AA01X AA01Y AB01 BA02
		CA22 CA29