

(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

(P 2 0 0 3 - 1 1 1 5 9 0 A)

(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 ⁸ (参考) |
|---------------------------|------|------------|--------------------------|
| C12N 15/09 | ZNA | C12N 1/15 | 4B024 |
| 1/15 | | 1/19 | 4B050 |
| 1/19 | | 1/21 | 4B064 |
| 1/21 | | 9/10 | 4B065 |
| 5/10 | | C12P 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(P 2001 - 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ラーゼ。

【請求項 3】 請求項 1 の改変デキストランスクラ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關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、Gigapak 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 $MgSO_4$ を含む TB 培地 (0.5% NaCl, 1% トリプトンを NaOH で pH 7.4 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% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% 酵母エキス, 1% NZ アミンを NaOH で pH 7.5 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 $MgSO_4$ 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 $MgSO_4$ 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 600 μ l 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 1~5 μ l 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溶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 アクセスions・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 アクセスions・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 アクセスions・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 アクセスions・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が得られる。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。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 20 μ g/ml プロテアーゼ K を 3 μ l 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 μ l 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, 10 mM MgSO₄ を含む TB 培地 (0.5% NaCl, 1% バクトトリプトンを NaOH で pH 7.4 に調整) に植菌し、37 で 4~6 時間培養した。培養後、遠心分離 (2000 rpm, 10 分間) により集菌し、これを OD₆₀₀ が 0.5 となるように 10 mM 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 5.2 kb と 4.3 kb 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プラー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アクセスions・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アクセスions・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アクセスions・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アクセスions・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ions・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アクセスions・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アクセスions・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アクセスions・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アクセスions・ナンバー:A

B 0 2 0 0 2 0) 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 X I 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 X I 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 X I (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ions・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ions・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AflI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AflI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AflI(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、HMM 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、同じ緩衝液を満たしたブロットング装置(日本エイドー社製)にセットしブロットングを行い、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。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、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】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DS150 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DS0.05~0.3 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 $^{\circ}$ 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、室温で一晚攪拌し、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 $^{\circ}$ 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。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 $^{\circ}$ C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)(スベルコ社製)を用い、カラム温度170 $^{\circ}$ C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カード社製)およびカラムSP-2330(スベルコ社製)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 - S 1はS 1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 - S 1はS 1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。

【 0 0 7 0 】

【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

【 0 0 7 1 】この結果、S 1グルカンの主成分である水溶性画分に含まれるS - S 1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、T 1グルカンの主成分である非水溶性画分I - T 1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。

【 0 0 7 2 】S 2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、T 2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。S 3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、T 3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 】以上のことから、改変DSであるS 1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S 1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T 1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。

【 0 0 7 4 】改変DSであるS 2またはT 2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S 3およびT 3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。

【 0 0 7 5 】

30
40
50

【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 ttgaaat ttt tactg 25

 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2
 cctttggc ttttactatat 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

27

28

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gtacttgaa tgttatattg tgtg 24

<210> 7

<211> 4581

<212> DNA

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

<400> 7

atgccattta cagaaaaagt aatgcggaaa aagctttata aagttgggaa aagttgggta 60
gttgggtggg tttgtgcttt tgcattaacc gcctcatttg ctftagcaac accaagtgtt 120
ttaggagaca gtagtgtagt tgatgtgagt gcgaataacg ttcaatctgc ttcagataat 180
acaacggata cgcagcagaa cactacggtt accgaagaaa atgataaagt acagctgca 240
gctactaatg acaatgtaac aacagctgca agcgacacaa cacaatctgc tgataataat 300
gtgacagaaa aacagtcaga tgatcatgca cttgataatg aaaaagtcga taacaacaa 360
gatgaagtcg ctcaaaccaa tgttactagc aaaaatgagg aatcagcagt tgcttcaact 420
gacactgatc ctgctgaac gacaactgac gaaacacaac aagttagcgg caagtacgtt 480
gaaaaagacg gtagttggtt ttattatfff gatgatggca aaaaatgctaa aggtttatca 540
acgatagaca acaatattca atatttttac gagagtggta aacaagccaa aggacagtat 600
gtcacaattg ataatacaac atattatfff gataagggct caggtgatga gttactggt 660
ctgcaaagca ttgatgggaa catagttgct ttaacgatg aagggaaca aatttttaat 720
caatattacc aatctgaaaa tggtaacaac tactactttg atgataaagg acacgctgct 780
accggtatta agaatatcga gggcaaaaat tattatfff ataatcttgg gcaactaaaa 840
aaaggcttct ctggtgtgat tgatggtcaa ataatacat ttgatcagga aacagggcaa 900
gaagtttcta acacaacttc tgaataaaaa gaaggtttga cgactcaaaa cacggattat 960
agcgaacata atgcagccca cggtagcggat gctgaggact ttgaaaatat tgacggctat 1020
ttaacagcta gttcatggta tctccaaca ggtattttac gtaacggaac agactgggaa 1080
ccttctacag atacagattt cagaccaata ttgtcagtg ggtggccaga taagaacacc 1140
caggtcaatt atttaatta catggctgat ttaggtttta tcagtaatgc ggacagtttt 1200
gaaactggg atagccaaag ctatttaaat gaagcaagta actatgttca aaaaatcaatt 1260
gaaatgaaaa ttagtgcgca acaaagtaca gagtggttaa aggatgcaat ggcggccttc 1320
attgtcgcgc aaccacagtg gaatgaaact agtgaagata tgagcaatga ccaatttaca 1380
aatggcgcat taacttatgt caacagtcca ctgacacctg acgctaattc aaactttaga 1440
ctacttaatc ggacaccaac aaaccagact ggtgaacaag cgtataatft agataattca 1500
aaaggtggtt ttgaattggt gttagccaat gacgttgata attcaaacc tttagtacia 1560
gcagaacaat tgaattggtt atattatfta atgaattttg gtacgattac ggccaacgac 1620
gcggatgcta attttgatgg tattcgtgta gatgcagtcg acaatgtgga tgctgatttg 1680
ttacaaattg ctgccgatta tttcaacta gcttacggtg ttgatcaaaa tgatgctact 1740
gctaatacagc atctttcaat tttggaagat tggagtcaca atgatcctft gtatgtaaca 1800
gatcaaggaa gcaatcaatt aacctggat gattatgtgc acacacaatt aatctggtct 1860
ctaacaaaat catctgacat acgaggtaca atgcagcgtc tctggatta ttatatggtg 1920
gatcgatcta atgatagtac agaaaacgaa gccattccta attacagctt ttagctgca 1980
cacgacagcg aagtgcaaac ggttatggc caaattgftt ccgatttgta tctgtatggt 2040
gaaaatagtt tagcaccaac aacagaacaa ttggcagctg ctftcaaaat atacaatgaa 2100
gatgaaaaat tagcagacaa aaagtacaca caatataata tggctagtgc ttatgcgatg 2160
ttgctaacca ataaggatac tgttctctgt gtctattatg gcgatttata tacagatgat 2220
ggccaatata tggcaacaaa gtcaccatac tatgatgcga ttaacactft gctaaaggct 2280
agagttcagt atgttgctgg tggccaatcg atgtccgttg atagtaatga cgtgttaaca 2340

29

30

```

agtgttcgct atggtaaaga tgccatgaca gcttctgaca ctggaacatc tgagacgcgt 2400
acggaaggta ttggagtcat cgtcagcaat aacgcgagc tacaattaga ggatgggcat 2460
actgtccat tgcataatggg ggcagctcat aagaaccaag ctatcgtgc ttgttatca 2520
acaactgcag atggattagc ttattatgat actgatgaaa atgcacctgt ggcgtacaca 2580
gatgctaacg gcgatttgat ttttacgaat gaatcaattt atggtgtaca aaatccacaa 2640
gtttctggtt acttggcagt ttgggttccg gtaggtgccc aacaagatca agatgcacga 2700
acggcctctg atacaacaac aaacacgagt gataaagtgt tccattcaaa cgctgctctt 2760
gattctcaag tcatctacga aggtttctca aacttccaag catttgctac agacagcagt 2820
gaatatacaa acgtagtcat cgctcagaat gcggaccaat ttaagcaatg ggggtgtgaca 2880
agcttccaat tggcaccaca atatcgttca agtacagata caagtttctt ggattcaatt 2940
attcaaaacg ggtatgcatt cacggatcgt tatgacttag gttatggcac accgacaaaa 3000
tatggaactg ctgatcagtt gcgcatgct attaaagcct tacatgctag cggatttcaa 3060
gccattgccg attgggtgcc ggaccaaatt tataatttgc cagagcaaga attagctact 3120
gtcacaagaa caaattcatt tggagatgac gatacagatt ctgatattga caatgcctta 3180
tatgtgttac aaagtctgg ggggtgtcaa tatcaagaga tgtatggtgg tgccttctta 3240
gaagagttac aggcactcta tccatcccta ttaaaagtga atcaaatctc aactggcgtt 3300
ccaattgatg gcagtgtaaa gattactgag tgggcgcta agtacttcaa tggctctaac 3360
atccaaggta aagggtctgg atacgtattg aaagatatgg gttctaataa gtactttaag 3420
gtcgtttcga aactgagga tgggtactac ttacaaaac agttaactaa tgatctgtca 3480
gaaactggct ttacacacga tgataaagga atcatctatt atacattaag tggttatcgt 3540
gcccaaatg cattatttca agatgatgat aataactatt actatittga taaaacaggt 3600
catttagtaa caggtttgca aaagattaat aaccatacct acttcttctt acctaatggt 3660
atcgaactgg tcaagagctt cttaaaaaac gaagatgga caattgttta ttctgataag 3720
aaaggctatc aagtttttga tcaatatata actgatcaaa atggaaatgc gtattacttt 3780
gatgatgctg gtgtaatgct taaatcaggg cttgcaacga ttgatggaca tcaacagtat 3840
tttgatcaaa atggtgtgca ggttaaggat aagtttgtga ttggcactga tggttataag 3900
tattactttg aaccaggtag tggtaactta gctatcctac gttatgtgca aaatagtaag 4960
aatcaatggt tctatittga tggtaatggc catgctgtca ctggtttcca aacaattaat 4020
ggtaaaaaac aatatttcta taatgatggt catcaaagta aaggatgaat cattgatgca 4080
gacggggata ctttctatc gagtgccact gatggtcgcc tagtaactgg tgttcagaag 4140
attaatggtt ttacatgac ttttgataac acaggaaatt tgatcacaaa tcagtattat 4200
caattagcag atggtaaata tatgtgttga gatgatagtg gtcgtgcaa aacagggttt 4260
gtattgcaag atggtgtact aagatacttc gatcaaaacg gtgagcaagt gaaagatgct 4320
atcattgtgg atccagatc taacttgagt tattatttca atgcaacaca aggtgtcgt 4380
gtaaaaaatg attatttcca gtatcaaggt aattggtatt taacagatgc taattatcaa 4440
ctatcaaag gttttaaagc agttgacgac agcttacaac attttgatga agtcactggt 4500
gtacaacaa aagatagtc ttaataagt gctcaggga aggtttacca atttgataat 4560
aatggaaatg 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

31

32

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

| | |
|---|-------------|
| 33 | 34 |
| 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 |

| | |
|---|----------------|
| 37 | 38 |
| 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 | |
| | 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 | |
| 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 | |
| | 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 |
| 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 | |
| | 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 |
| 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 | |
| | 1475 1480 1485 |
| Tyr Asp Ala Asn Ser Gly Glu Leu Ile Lys Ser | |
| 1490 | 1495 |

39

40

<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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 41 | 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 | | | |
| 625 | 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 | | | |

45
 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

47

48

<213> Artificial Sequence
<220>
<221> modified_base
<222> 9
<400> 13
gtscckcgig tctaytatgg 20
<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> modified_base
<222> 13
<400> 14
rccyttagcr 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 tttacagc 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

49

50

atgtataaat ctgggaaaat gttagtcatt gcagggagtg tttcaataat tgggtgcacc 60
agttttattc aacaagcaca agctgatgtt tcacaaaaca atggggtagt agtggccacg 120
gcagtcgatc 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 aaggctaca caacagcagc tacatcaaca 420
gatgataagg ctacaacaac agcagctaca tcaacagatg ataaggctac aacaacagca 480
gctacatcaa cagatgataa agctgcaaca acagcagaca catcaacgga tgataaaca 540
gcaacaacag tcggcacatc tgataataac aattcaacta cagcagagcga taaagatgta 600
agttcatcgg cacaaaaag 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 aagtgaaaat tgaagaaaa attagtcaag aaggccaac acaatggcta 1200
aaggatgata tttcaaaaatt tgttgatagc caatcaaatt ggaatattgc tagtgaatca 1260
aaaggaactg atcatttgca aggtggtgca ttgttgtatg tcaatagtga taaaacacca 1320
gatgccaatt ctgattatcg attacttaac cgcacaccaa caaatcaaac aggcacgcct 1380
ttgtatcaga cagatccaac tcaaggtggt tatgacttcc tcttgccaa tgatgtggat 1440
aattcaaac cagttgttca agcagaacaa ctaaattgga tgtattactt gttaaacttt 1500
ggatcaatta ctaataacga tgcagatgct aactttgata gtattcgagt agatgctgtt 1560
gataacgttg atgccgactt attgcaaat gcagctgatt atttcaaggc agcataaggc 1620
gtcgacaaga gtgatgcaat ttcgaatcaa catgtttcca ttcttgaaga ctggagtac 1680
aatgatgctg aatatgtgaa agacaatggc gacaatcaat tgtcaatgga taataaattg 1740
cgtttgtcat taaaatactc actcactatg ccagcagtcg atcaatatgg taataaaga 1800
agtggattag aaccattttt gacaaatagt ttagttgatc gtacaaatga ttcgacagat 1860
aataccgcac aacccaatta ttctttgtt 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 atgcaattga tactttgctg aagtctcgta tcaagtatgt ttctggcggg 2220
caacaatgt ctatgaaata tatgcaaggt gatagtagta tggctgctga cagttataga 2280
ggcattttga catcagttcg ttatggtaat ggtgccatga ctgctaccga tgcagggaca 2340
aatgaaacac gtacgcaagg tattgcagta attgaaagta ataaccaga ttggaagttg 2400
agcagtlacag atcaagtagt tgtagatatg ggcatagcgc acaaaaatca ggcttatcgt 2460
cctgctttgt taacaactaa agatggcata gatacttatg tatctgatag tgatgtctca 2520
caaagcttaa taagatatac aaatagtaat gggcaactta ttttcaatag ttcagatatt 2580
gttggtacag caaatccaca agtttctgga tacttggcgg tctgggtacc cgttgggtgct 2640
tcagatactc aagatgctgc aactgaaagt agtacagcaa caactactga tggacaaca 2700
ttacattcaa atgccgact tgattctcaa gttatttatg aaagtttctc taacttcaa 2760
tctacaccaa caacagaagc tgaatatgct aatgtgcaaa ttgcaaacaa tactgattta 2820
tacaagagtt ggggaattac gaacttcgag ttccaccac aatatcgttc aagtacggat 2880
agtagtttct tagattcaat tattcaaaa ggttatgcat ttactgatcg ttatgatctt 2940
ggattcaata caccaacgaa gtatggtact gtagatcaac tccgtacagc tattaaagct 3000

51

52

```

ttgcatgcca caggtatcaa 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
aaccaaatft caaccggcgt accaatggat gctagtgaaa agataaaaga atggtccgct 3300
aagtacttta acggtactaa cattcaaggt cgtggtgctt actatgtcct taaggactgg 3360
gctacaaatg agtacttcaa ggtaagcaca tcaagcaata gcaatgtatt ttgccaaag 3420
cagttgacga atgaagaatc aaacactgga tttatttcaa ctgatggtgg gatgacatat 3480
tattctacaa gtggatacca ggcaaaagat acattcatcc aagatgacaa atctaattgg 3540
tattactttg acaagaatgg ttatatgaca tatggtttcc agacagtcaa tgataataat 3600
tattacttct tgcctaatgg tattgaatta caagatgcta tcttagaaga tagtaaagga 3660
aatgtttatt atttcaatca atatggcaaa caagctgttg atggatacta catgttggct 3720
aataaaactt ggcgttactt tgacaaaaat ggtgttatgg ctaatgctgg cttacaacc 3780
gtgactgttg atgggcaggt gcatatccaa tactttgata agaacggtat tcaggtaaaa 3840
gggacttccg tgaagatgc agacggaaag 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 tttgaaaagt tatcagatgg atcatgggcg 4140
tactttaata aaaaaggtaa catcgtaacg ggcgcacaag tcattaatgg tcaacatttg 4200
ttctttgaaa gcaatggtaa ccaagttaag ggtcgtgaat acacggctac tgatgggaag 4260
atgctgctact acgatgcaga ttctggtgat atggtgacga atcgctttga acgaatatca 4320
gacggatcat gggcatatft tgatgctaat ggtgttgctg taactgggga acaaaaata 4380
aatggacaac aactgtatft tgatgccaat ggtcatcaag ttaagggagc cgcagtaaaa 4440
caagctgacg gttagccaaa atattatgac gcaaattctg gagagctgat taaaagc 4497

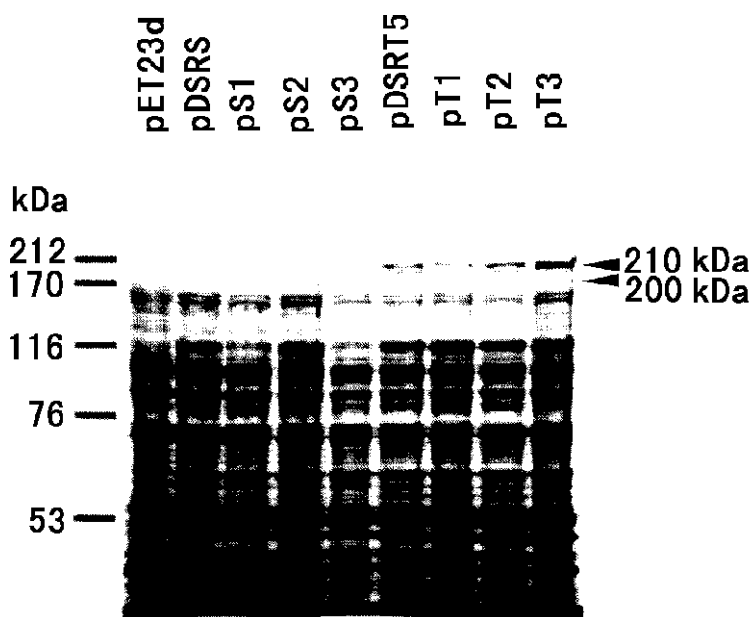
```

【図面の簡単な説明】

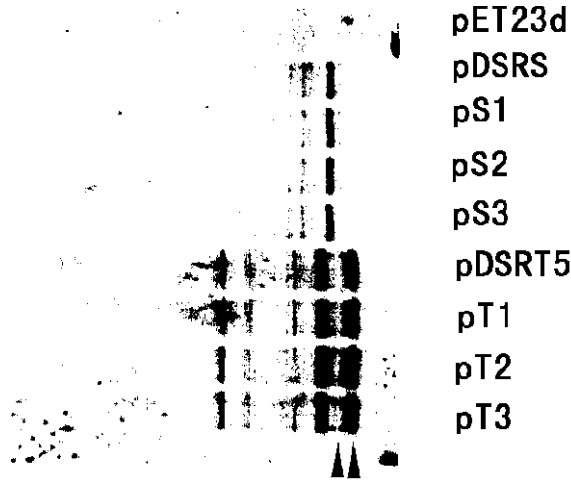
【図 2】 実施例 4 におけるウエスタンブロット分析の結果である。

【図 1】 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 1】



【図2】



フロントページの続き

| | | | | |
|--------------------------|-------|---------|---------|---------|
| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーム(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 ターム(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 |