

(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

特開平11-155565

(43)公開日 平成11年(1999)6月15日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 9/78		C 1 2 N 9/78
C 0 8 B 37/08		C 0 8 B 37/08
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21
15/09	Z N A	C 1 2 P 19/26
// C 1 2 P 19/26		C 1 2 N 15/00 Z N A A

審査請求 有 請求項の数4 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平9-345737	(71)出願人	591031360 農林水産省食品総合研究所長 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(22)出願日	平成9年(1997)12月2日	(72)発明者	徳安 健 茨城県つくば市吾妻1丁目1-1-603-303
		(72)発明者	森 隆 茨城県つくば市松代5丁目9-5-626-2
		(72)発明者	濱松 潮香 茨城県つくば市竹園1丁目13-2-803-202
		(74)代理人	弁理士 久保田 藤郎 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キチン脱アセチル化酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体

(57)【要約】

【課題】 不完全菌由来のキチン脱アセチル化酵素の一層の利用を図るため、該酵素の遺伝子をクローニングすることによって、遺伝子の構造を解明し、遺伝子を発現させて該酵素の工業的生産に寄与すること。

【解決手段】 タンパク質をコードするキチン脱アセチル化酵素遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドベクターおよび該プラスミドベクターで形質転換された形質転換体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするキチン脱アセチル化酵素遺伝子。

【請求項2】 配列表の配列番号1記載の塩基配列にハイブリッドする塩基配列からなり、かつN-アセチル化アミノ糖残基中のN-アセチル基の脱アセチル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA塩基配列。

【請求項3】 請求項1記載のキチン脱アセチル化酵素遺伝子を含むプラスミドベクター。

【請求項4】 請求項3記載のプラスミドベクターで形質転換された形質転換体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、キチン脱アセチル化酵素遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドベクター及び形質転換体に関する。キチン脱アセチル化酵素(EC 3.5.1.41)は、キチンのN-アセチルグルコサミン残基上のN-アセチル基を加水分解する酵素であり、N-アセチルグルコサミン残基をグルコサミン残基と酢酸に分解する。キチンの脱アセチル化反応によって、食品工業、医薬品工業等の分野において有用な素材であるキトサンが調製される。このことから、本酵素は廃棄物資源であるキチンの有効利用を図る上で有用なものである。さらに、本酵素はキチンオリゴ糖からキトサンオリゴ糖を調製する場合やその他のアミノ糖残基上のN-アセチル基を酵素的に脱アセチル化する場合などに用いることができる。

## 【0002】

【従来の技術】上記したように、キチン脱アセチル化酵素は、キチン、キチンオリゴ糖、その他のN-アセチル化アミノ糖残基を含む化合物のN-アセチル基を加水分解する酵素である。キチンの脱アセチル化物であるキトサンは、前記したように、多方面において有用性が評価されている。食品分野に限っても、増粘作用、コレステロール低下作用、血圧降下作用、痛風・高尿酸血症の予防効果、骨粗鬆症予防効果、ビフィズス菌の生育促進、大腸菌やウェルシュ菌の生育阻害、抗腫瘍活性等を挙げることができる。

【0003】従来、糖残基上のN-アセチル基の加水分解は、主にアルカリを用いた化学的加水分解法によって行われていた。しかし、この方法を行うと、副反応が起こること、反応の制御が困難なこと及びアルカリ廃液が生成すること等が問題点として指摘されていた。

【0004】この課題を克服する手段として、キチン脱アセチル化酵素を用い、温和な条件下で酵素的に脱アセチル化を行う方法について精力的な研究が行われている。その中でも、不完全菌由来のキチン脱アセチル化酵素(特開平8-289785号公報)が注目を浴びている。この不完全菌由来のキチン脱アセチル化酵素は、酵

素反応が反応生成物である酢酸によって阻害されにくい上に、低級キチンオリゴ糖等に対しても脱アセチル化を行うことが可能である等の利点があり、工業的な利用に非常に適している。さらに、該酵素は、キチン質以外にもN-アセチル化アミノ糖残基中のN-アセチル基を脱離する活性を広く持つことから、新規糖鎖を合成する場合に利用することができる。

【0005】キチン脱アセチル化酵素を得るための微生物として最も研究されている不完全菌は、コレトリカム・リンデムチアナム(*Colletotrichum lindemuthianum*)である。しかしながら、このコレトリカム・リンデムチアナムは、植物病原菌であるため、その取扱いが難しく、安全性の点で問題があった。さらに、菌体培養液中に該酵素が分泌されるまでに長時間を要する上に、回収される酵素量が少ないことから、生産性の面でも問題があった。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記課題を解決し、不完全菌由来のキチン脱アセチル化酵素の一層の利用を図るため、該酵素の遺伝子をクローニングすることによって、遺伝子の構造を解明し、遺伝子を発現させて該酵素の工業的生産に寄与することである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、キチン脱アセチル化酵素の構造遺伝子を解明するために研究を重ねた結果、該酵素の生産能を有するコレトリカム属微生物からキチン脱アセチル化酵素遺伝子のクローニングに成功し、これに基づいて本発明を完成した。

【0008】請求項1記載の本発明は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするキチン脱アセチル化酵素遺伝子である。請求項2記載の本発明は、請求項1記載の遺伝子の塩基配列にハイブリッドする塩基配列であり、かつN-アセチル化アミノ糖残基中のN-アセチル基の脱アセチル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA塩基配列である。請求項3記載の本発明は、請求項1記載のキチン脱アセチル化酵素遺伝子を含むプラスミドベクターである。請求項4記載の本発明は、請求項3記載のプラスミドベクターで形質転換された形質転換体である。

## 【0009】

【発明の実施の形態】本発明者らは、キチン脱アセチル化酵素生産能を有するコレトリカム属不完全菌の培養液から回収したキチン脱アセチル化酵素を高度に精製し、そのN末端のアミノ酸配列を決定した。さらに、このキチン脱アセチル化酵素をタンパク質加水分解酵素によって分解することによってペプチドフラグメントを調製し、それらのアミノ酸配列を決定した。

【0010】次いで、それらのアミノ酸配列から推定した塩基配列を基にしてプライマーを作成した。これを用いて、コレトリカム属菌株から抽出したゲノムDNA

として行ったポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により、増幅産物を得た。得られたPCR産物をクローニングし、DNAシーケンサーで分析してDNA配列を解読した。このDNA産物をアミノ酸に翻訳したところ、先に得られたペプチドフラグメントに相当するアミノ酸配列が認められたことから、これらのペプチドフラグメントが、キチン脱アセチル化酵素遺伝子の一部であることが判明した。

【0011】そこで、得られたDNA配列をもとに、コドンの縮重を十分に考慮したプライマーを再構築し、RNAから逆転写酵素を用いて作製したcDNAを鋳型としたキチン脱アセチル化酵素のクローニングを行った。まず、cDNAから、オリゴdT配列を含むプライマー及び前記したプライマーを用いてPCRを行い、既知の遺伝子配列から外へ3'側の配列を解読し、終止コドンに至るDNA塩基配列の決定を経てC末端部分のアミノ酸配列を決定した。続いて、市販の5'-RACEキットを用いてcDNAの上流部分にアダプター配列をとりつけ、アダプター部分の配列の一部をコードしたプライマーと既知遺伝子配列部分から作製したプライマーを用いてPCRを行い、既知遺伝子配列部分から5'側へ、開始コドンの上流に至るまでのDNA塩基配列を決定し、構造遺伝子部分については、対応するアミノ酸配列を決定した。

【0012】さらに、開始コドンとその付近の、シグナル配列と推定される部分の数個のアミノ酸に対応する部分を含むプライマー及びC末端の数個のアミノ酸に対応する部分を含むプライマーを作製し、これを用いてPCRを行うことによって、キチン脱アセチル化酵素の全構造遺伝子を含む増幅断片を獲得した。これをプラスミドベクターにライゲーションし、常法により大腸菌に形質転換し、形質転換体を得た。

【0013】以下に、本発明を詳しく説明する。前記したように、本発明のキチン脱アセチル化酵素遺伝子は、キチン脱アセチル化酵素生産能を有するコレトリカム属微生物に由来するものである。このようなキチン脱アセチル化酵素生産能を有するコレトリカム属不完全菌としては、コレトリカム・リンデムチアナMATCC56676等がある。

【0014】キチン脱アセチル化酵素は、上記微生物菌体培養液から得ることができる。具体的には、上記の菌体を常法に従い栄養培地で培養後、菌体培養液を回収し、該培養液をカラムクロマトグラフィ、FPLC、HPLC等の精製手段を用いて処理し、高度に精製したキチン脱アセチル化酵素を得ることができる。

【0015】次に、この精製したキチン脱アセチル化酵素のN末端のアミノ酸配列を決定する。配列の決定には、プロテインシケンサーHPG1005A（HEWLETTPACKARD社製）を用いることができる。決定したN末端のアミノ酸配列は配列表の配列番号2に

示す通りである。さらに、このキチン脱アセチル化酵素を酵素分解して、ペプチドフラグメントを調製し、それらのアミノ酸配列を決定した（配列表の配列番号3～5参照）。

【0016】解読できたアミノ酸配列から塩基配列を解読し、これをもとに作製したプライマーを用いて、コレトリカム属不完全菌から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。得られたバンド（PCR産物）をクローニングし、DNAシーケンサーABI PRISM 377あるいは310（株式会社パーキンエルマープライドバイオシステムズ）で分析してDNA塩基配列を解読した。得られたDNA塩基配列を配列表の配列番号6に示す。

【0017】このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、先に得られたペプチドフラグメント（配列表の配列番号3～5参照）の一部分に相当するアミノ酸配列が認められたことから、これらのペプチドフラグメントがキチン脱アセチル化酵素遺伝子の一部であることを確認することができた。

【0018】そこで、得られたDNA配列をもとに、コドンの縮重を十分に考慮したプライマーを再構築し、RNAから逆転写酵素を用いて作製したcDNAを鋳型としたキチン脱アセチル化酵素のクローニングを行った。まず、逆転写酵素によってRNAからオリゴdT配列を含むプライマーを用いて作製したcDNAから、オリゴdT配列を含むプライマー及び前記したプライマーを用いてPCRを行い、既知遺伝子配列から外へ3'側の配列を解読し、終止コドンに至るDNA塩基配列の決定を経てアミノ酸配列を決定した。

【0019】続いて、5'-RACE用キット（Marathon cDNA Amplification Kit, クローンテック社）を用いてcDNAの上流部分にアダプター配列をとりつけ、アダプター部分の配列の一部をコードしたプライマーと既知遺伝子配列部分から作製したプライマーを用いてPCRを行い、既知の遺伝子配列部分から5'側へ、開始コドンの上流に至るまでのDNA塩基配列を決定し、開始コドンより始まるシグナル配列と推定される領域及び成熟タンパクの構造遺伝子部分については、対応するアミノ酸配列を決定した。

【0020】さらに、開始コドンとその付近の、シグナル配列と推定される部分の数個のアミノ酸に対応する部分を含むプライマー及びC末端の数個のアミノ酸に対応する部分を含むプライマーを作製し、これを用いてPCRを行うことによって、キチン脱アセチル化酵素の全構造遺伝子を含む増幅断片を獲得した。この断片は、開始コドンから始まるシグナル配列と推定される領域の後に、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列に対応するDNA配列を含んでおり、請求項1記載の脱アセチル化酵素の全酵素遺伝子を含むものである。

【0021】請求項1記載の本発明のキチン脱アセチル

化酵素遺伝子は、配列番号1記載の塩基配列またはそれと実質的に同一の機能を有するものである。ここで、実質的に同一の機能を有するとは、コドンの縮重という事実により、同じアミノ酸残基をコードする遺伝子であれば、その配列が全体にわたって配列番号1記載の遺伝子と異なっている場合でも、実質的に同一であることを意味する。

【0022】請求項2記載の本発明は、上記請求項1記載の遺伝子の塩基配列にハイブリッドする塩基配列からなり、かつN-アセチル化アミノ糖残基中のN-アセチル基の脱アセチル化酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA配列である。全体の相同性が約85%以上の場合、上記の配列番号1の配列を参考にして、DNAハイブリダイゼーションや遺伝子増幅法等の公知の遺伝子工学的手法を用いて、容易に請求項1記載の本発明とほぼ相同の遺伝子をクローニングすることが可能である。

【0023】請求項3記載の本発明は、上記の遺伝子を含むプラスミドベクターであり、請求項4記載の本発明は、該プラスミドベクターで形質転換された形質転換体である。具体的には、請求項1記載の遺伝子の塩基配列を含むDNA断片をプラスミドベクターpCR2.1(インビトロジェン社)等のプラスミドベクターにライゲーションし、常法により大腸菌に形質転換することにより得ることができる。プラスミドベクターpCR2.1(インビトロジェン社)を用いて形質転換された大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM BP-6191である。

【0024】なお、当業者に明らかなように、本発明に係るDNA配列を用いて、原核生物もしくは真核生物のいずれかの宿主細胞内でこのキチン脱アセチル化酵素を大量に発現させることができる。すなわち、下記のような常法に従って発現させることができる。例えば、本発明に係る遺伝子を、適切な調節シグナルと共に原核生物もしくは真核生物のいずれかの発現ベクターに挿入し、そしてこれを細胞の形質転換に用いる。調節シグナル及び発現ベクターには既に様々なものが開発、市販されており、当業者によく知られたものを使用することができる。さらに、ベクターを用いた一連の操作及び形質転換の方法についても、既に一般的なものであり、当業者であれば実施可能である。例えば、J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (ed.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989等に詳細に説明されている方法により実施することができる。

【0025】

【実施例】次に、実施例によって本発明を説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

実施例1

スラント培地で継代培養している不完全菌コレトトリカム・リンデムチアナム(*Colletotrichum lindemuthianum*) ATCC 56676株を液体栄養培地に接種し、22で暗所にて18日間培養を行った。菌体を濾別することによって菌体培養液を回収した後、硫酸沈殿法、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を活用し、高度に精製されたキチン脱アセチル化酵素を得た。

【0026】次に、この精製したキチン脱アセチル化酵素のN末端のアミノ酸配列を決定した。配列の決定にはプロテインシ-ケンサ-HPG1005A(HEWLETT PACKARD社製)を用いた。決定したN末端のアミノ酸配列は、配列表の配列番号2に示す通りである。

【0027】トリフルオロ酢酸を含む溶媒を用いて逆相クロマトグラフィーによって酵素タンパク質を精製した際には、N末端部分がピログルタミル化を受け、配列を読むことができなかつたが、ピログルタメート・アミノペプチダーゼ(ベーリンガー・マンハイム社)を作用させてシーケンス反応を行うことにより、N末端から2残基目のペプチド配列から順番に配列を解読することができた。

【0028】さらに、このキチン脱アセチル化酵素をエンドプロテイナーゼLys-C(ベーリンガー・マンハイム社)及びエンドプロテイナーゼArg-C(ベーリンガー・マンハイム社)によって限定分解して、ペプチドフラグメントを調製し、それらのアミノ酸配列を決定した(配列表の配列番号3~5参照)。

【0029】解読できたアミノ酸配列からコドン縮重の少ない領域を選び、これをもとに作製したプライマーを用いて、コレトトリカム属不完全菌から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。得られたバンド(PCR産物)をクローニングし、DNAシーケンサーABI PRISM 377(株式会社パーキンエルマーアプライドバイオシステムズ)で分析してDNA塩基配列を解読した結果、配列表の配列番号6に示す444bpの塩基配列を決定することができた。

【0030】このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、先に得られたペプチドフラグメント(配列表の配列番号3~5参照)の一部分に相当するアミノ酸配列が認められたことから、これらのペプチドフラグメントがキチン脱アセチル化酵素遺伝子の一部であることを確認することができた。そこで、得られたDNA配列をもとに、コドンの縮重を十分に考慮したプライマーを再構築し、RNAから逆転写酵素(RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1、宝酒造株式会社)を用いて作製したcDNAを鋳型としたキチン脱アセチル化酵素のクローニングを行った。

【0031】まず、RNAを鋳型として逆転写酵素を用いてオリゴdT配列を含むプライマーと反応させて作製

した cDNA から、オリゴ dT 配列を含むプライマー及び前記したプライマーを用いて PCR を行い、既知の遺伝子配列から外へ 3' 側の配列を解読し、終止コドンに至る DNA 塩基配列の決定を経てアミノ酸配列を決定した。

【0032】続いて、5' - RACE 用キット (Marathon cDNA Amplification Kit, クローンテック社) を用いて cDNA の上流部分にアダプター配列をとりつけ、アダプター部分の配列の一部をコードしたプライマーと既知遺伝子配列部分から作製したプライマーを用いて PCR を行い、既知遺伝子配列部分から 5' 側へ、開始コドンの上流に至るまでの DNA 塩基配列を DNA シークエンサー ABI PRISM 310 (株式会社パーキンエルマーアプライドバイオシステムズ) で分析して決定した。構造遺伝子部分については、対応するアミノ酸配列を決定した。

【0033】さらに、開始コドンとその付近の、シグナル配列と推定される部分の数個のアミノ酸に対応する部分を含むプライマー及び C 末端の数個のアミノ酸に対応する部分を含むプライマーを作製し、これを用いて PCR を行うことによって、キチン脱アセチル化酵素の全構造遺伝子を含む増幅断片を獲得した。この断片をプラスミドベクター pCR2.1 (インビトロジェン社) にライゲーションし、常法により大腸菌に形質転換した。これをアンピシリン (50 µg/ml) 及びメシチリン (80 µg/ml) を含む LB 寒天培地上にまき、37 °C で一晩培養することによって形質転換体 (FERMBP-6191) を選別し、導入されたプラスミドを回収して該酵素遺伝子の塩基配列を解読した (配列表の配列番号 7 参照)。その結果、この挿入断片は、開始コドンから始まりシグナルと推定される配列の後に、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を含んでおり、請求項 1 記載の脱アセチル化酵素の全酵素遺伝子を含むものであることが明らかとなった。

#### 【0034】

##### 配列

CAG GTT CCC GTG GGC ACA CCC ATC CTC CAG TGC ACC CAG CCT GGT TTG	48
Gln Val Pro Val Gly Thr Pro Ile Leu Gln Cys Thr Gln Pro Gly Leu	
1 5 10 15	
GTT GCT CTG ACC TAC GAC GAC GGT CCT TTC ACC TTC ACC GCT CAG CTC	96
Val Ala Leu Thr Tyr Asp Asp Gly Pro Phe Thr Phe Thr Ala Gln Leu	
20 25 30	
CTC GAC ATC TTG AAG CAG AAC GAC GTC AAG GCG ACC TTC TTC GTC AAC	144
Leu Asp Ile Leu Lys Gln Asn Asp Val Lys Ala Thr Phe Phe Val Asn	
35 40 45	
GGC AAC AAC TGG GCC AAC ATC GAG GCC GGA TCC AAC CCC GAC ACG ATC	192
Gly Asn Asn Trp Ala Asn Ile Glu Ala Gly Ser Asn Pro Asp Thr Ile	
50 55 60	
CGC CGC ATG CGC GCC GAC GGC CAC CTC GTC GGC TCT CAC ACG TAC GCT	240
Arg Arg Met Arg Ala Asp Gly His Leu Val Gly Ser His Thr Tyr Ala	

【発明の効果】本発明の請求項 1 記載のキチン脱アセチル化酵素遺伝子を発現させて得られる酵素は、キチン、キチンオリゴ糖、その他の N - アセチル化アミノ糖残基上の N - アセチル基を脱アセチル化する反応を進行させ、食品加工及び医薬品工業等の分野において有用な素材であるキトサン、キトサンオリゴ糖あるいはその他の N - 脱アセチル化糖を効率的に調製することができる。

【0035】従来、コレトリカム属等の植物病原菌からキチン脱アセチル化酵素を得るためには、病原菌を採取するための安全上及び管理上の問題があり、また培養に多くの日数を要する上に、酵素の収量も満足すべきものではなかった。しかしながら、本発明の請求項 3 記載のキチン脱アセチル化酵素遺伝子を含むプラスミドを用いて、適切な原核生物あるいは真核生物中で該遺伝子を発現させることにより、上記の諸問題に煩わされることなく、該酵素を安全、迅速、かつ大量に獲得することが可能となる。したがって、本発明により、キチン脱アセチル化酵素を活用した素材生産産業の振興に拍車がかかるものと期待される。

#### 【0036】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：663

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA 構造遺伝子部分

起源

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (*Colletotrichum lindemuthianum*)

株名：ATCC 56676

配列の特徴

特徴を示す記号：CDA

存在位置：1...663

特徴を決定した方法：E

65	70	75	80	
CAC CCG GAC CTC AAC ACG CTC TCC TCC GCG GAC CGC ATC TCC CAG ATG				288
His Pro Asp Leu Asn Thr Leu Ser Ser Ala Asp Arg Ile Ser Gln Met				
	85	90	95	
CGG CAG CTC GAG GAG GCC ACC CGC CGC ATC GAC GGC TTC GCG CCC AAG				336
Arg Gln Leu Glu Glu Ala Thr Arg Arg Ile Asp Gly Phe Ala Pro Lys				
	100	105	110	
TAC ATG CGC GCG CCG TAC CTG TCG TGC GAC GCG GGC TGC CAG GGC GAC				384
Tyr Met Arg Ala Pro Tyr Leu Ser Cys Asp Ala Gly Cys Gln Gly Asp				
	115	120	125	
CTC GGC GGC CTC GGA TAC CAC ATC ATC GAC ACC AAC CTC GAC ACC AAG				432
Leu Gly Gly Leu Gly Tyr His Ile Ile Asp Thr Asn Leu Asp Thr Lys				
	130	135	140	
GAC TAC GAG AAC AAC AAG CCC GAG ACC ACC CAC CTC TCG GCC GAG AAG				480
Asp Tyr Glu Asn Asn Lys Pro Glu Thr Thr His Leu Ser Ala Glu Lys				
	145	150	155	160
TTC GAC AAC GAG CTG AGC GGC GAC GTC GGC GCC AAC AGC TAC ATT GTC				528
Phe Asp Asn Glu Leu Ser Gly Asp Val Gly Ala Asn Ser Tyr Ile Val				
	165	170	175	
CTC TCG CAC GAC GTC CAC GAG CAG ACG GTC GTC TCC CTC ACG CAG AGG				576
Leu Ser His Asp Val His Glu Gln Thr Val Val Ser Leu Thr Gln Arg				
	180	185	190	
CTG ATT GAC ACG CTC AAG AGC AAG GGC TAC CGC GCC GTC ACC GTC GGC				624
Leu Ile Asp Thr Leu Lys Ser Lys Gly Tyr Arg Ala Val Thr Val Gly				
	195	200	205	
GAG TGC CTC GGC GAC GCC CCG GAG AAC TGG TAC AAG GCG				663
Glu Cys Leu Gly Asp Ala Pro Glu Asn Trp Tyr Lys Ala				
	210	215	220	

【0037】配列番号：2

配列の長さ：51

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Gln Val Pro Val Gly Thr Pro Ile Leu Gln Cys Thr Gln Pro Gly Leu			
1	5	10	15
Val Ala Leu Thr Tyr Asp Asp Gly Pro Phe Thr Phe Thr Ala Gln Leu			
	20	25	30
Leu Asp Ile Leu Lys Gln Asn Asp Val Lys Ala Thr Phe Phe Val Asn			
	35	40	45
Gly Asn Asn			
	50		

【0038】配列番号：3

配列の長さ：50

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum)

株名：ATCC 56676

直接の起源

キチン脱アセチル化酵素

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum)

株名：ATCC 56676

直接の起源

## キチン脱アセチル化酵素の分解物

## 配列

Ala Thr Phe Phe Val Asn Gly Asn Asn Trp Ala Asn Ile Glu Ala Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Asn Pro Asp Thr Ile Arg Arg Met Arg Ala Asp Gly His Leu Val  
                   20                    25                    30  
 Gly Ser His Thr Tyr Ala His Pro Asp Leu Asn Thr Leu Ser Ser Ala  
                   35                    40                    45  
 Asp Arg  
                   50

【0039】配列番号：4

起源

配列の長さ：84

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum)

配列の型：アミノ酸

株名：ATCC 56676

鎖の数：一本鎖

直接の起源

トポロジー：直鎖状

キチン脱アセチル化酵素の分解物

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

## 配列

Tyr Met Arg Ala Pro Tyr Leu Ser Xaa Asp Ala Gly Xaa Gln Gly Asp  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Gly Gly Leu Gly Tyr His Ile Ile Asp Thr Asn Leu Asp Xaa Lys  
                   20                    25                    30  
 Asp Tyr Glu Asn Asn Lys Xaa Glu Thr Thr His Leu Ser Ala Glu Lys  
                   35                    40                    45  
 Phe Asp Asn Glu Leu Ser Gly Asp Val Gly Ala Asn Ser Tyr Ile Val  
                   50                    55                    60  
 Leu Ser His Asp Val His Glu Gln Thr Val Val Ser Leu Thr Gln Arg  
                   65                    70                    75                    80  
 Leu Ile Asp Thr  
                   84

【0040】配列番号：5

起源

配列の長さ：27

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum)

配列の型：アミノ酸

株名：ATCC 56676

鎖の数：一本鎖

直接の起源

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

キチン脱アセチル化酵素の分解物

フラグメント型：中間部フラグメント

## 配列

Leu Ile Asp Thr Xaa Lys Ser Lys Gly Tyr Arg Ala Val Thr Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Xaa Leu Gly Asp Ala Pro Glu Asn Trp Tyr  
                   20                    25                    27

【0041】配列番号：6

起源

配列の長さ：444

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum)

配列の型：核酸

株名：ATCC 56676

鎖の数：一本鎖

直接の起源

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

PCR反応物

## 配列

AACATCGAGG CCGGGTCCAA CCCCACACG ATCCGCCGCA TCGCGCCGA CGCCACCTC 60

GTCGGCTCTC ACACGTACGC TCACCCGGAC CTCAACACGC TCTCCTCCGC GGACCCGATC 120  
 TCCCAGATGC GGCAGCTCGA GGAGGCCACC CGCCGCATCG ACGGCTTCGC GCCCAAGTAC 180  
 ATGCGCGCGC CGTACCTGTC GTGCGACGCG GGCTGCCAGG GCGACCTCGG CGGCCTCGGA 240  
 TACCACATCA TCGACACCAA CCTCGACACC AAGGACTACG AGAACAACAA GCCCGAGACC 300  
 ACCCACCTCT CGGCCGAGAA GTTCGACAAC GAGCTGAGCG GCGACGTCGG CGCCAACAGC 360  
 TACATTGTCC TCTCGCACGA CGTCCACGAG CAGACGGTCG TCTCCCTCAC GCAGAGGCTG 420  
 ATTGACACGC TCAAGAGCAA GGGC 444

【0042】配列番号：7

配列の長さ：756

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

起源

生物名：コレトリカム・リンデムチアナム (Colletotrichum lindemuthianum)

株名：ATCC 56676

直接の起源

P C R 反応物

配列

GTCGACATGC ACTTCTCGAC CCTTCTTGGC GCCGCGGCTA CTGCTGCTCT CGCTGGCAGC 60  
 ACGAACGCAA GCCCTCTCGC CCGTCGCCAG GTTCCCGTGG GCACACCCAT CCTCCAGTGC 120  
 ACCCAGCCTG GTCTGGTTGC TCTGACCTAC GACGACGGTC CTTTCACCTT CACCGCTCAG 180  
 CTCCTCGACA TCTTGAAGCA GAACGACGTC AAGGCGACCT TCTTCGTCAA CGGCAACAAC 240  
 TGGGCCAACA TCGAGGCCGG ATCCAACCCC GACACGATCC GCCGCATGCG CGCCGACGGC 300  
 CACCTCGTCG GCTCTCACAC GTACGCTCAC CCGACCTCA ACACGCTCTC CTCCGCGGAC 360  
 CGCATCTCCC AGATGCGGCA GCTCGAGGAG GCCACCCGCC GCATCGACGG CTTCGCGCCC 420  
 AAGTACATGC GCGCGCCGTA CCTGTGCTGC GACGCGGGCT GCCAGGGCGA CCTCGGCGGC 480  
 CTCGGATACC ACATCATCGA CACCAACCTC GACACCAAGG ACTACGAGAA CAACAAGCCC 540  
 GAGACCACCC ACCTCTCGGC CGAGAAGTTC GACAACGAGC TGAGCGGGCA CGTCGGCGCC 600  
 AACAGCTACA TTGTCCTCTC GCACGACGTC CACGAGCAGA CGGTCGTCTC CCTCACGCAG 660  
 AGGCTGATTG ACACGCTCAA GAGCAAGGGC TACCGCGCCG TCACCGTCGG CGAGTGCCTC 720  
 GGCGACGCCC CGGAGAAGTGTGTACAAGGGC AGATCT 756

フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:00)  
 (C 1 2 P 19/26  
 C 1 2 R 1:19)

Z N A

(72) 発明者 林 清

茨城県土浦市乙戸南 1 丁目 5 - 3