

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12)特 許 公 報 ( B 2 )

(11)特許番号

## 特許第3366933号

( P 3 3 6 6 9 3 3 )

(45)発行日 平成15年 1月14日(2003.1.14)

(24)登録日 平成14年11月 8日(2002.11.8)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 1/21
1/21		9/26
9/26		15/00
		Z
		ZNA A

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平10 - 90702	(73)特許権者	501145295 独立行政法人 食品総合研究所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地12
(22)出願日	平成10年 3月20日(1998.3.20)	(73)特許権者	000195568 生物系特定産業技術研究推進機構 埼玉県さいたま市日進町 1 丁目40番地 2
(65)公開番号	特開平11 - 266873	(72)発明者	金子 哲 茨城県つくば市春日 4 丁目 6 - 5 サンテ ラス A - 202
(43)公開日	平成11年10月 5日(1999.10.5)	(72)発明者	林 清 茨城県土浦市乙戸南 1 丁目 5 - 3
審査請求日	平成11年 7月28日(1999.7.28)	(74)代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎 (外 1 名)
微生物の受託番号	F E R M P - 1 6 7 1 3	審査官	新見 浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】キシラナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列を有するストレプトマイセス オリバセオビリディス由来のキシラナーゼ前駆体の遺伝子。

【請求項 2】 請求項 1 記載のキシラナーゼ前駆体の遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 3】 請求項 2 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 ( F E R M P - 1 6 7 1 3 )。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 記載の塩基配列を有するストレプトマイセス オリバセオビリディス由来のキシラナーゼの遺伝子。

【請求項 5】 請求項 4 記載のキシラナーゼの遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 6】 請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌。

2

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、キシラナーゼ遺伝子、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。キシラナーゼは、植物ヘミセルロースの主要成分である - 1 , 4 - D - キシランをランダムに分解する酵素であり、正式な名称はエンド - 1 , 4 - キシラナーゼ ( EC 3.2.1.8 ) である。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】キシラナーゼは、木材、稲ワラ等に含まれるキシランを分解する作用を有することから、広葉樹キシランからキシロオリゴ糖を生産する技術で活用されている他、パルプの漂白に用いる塩素の消費量を減らすためのパルプ漂白用酵素としての利用が期待されている。

【 0 0 0 3 】キシラナーゼの工業的生産には、キシラナーゼ生産能を有する微生物が用いられている。キシラナーゼ生産能を有する微生物としては、主にストレプトマイセス属に属する微生物が知られている。しかしながら、これら微生物が有するキシラナーゼ遺伝子の塩基配列については、未解明であった。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、キシラナーゼ生産能を有する微生物からキシラナーゼ遺伝子をクローニングし、該酵素に関する遺伝子の構造を解明し、該酵素の工業的生産に寄与することである。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、ストレプトマイセス オリバセオピリディスから抽出したキシラナーゼの N 末端塩基配列を決定した。この N 末端塩基配列をもとにして作製したプライマーを用い、該微生物から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行った。得られた PCR 産物 ( 配列表の配列番号 6 参照 ) をプローブとして、インバース PCR ( Nucleic Acid Research 1 6 号 , 8 1 8 6 頁 , 1 9 8 8 年 ) を実施してキシラナーゼ前駆体の遺伝子の DNA 配列を決定した ( 配列表の配列番号 1 参照 ) 。

【 0 0 0 6 】さらに、このキシラナーゼ前駆体の遺伝子の DNA 配列とキシラナーゼの N 末端アミノ酸配列をもとに、キシラナーゼ遺伝子を構成し、その DNA 配列を決定した ( 配列表の配列番号 2 参照 ) 。また、このキシラナーゼ遺伝子をプラスミドへのクローニングを実施し、該プラスミドを大腸菌に形質転換した。このようにして、本発明を完成したのである。

【 0 0 0 7 】請求項 1 記載の本発明は、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列を有するストレプトマイセス オリバセオピリディス由来のキシラナーゼ前駆体の遺伝子である。請求項 2 記載の本発明は、請求項 1 記載のキシラナーゼ前駆体の遺伝子を含むプラスミドである。請求項 3 記載の本発明は、請求項 2 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 ( F E R M P - 1 6 7 1 3 ) である。請求項 4 記載の本発明は、配列表の配列番号 2 記載の塩基配列を有するストレプトマイセス オリバセオピリディス由来のキシラナーゼの遺伝子である。請求項 5 記載の本発明は、請求項 4 記載のキシラナーゼの遺伝子を含むプラスミドである。請求項 6 記載の本発明は、請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌である。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳しく説明する。前記したように、本発明のキシラナーゼ遺伝子は、ストレプトマイセス属微生物に属し、キシラナーゼ生産能を有する微生物に由来するものである。この微生物としては各種のものがあるが、特にストレプトマイセスオリバセオピリディス (*Streptomyces olivaceoviridi*

s) が好適であり、中でも、得られるキシラナーゼの酵素活性を考慮すると、ストレプトマイセス オリバセオピリディス E - 8 6 株を用いることが好ましい。

【 0 0 0 9 】本発明のキシラナーゼ遺伝子は、上記ストレプトマイセス属微生物から、以下のようにして入手することができる。まず、上記ストレプトマイセス属微生物菌株を該微生物が十分に生育し、目的とする酵素を生成するような条件にて培養し、得られる培養物から菌体を除去してキシラナーゼを抽出する。キシラナーゼは、さらに遠心分離、クロマトグラフィー等の手段により精製しておくのが、以下の処理をスムーズに行う点から望ましい。この精製キシラナーゼについて、N 末端のアミノ酸配列を解読した結果、配列表の配列番号 3 に示す通りのものであった。

【 0 0 1 0 】このキシラナーゼの N 末端のアミノ酸配列 ( 配列表の配列番号 3 参照 ) から塩基配列を解読し、該配列を基にしてプライマー ( 配列表の配列番号 4 ) を作成する。また、この配列のホモロジー検索の結果から、データベースを活用してアミノ酸配列のアラインメントを作成し、保存されているアミノ酸配列領域の情報を参考にしてプライマー ( 配列表の配列番号 5 ) を作製する。これら 1 組のプライマーを用い、キシラナーゼ生産菌株から抽出したゲノム DNA を鋳型として、常法に従いポリメラーゼ連鎖反応法 ( PCR 法 ) を行う。その結果、5 0 0 b p の明瞭なバンドを得ることができる。

【 0 0 1 1 】本発明者らは、この 5 0 0 b p のバンド ( PCR 産物 ) をクローニングし、その DNA 塩基配列を解読した結果、配列表の配列番号 6 に示す配列を有することを見出した。さらに、該 DNA 塩基配列 ( 配列表の配列番号 6 ) 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のアミノ酸配列 ( 配列表の配列番号 3 参照 ) に相当する配列の存在が認められた。このことから、この 5 0 0 b p の DNA 配列 ( 配列表の配列番号 6 ) は、キシラナーゼ遺伝子の一部であることが確認された。

【 0 0 1 2 】続いて、この DNA 塩基配列 ( 配列表の配列番号 6 ) をプローブとして、インバース PCR ( Nucleic Acid Research 1 6 号 , 8 1 8 6 頁 , 1 9 8 8 年 ) を行う。まず、DNA 塩基配列 ( 配列表の配列番号 6 ) の N 末端側の情報を基にして、1 組のプライマー ( 配列表の配列番号 7 及び 8 ) を化学合成する。同様に C 末端側の情報を基にして、もう一組のプライマー ( 配列表の配列番号 9 及び 1 0 ) を化学合成する。

【 0 0 1 3 】一方、ストレプトマイセス属微生物から抽出したゲノム DNA に制限酵素を作用させ、得られる分解物をセルフライゲーションし、環状構造とする。この環状 DNA を鋳型とし、まず、先に化学合成した N 末端由来のプライマー ( 配列表の配列番号 7 及び 8 ) を用いて PCR 法により DNA 断片を増幅する。同様に、環状構造の DNA を鋳型とし、プライマーとして C 末端由来

のプライマー（配列表の配列番号 9 及び 10）を用い、PCR法により DNA 断片を増幅する。上記 2 回の PCR 反応から得られる 2 つの DNA 断片をつなぎ合わせるにより、請求項 1 記載の本発明のキシラナーゼ前駆体の遺伝子を得ることができる（配列表の配列番号 1 参照）。

【0014】本発明者らは、このキシラナーゼ前駆体の遺伝子の DNA 配列から翻訳したアミノ酸配列（配列表の配列番号 1）を、最初に判明したキシラナーゼの N 末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号 3 参照）と比較したところ、前駆体遺伝子のアミノ酸配列（配列表の配列番号 1）の 31 ~ 70 番目が、キシラナーゼの N 末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号 3 参照）と一致することを見出した。このことから、キシラナーゼ前駆体遺伝子の塩基配列中の 91 番目以降がキシラナーゼ遺伝子であることを確認した。

【0015】次に、キシラナーゼの遺伝子を、キシラナーゼの N 末端アミノ酸配列（配列表の配列番号 3 参照）を基にして、キシラナーゼ前駆体遺伝子（配列表の配列番号 1 参照）から構築した。その結果、請求項 4 記載の本発明のキシラナーゼ遺伝子を得ることができる（配列表の配列番号 2 参照）。本発明のキシラナーゼ遺伝子のアミノ酸配列のホモロジー検索の結果、ストレプトマイセス リビダンス由来のものにホモロジーの高いものが存在するが、これを本発明に係る酵素と酵素活性を比較すると、後述するように、著しく劣っており、産業上の利用性が低いものである。その他には、60% 以上のアミノ酸配列のホモロジーを有する放線菌由来の酵素の特性は明らかでない。

【0016】本発明のキシラナーゼ遺伝子を含むプラスミドは、上記のキシラナーゼ遺伝子を常法によりプラスミドに導入することによって得ることができるが、その 1 例を以下に示す。

【0017】プラスミド pQE60 を予め制限酵素分解する。この制限酵素切断プラスミドと DNA の塩基配列が合致するよう、本発明のキシラナーゼ遺伝子の塩基配列を基に、1 組のプライマー P（配列表の配列番号 11 及び 12）を化学合成する。ストレプトマイセス属微生物のゲノム DNA を鋳型とし、上記両プライマーを用いて、PCR法によりキシラナーゼ遺伝子の全長をコードする DNA を増幅する。得られた増幅産物に制限酵素を作用させて制限酵素切断 DNA 断片とし、これに、先の制限酵素切断プラスミド pQE60 を接合することにより、プラスミド pQE60 / XynG を調製する。

【0018】このプラスミドを用いて、常法により大腸菌に形質転換することにより形質転換体を得ることができる。このようにして形質転換された大腸菌（請求項 3 記載のもの）は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その受託番号は、FERM P - 16713 である。

【0019】キシラナーゼ遺伝子の発現は、上述の形質転換体である大腸菌を培養し、該大腸菌及び培養上清中の酵素を測定して確認することができる。また、この形質転換体を栄養培地で培養し、得られた菌体を破砕したのち、固液分離して得られる上清を常法によって精製することにより、キシラナーゼを得ることができる。

【0020】なお、既に述べたとおり、本発明においてはキシラナーゼ生産菌であるストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 86 株由来のキシラナーゼを用いることが望ましい。その理由は、該微生物由来のキシラナーゼは高い酵素活性を有しているからである。すなわち、この酵素はオートスペルト麦由来のキシラン（不溶性）あるいは樺由来のキシラン（可溶性）に対し、それぞれ 149 単位 / mg 酵素、104 単位 / mg 酵素と高い活性を示す。

【0021】一方、同じストレプトマイセス属の微生物であるストレプトマイセス リビダンス由来のキシラナーゼ C（本発明酵素とアミノ酸配列のホモロジーが 82%）の活性は、上記の不溶性あるいは可溶性キシランに対し、それぞれ 45 単位 / mg 酵素、32 単位 / mg 酵素である。また、ストレプトマイセス リビダンス由来のキシラナーゼ B（本発明酵素とアミノ酸配列のホモロジーが 79%）の活性は、上記いずれのキシランに対しても 5 単位 / mg 酵素にすぎない。これらの数値を比較すれば、ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 86 株の生産するキシラナーゼが、いかに高い活性を示し、産業上利用する上で優れた特性を有しているかが明らかである。

【0022】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例 1

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 86 株を、キシラン 2%、ペプトン 1.4%、酵母エキス 0.1%、コーンステイープリカー 0.5%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05% を含む培地で培養したのち、菌体を除去し得られた培養上清から、イオン交換クロマトグラフィーを活用して高度に精製したキシラナーゼを得た。この精製酵素を用いて、プロテインシーケンサー G1005A 型（ヒューレットパッカード社製）により、その N 末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号 3 参照）を決定した。

【0023】N 末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号 3 参照）の中から、コドンの縮重の少ない領域を 1 箇所選びだし、フォワードプライマー（配列表の配列番号 4）を化学合成した。一方、N 末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号 3 参照）のホモロジー検索を行い、その結果に基づいてデータベースを活用して作成したアミノ酸配列のアラインメントの中から、保存されているアミノ酸配列領域を見出し、該領域の情報を基に、リバース

プライマー（配列表の配列番号 5）を作成した。

【0024】ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株から、斎藤の方法（蛋白質核酸酵素，11 巻，446 頁）によりゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を鋳型とし、上記二つのプライマー（配列表の配列番号 4 及び 5）を用いて PCR 反応により増幅させた。その結果、500 bp の明瞭なバンドが得られた。

【0025】得られたバンドをクローニングし、d ロードミン・ターミネーター・サイクルシーケンシング・キット（パーキンエルマー社製）を用いて DNA 塩基配列を解読した。解読した塩基配列の情報をつなぎ合わせると、DNA 塩基配列（配列表の配列番号 6）が得られた。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 N 末端アミノ酸配列（配列表の配列番号 3）に相当する配列が認められることから、該配列はキシラナーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【0026】そこで、この PCR 産物、すなわち 500 bp の DNA 塩基配列（配列表の配列番号 6）を、ディゴキシゲニン化学発光核酸検出システム（ベーリンガー・マンハイム社製）で標識し、全長のキシラナーゼ遺伝子クローニングのためのプローブとして用いることとした。この 500 bp の DNA 塩基配列（配列表の配列番号 6）の N 末端側の情報をもとに、フォワードプライマー N（配列表の配列番号 7）とリバースプライマー N（配列表の配列番号 8）を作製した。同様に、C 末端側の情報をもとに、フォワードプライマー C（配列表の配列番号 9）とリバースプライマー C（配列表の配列番号 10）を化学合成した。

【0027】一方、先の PCR で鋳型として用いたストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株のゲノム DNA を、制限酵素 A p a I で完全分解した。得られた制限酵素分解物をアガロース電気泳動で分離後、先に標識したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション（「クローニングとシーケンス」渡辺監修，農村文化社，1989 年，157 頁）を実施した。その結果、1.5 kb p と 3.0 kb p の 2 つの DNA 断片に強くハイブリダイズした。このことは、目的とするキシラナーゼ遺伝子が、1.5 kb p と 3.0 kb p の 2 つの DNA 断片に分断されていることを示唆するものである。

【0028】次に、インバース PCR（Nucleic Acid Research, 16 号，8186 頁，1988 年）を実施するために、上述のストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株のゲノム DNA の制限酵素 A p a I 分解物を、DNA ライゲーションキット（宝酒造株式会社製）を用いて、セルフライゲーションし、環状構造とした。次に、この環状 DNA を鋳型とし、先述のフォワードプライマー N（配列表の配列番号 7）及びリバースプライマー N（配列表の配列番号 8）を用いて、PCR により DNA 断片を増幅し、得られた DNA 塩基配列を解読

した。

【0029】また、同様に、環状構造とした DNA を鋳型とし、先に化学合成したフォワードプライマー C（配列表の配列番号 9）及びリバースプライマー C（配列表の配列番号 10）を用い、PCR により DNA 断片を増幅し、得られた DNA 塩基配列を解読した。

【0030】ここで得られた 2 つの DNA 断片の塩基配列をつなぎ合わせるにより、最終的にキシラナーゼ前駆体の遺伝子の DNA 配列を決定した（配列表の配列番号 1 参照）。

【0031】このキシラナーゼ前駆体の遺伝子の DNA 配列（配列表の配列番号 1）から翻訳したアミノ酸配列（配列表の配列番号 1）を、既に判明しているキシラナーゼの N 末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号 3）と比較した。その結果、キシラナーゼの N 末端のアミノ酸配列は、前駆体遺伝子のアミノ酸配列中の 31 ~ 70 番目の配列と一致したことから、前駆体遺伝子の塩基配列中の 91 番目以降にキシラナーゼ遺伝子の存在を見出した。

【0032】そこで、活性型キシラナーゼの遺伝子を、キシラナーゼの N 末端アミノ酸配列を基に、キシラナーゼ前駆体遺伝子から構成した（配列表の配列番号 2 参照）。また、活性型キシラナーゼの分子量を、島津製作所製、レーザーイオン化 TOF - MS KOMPACT MALDI III 型で測定したところ、21,000 ダルトンであり、本遺伝子でコードされる蛋白の分子量 20,851 と良く一致していた。

【0033】次に、キシラナーゼ遺伝子のプラスミドへのクローニングを実施した。まず、プラスミド pQE60 を制限酵素 N c o I と B a m H I で分解した。その後、この制限酵素切断プラスミドと DNA の塩基配列が合致するように、キシラナーゼをコードする全長の DNA 配列を基にして、フォワードプライマー P（配列表の配列番号 11）とリバースプライマー P（配列表の配列番号 12）を化学合成した。次いで、ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株のゲノム DNA を鋳型とし、両プライマーを用いて、PCR 法により、キシラナーゼ遺伝子の全長をコードする DNA を増幅した。増幅された DNA 断片を、さらに制限酵素 N c o I と B a m H I で分解した。この制限酵素切断 DNA 断片を、DNA ライゲーションキット（宝酒造株式会社製）を用いて、先の制限酵素切断プラスミドと接合し、プラスミド pQE60 / X y n G を調製した。

【0034】さらに、このプラスミド pQE60 / X y n G を用いて Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 第 2 版 1.74 章, Vol. 1 (1989) に記載された方法に従い、大腸菌に形質転換した。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 P - 16713 であ

る。なお、プラスミド p Q E 6 0 / X y n G にはキシラナーゼ遺伝子が含まれている。請求項 6 記載の形質転換体も同様の方法で得ることができる。

【 0 0 3 5 】

【発明の効果】本発明によれば、キシランに作用して分解する酵素であるキシラナーゼの遺伝子が提供される。この遺伝子を発現させて得られるキシラナーゼは、キシランからのキシロオリゴ糖の生産、パルプの漂白用酵素等として、食品産業をはじめとして様々な分野において有用である。

【 0 0 3 6 】

【配列表】

配列番号： 1

配列の長さ： 1 1 9 5

配列

GGAATCGAAA	GTTTCGTATT	GCCTGACGAG	CGTTGCGTCA	CGCTAAGCAG	GCGCCAATTC	60
CGCGTCAACC	ATCGTGTGCGA	CAGTCTTTTC	GGCCACCCCT	TCCAGCAGCT	TCGAAAAGTYG	120
CGGCTCTACA	CGCCGGAGTT	CACCGTCAAG	TTTCGATGAA	GTTTCGGAAA	CAGACGCATT	180
GACCGCCCTT	TCGAACCCGC	CCCATACTCT	CCAGCAATCG	AGCCCTCCCT	CCCACGGGAA	240
CGGCCCGGCC	ATGGCGTATG	GCGCGAACAT	GACAACCCAC	CTCATCCAGG	AGGCACG	297
ATG GAC ATG GAG CAC GCC CTC ACC CGC CCG ATG AGC CGC AGG GGC TTC						345
Met Asp Met Glu His Ala Leu Thr Arg Pro Met Ser Arg Arg Gly Phe						
1	5	10	15			
ATC AAC CGT GCC GGC GCG CTC GCG CTG GCC ACC ACC GCG TCC GGG CTG						393
Ile Asn Arg Ala Gly Ala Leu Ala Leu Ala Thr Thr Ala Ser Gly Leu						
20	25	30				
CTG CTG CCC GAC ACC GCT CAG GCC GCC ACG GTC ATC ACC ACC AAC CAG						441
Leu Leu Pro Asp Thr Ala Gln Ala Ala Thr Val Ile Thr Thr Asn Gln						
35	40	45				
ACC GGC ACC AAC AAC GGG TTC TAC TAC TCC TTC TGG ACC GAC GGC GGC						489
Thr Gly Thr Asn Asn Gly Phe Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly						
50	55	60				
GGT TCG GTC TCG ATG ACC CTG AAC TCC GGC GGC AAC TAC AGC ACC TCG						537
Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser						
65	70	75	80			
TGG ACG AAC TGC GGG AAC TTC GTC GCC GGC AAG GGC TGG AGC AAC GGC						585
Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp Ser Asn Gly						
85	90	95				
GGA CGC AGG AAC GTG CAG TAC TCG GGC AGC TTC TAC CCG TCC GGC AAC						633
Gly Arg Arg Asn Val Gln Tyr Ser Gly Ser Phe Tyr Pro Ser Gly Asn						
100	105	110				
GGC TAC CTG GCG CTG TAC GGG TGG ACC TCG AAC CCG CTC GTC GAG TAC						681
Gly Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp Thr Ser Asn Pro Leu Val Glu Tyr						
115	120	125				
TAC ATC GTC GAC AAC TGG GGC AAC TAC CGG CCC ACC GGA ACG TAC AAG						729
Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Asn Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys						
130	135	140				
GGC ACG GTC ACC AGC GAC GGC GGC ACG TAC GAC GTC TAC CAG ACG ACG						777
Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Val Tyr Gln Thr Thr						
145	150	155	160			

配列の型：核酸

鎖の数： 2 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： G e n o m i c D N A

起源：

生物名：ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( Streptomyces olivaceoviridis )

株名： E - 8 6 株

直接の起源

10 プラスミド名： p Q E 6 0 / X y n G

配列の特徴

特徴を示す記号： C D S

存在位置： 2 9 8 . . 9 9 3

特徴を決定した方法： P

11	12	
CGG TAC AAC GCC CCC TCC GTG GAA GGC ACC AAG ACC TTC AAC CAG TAC	825	
Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Gly Thr Lys Thr Phe Asn Gln Tyr		
165	170	175
TGG AGC GTC CGG CAG TCC AAG CGG ACC GGC GGC ACC ATC ACC ACC GGC	873	
Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Gly Gly Thr Ile Thr Thr Gly		
180	185	190
AAC CAC TTC GAC GCC TGG GCC CGC TAC GGC ATG CAA CTG GGC AGC TTC	921	
Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Tyr Gly Met Gln Leu Gly Ser Phe		
195	200	205
AGC TAC TAC ATG ATC ATG GCC ACC GAG GGC TAC CAG AGC AGC GGC TCC	969	
Ser Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser		
210	215	220
TCC AAC CTC ACG GTG AGC GGC TGACCCTCCC CGTCCCCTCC CATCCCCCAC	1020	
Ser Asn Leu Thr Val Ser Gly		
225	230	
GGAGGTACAG CCGCCACCC GAGGAGGACG CACCCGCATG CGTGCCGCAC CCCGCTCCCT	1080	
GCTGACCGGA CTGGCCCTCG CGGCGACCGC CGTGCCCGGC ACGGTCACCG CCGTCACCGA	1140	
CGCCGCCCCG GCGCACGCCG CCGCCTGCTC CGGGTACGTC GGGCTCACCT TCGAC	1195	

## 【 0 0 3 7 】 配列番号 : 2

配列の長さ : 1 1 9 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St

配列

GGAATCGAAA GTTTCGTATT GCCTGACGAG CGTTGCGTCA CGCTAAGCAG GCGCCAATTC	60		
CGCGTCAACC ATCGTGTCGA CAGTCTTTTC GGCCACCCCT TCCAGCAGCT TCGAAAGTTG	120		
CGGCTCTACA CGCCGGAGTT CACCGTCAAG TTTTCGATGAA GTTTCGGAAA CAGACGCATT	180		
GACCGCCCTT TCGAACCCGC CCCATACTCT CCAGCAATCG AGCCCTCCCT CCCACGGGAA	240		
CGGCCCGGCC ATGGCGTATG GCGCGAACAT GACAACCCAC CTCATCCAGG AGGCACGATG	300		
GACATGGAGC ACGCCCTCAC CCGCCCGATG AGCCGCAGGG GCTTCATCAA CCGTGCCGGC	360		
GCGCTCGCGC TGGCCACCAC CGCGTCCGGG CTGCTGCTGC CCGACACCGC TCAGGCC	417		
GCC ACG GTC ATC ACC ACC AAC CAG ACC GGC ACC AAC AAC GGG TTC TAC	465		
Ala Thr Val Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Phe Tyr			
1	5	10	15
TAC TCC TTC TGG ACC GAC GGC GGC GGT TCG GTC TCG ATG ACC CTG AAC	513		
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn			
20	25	30	
TCC GGC GGC AAC TAC AGC ACC TCG TGG ACG AAC TGC GGG AAC TTC GTC	561		
Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val			
35	40	45	
GCC GGC AAG GGC TGG AGC AAC GGC GGA CGC AGG AAC GTG CAG TAC TCG	609		
Ala Gly Lys Gly Trp Ser Asn Gly Gly Arg Arg Asn Val Gln Tyr Ser			
50	55	60	
GGC AGC TTC TAC CCG TCC GGC AAC GGC TAC CTG GCG CTG TAC GGG TGG	657		
Gly Ser Phe Tyr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp			
65	70	75	80
ACC TCG AAC CCG CTC GTC GAG TAC TAC ATC GTC GAC AAC TGG GGC AAC	705		

reptomycetes olivaceoviridis )

20 株名 : E - 8 6 株

直接の起源

プラスミド名 : p Q E 6 0 / X y n G

配列の特徴

特徴を示す記号 : m a t p e p t i d e

存在位置 : 4 1 8 . . 9 9 3

特徴を決定した方法 : P

13 14

Thr Ser Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Asn  
85 90 95

TAC CGG CCC ACC GGA ACG TAC AAG GGC ACG GTC ACC AGC GAC GGC GGC 753  
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly  
100 105 110

ACG TAC GAC GTC TAC CAG ACG ACG CGG TAC AAC GCC CCC TCC GTG GAA 801  
Thr Tyr Asp Val Tyr Gln Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu  
115 120 125

GGC ACC AAG ACC TTC AAC CAG TAC TGG AGC GTC CGG CAG TCC AAG CGG 849  
Gly Thr Lys Thr Phe Asn Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg  
130 135 140

ACC GGC GGC ACC ATC ACC ACC GGC AAC CAC TTC GAC GCC TGG GCC CGC 897  
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg  
145 150 155 160

TAC GGC ATG CAA CTG GGC AGC TTC AGC TAC TAC ATG ATC ATG GCC ACC 945  
Tyr Gly Met Gln Leu Gly Ser Phe Ser Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr  
165 170 175

GAG GGC TAC CAG AGC AGC GGC TCC TCC AAC CTC ACG GTG AGC GGC TGAC 994  
Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Leu Thr Val Ser Gly  
180 185 190

CCTCCCGTC CCGTCCCATC CCCCACGGAG GTCACGCCGC CCACCCGAGG AGGACGCACC 1054  
CGCATGCGTG CCGCACCCCG CTCCCTGCTG ACCGGACTGG CCCTCGCGGC GACCGCGGTG 1114  
GCCGGCACGG TCACCGCCGT CACCGACGCC GCCCGGGCGC ACGCGCCGC CTGCTCCGGG 1174  
TACGTCGGGC TCACCTTCGA C 1195

## 【 0 0 3 8 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 4 0

配列の型 : アミノ酸

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

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
30 が生産した酵素

## 配列

Ala Thr Val Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Phe Tyr  
1 5 10 15  
Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn  
20 25 30  
Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser  
35 40

## 【 0 0 3 9 】 配列番号 : 4

配列の長さ : 2 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株 50

が生産した酵素

40 配列

GGSACSAACA ACGGTTCTA CTAC 2 4

## 【 0 0 4 0 】 配列番号 : 5

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

15

16

株名：E - 8 6 株  
 直接の起源  
 ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
 が生産した酵素  
 配列  
 WCTGGTASCC CTCSTGSGCC AT 22  
 【 0 0 4 1 】配列番号：6  
 配列の長さ：5 1 4  
 配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸  
 起源：  
 生物名：ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( Streptomyces olivaceoviridis )  
 株名：E - 8 6 株  
 直接の起源  
 P C R 反応物

## 配列

GGC ACC AAC AAC GGG TTC TAC TAC TCC TTC TGG ACC GAC GGC GGC GGT	48
Gly Thr Asn Asn Gly Phe Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly	
1 5 10 15	
TCG GTC TCG ATG ACC CTG AAC TCC GGC GGC AAC TAC AGC ACC TCG TGG	96
Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp	
20 25 30	
ACG AAC TGC GGG AAC TTC GTC GCC GGC AAG GGC TGG AGC AAC GGC GGA	144
Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp Ser Asn Gly Gly	
35 40 45	
CGC AGG AAC GTG CAG TAC TCG GGC AGC TTC TAC CCG TCC GGC AAC GGC	192
Arg Arg Asn Val Gln Tyr Ser Gly Ser Phe Tyr Pro Ser Gly Asn Gly	
50 55 60	
TAC CTG GCG CTG TAC GGG TGG ACC TCG AAC CCG CTC GTC GAG TAC TAC	240
Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp Thr Ser Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr	
65 70 75 80	
ATC GTC GAC AAC TGG GGC AAC TAC CGG CCC ACC GGA ACG TAC AAG GGC	288
Ile Val Asp Asn Trp Gly Asn Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly	
85 90 95	
ACG GTC ACC AGC GAC GGC GGC ACG TAC GAC GTC TAC CAG ACG ACG CGG	336
Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Val Tyr Gln Thr Thr Arg	
100 105 110	
TAC AAC GCC CCC TCC GTG GAA GGC ACC AAG ACC TTC AAC CAG TAC TGG	384
Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Gly Thr Lys Thr Phe Asn Gln Tyr Trp	
115 120 125	
AGC GTC CGG CAG TCC AAG CGG ACC GGC GGC ACC ATC ACC ACC GGC AAC	432
Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Gly Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn	
130 135 140	
CAC TTC GAC GCC TGG GCC CGC TAC GGC ATG CAA CTG GGC AGC TTC AGC	480
His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Tyr Gly Met Gln Leu Gly Ser Phe Ser	
145 150 155 160	
TAC TAC ATG ATC ATG GCC ACC GAG GGC TAC CAG T	514
Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln	
165 170	

【 0 0 4 2 】配列番号：7  
 配列の長さ：2 7  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：1 本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )  
 起源：

生物名：ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( Streptomyces olivaceoviridis )  
 株名：E - 8 6 株  
 直接の起源  
 ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
 が生産した酵素  
 50 配列



17

TAGTTGCCGC CGGAGTTCAG GGTCATC 27

【 0 0 4 3 】配列番号 : 8

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
が生産した酵素

配列

CATCGTCGAC AACTGGGGCA ACTACCG 27

【 0 0 4 4 】配列番号 : 9

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
が生産した酵素

配列

TGAAGCTGCC CAGTTGCATG CCGTAGC 27

【 0 0 4 5 】配列番号 : 1 0

配列の長さ : 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St

18

reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
が生産した酵素

配列

TGATCATGGC CACCGAGGGC TACCAGA 27

【 0 0 4 6 】

配列番号 : 1 1

10 配列の長さ : 3 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

20 ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
が生産した酵素

配列

CCATGGACAT GGAGCACGCC CTCACCCGCC CG 32

【 0 0 4 7 】配列番号 : 1 2

配列の長さ : 3 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 ( アミノ酸配列から作成 )

30 起源 :

生物名 : ストレプトマイセス オリバセオビリデス ( St reptomyces olivaceoviridis )

株名 : E - 8 6 株

直接の起源

ストレプトマイセス オリバセオビリデス E - 8 6 株  
が生産した酵素

配列

GGATCCGCC CTCACCGTGA GGTTGGAGGA GC 32

フロントページの続き

(56)参考文献 Biosic. Biotech. Biochem., Vol. 58, No. 6, p. 1041 - 1044 ( 1994 )

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq  
MEDLINE (STN)  
JICSTファイル (JOIS)