

(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 - 266873**

(43)公開日 平成11年(1999)10月5日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00
1/21		1/21
9/26		9/26
//(C12N 15/09	ZNA	
C12R 1:465 )		

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平10 - 90702	(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10年(1998)3月20日	(71)出願人	000195568 生物系特定産業技術研究推進機構 埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2
		(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
		(72)発明者	林 清 茨城県土浦市乙戸南1丁目5 - 3
		(74)代理人	弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(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

(57)【要約】

【課題】 高いキシラナーゼ生産能を有するストレプトマイセス属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。

【解決手段】 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、該遺伝子を含むプラスミド及び該プラスミドで形質転換された大腸菌並びに配列表の配列番号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、該遺伝子を含むプラスミド及び該プラスミドで形質転換された大腸菌。

## 【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 (FERMP-16713)。

【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。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【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。

## 【0002】

【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。

【0003】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。

## 【0004】

【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。

## 【0005】

【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 オリバセオビ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 16 号, 8 1

86 頁, 1988 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)。

【0006】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。

【0007】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 オリバセオビ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 (FERMP-16713) 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 オリバセオビ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。

## 【0008】

【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ビリディス (*Streptomyces olivaceoviridis*) 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 オリバセオビリディス E-86 株を用いることが好ましい。

【0009】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。

【0010】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、500 bp の明瞭なバンドを得ることができる。

【0011】本発明者らは、この 500 bp 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 500 bp 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。

【0012】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 16 号, 8186 頁, 1988 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 10）を化学合成する。

【0013】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。

10 【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。

20 【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。

30 【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。

40 【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 オリバセオピリデス 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。

50 【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-86株から、斉藤の方法（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、500bp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500bp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500bp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。

10 【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-86株のゲノムDNAを、制限酵素ApaI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、1.5kbpと3.0kbp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、1.5kbpと3.0kbp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。

20 【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-86株のゲノムDNAの制限酵素ApaI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。

30 【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。

40 【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。

50 【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NcoIとBamHI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-86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NcoIとBamHI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/Xyngを調製した。

【0034】さらに、このプラスミドpQE60/Xyng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pQE60/Xyng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。

【0035】

【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。

【0036】

【配列表】

配列番号：1  
 配列の長さ：1195  
 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(*Streptomyces olivaceoviridis*)  
 株名：E-86株  
 直接の起源  
 プラスミド名：pQE60/Xyng  
 配列の特徴  
 特徴を示す記号：CDS  
 存在位置：298...993  
 特徴を決定した方法：P

配列

GGAATCGAAA	GTTTCGTATT	GCCTGACGAG	CGTTGCGTCA	CGCTAAGCAG	GCGCCAATTC	60
CGCGTCAACC	ATCGTGTCGA	CAGTCTTTTC	GGCCACCCCT	TCCAGCAGCT	TCGAAAGTYG	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						

9 10

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

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 TGACCTCCC CGTCCCGTCC CATCCCCAC 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 GCGCAGCCG 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 オリバセオピリデス (St

reptomycetes olivaceoviridis )

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

40 存在位置 : 4 1 8 . . 9 9 3

特徴を決定した方法 : P

配列

GGAATCGAAA GTTTCGTATT GCCTGACGAG CGTTGCGTCA CGCTAAGCAG GCGCCAATTC 60  
 CGCGTCAACC ATCGTGTGCA CAGTCTTTTC GGCCACCCCT TCCAGCAGCT TCGAAAAGTTG 120  
 CGGCTCTACA CGCCGGAGTT CACCGTCAAG TTTCGATGAA GTTTCGGAAA CAGACGCATT 180  
 GACCGCCCTT TCGAACCCGC CCCATACTCT CCAGCAATCG AGCCCTCCCT CCCACGGGAA 240  
 CGGCCCCGCC ATGGCGTATG GCGCGAACAT GACAACCCAC CTCATCCAGG AGGCACGATG 300  
 GACATGGAGC ACGCCCTCAC CCGCCCGATG AGCCGCAGGG GCTTCATCAA CCGTGCCGGC 360  
 GCGCTCGCGC TGGCCACCAC CGCGTCCGGG CTGCTGCTGC CCGACCCGC TCAGGCC 417  
 GCC ACG GTC ATC ACC ACC AAC CAG ACC GGC ACC AAC AAC GGG TTC TAC 465

11 12

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  
 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 GACCGCCGTG 1114  
 GCCGGCACGG TCACCGCCGT CACCGACGCC GCCCCGGCGC ACGCCGCCGC CTGCTCCGGG 1174  
 TACGTGGGGC 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：

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

40 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

13

14

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（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  
 配列

GGSACSAACA ACGGSTTCTA 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）

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

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  
 配列

WCTGGTASCC CTCSGTSGCC 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：  
 20 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



15  
 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  
 配列

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（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  
 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（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  
 10 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（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  
 配列

TGATCATGGC CACCGAGGGC TACCAGA 27  
 【 0 0 4 6 】  
 配列番号： 1 1  
 配列の長さ： 3 2  
 30 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  
 40 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）  
 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）

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

reptomycetes 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

GGATCCGCCG CTCACCGTGA GGTGGAGGA GC 32

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

( C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)