

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 特 許 公 報 ( B 1 )

(11) 特許番号

特許第3012928号  
(P3012928)

(45) 発行日 平成12年2月28日 (2000. 2. 28)

(24) 登録日 平成11年12月17日 (1999. 12. 17)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
// C 1 2 N 9/50		9/50
(C 1 2 N 15/09	Z N A	
C 1 2 R 1:91)		

請求項の数 2 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-327537

(22) 出願日 平成10年11月4日 (1998. 11. 4)

審査請求日 平成10年11月4日 (1998. 11. 4)

(73) 特許権者 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

(72) 発明者 荒平 正緒美

茨城県つくば市並木4-10-1 903棟  
302号

(72) 発明者 深澤 親房

茨城県つくば市小野川9-35

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

審査官 内田 俊生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物由来アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ c DNA および遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の ( a ) 又は ( b ) の植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードする c DNA。

( a ) 配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなる植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ

( b ) 配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列に対し 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列からなり、かつ植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ活性を有するタンパク質

【請求項2】 以下の ( a ) 又は ( b ) の植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードする遺伝子。

( a ) 配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなる

植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ ( b ) 配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列に対し 1 もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列からなり、かつ植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ活性を有するタンパク質

【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、植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ c DNA および遺伝子に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】 アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼとは、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のうち、アスパラギン残基の C - 末端でペプチド等を切断

する酵素である。この中でも、特に植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをレグマチュレインと称されている。これまでに、レグマチュレインは種々の高等植物において酵素活性が確認されているが、非常に不安定なため、本発明者らの他には高度に精製した例がない。

【0003】植物の貯蔵タンパク質は、当初プレプロタンパク質として合成され、レグマチュレインの作用によりはじめて成熟タンパク質の形となる。この植物の貯蔵タンパク質は、安全性の点で心配がない上に、優れた蛋白資源であることから、食品工業界では大量生産が要望されている。したがって、この貯蔵タンパク質の合成に必要な純度の高いレグマチュレインの量産も強く望まれている。しかし、前述した理由から、レグマチュレインの精製は極めて困難であり、未だ要望には応えられていない状況である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】レグマチュレインのcDNAおよび遺伝子が取得され、これらを利用することができれば、本酵素の大量生産への道が開かれる可能性がある。また、部位特異的変異法を利用して本酵素の安定性の増大や酵素活性の改良等にも利用できる。したがって、本発明の目的は、レグマチュレインの遺伝的情報を得て、本酵素の量産化を可能とすることである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、レグマチュレインを高度に精製し、そのアミノ酸配列を基にして、レグマチュレインのcDNAおよび遺伝子のクローニングを試みた。その結果、そのcDNAおよび遺伝子の全構造を解明することに成功し、本発明に到達した。

【0006】すなわち、高度に精製されたレグマチュレインのアミノ酸配列の解析から、縮重のある合成オリゴヌクレオチドを作成した。次に、ダイズ登熟初期の種子よりmRNAを抽出し、それに相補的なcDNAを合成した。作成した合成オリゴヌクレオチドとcDNAとの間でPCRを行い、レグマチュレインの部分的なcDNAをクローニングした。

【0007】一方、同じダイズ登熟初期の種子のmRNAを用いて、2本鎖cDNAを合成し、ファージベクターにアダプターを介して組み込み、cDNAライブラリーを構築した。このcDNAライブラリーより、PCR法により得た部分的なレグマチュレインcDNAをラベルし、これをプローブとしてスクリーニングを行って、完全長のレグマチュレインcDNAをクローニングした。このcDNAの一次構造解析により、シグナルペプチドの配列を含むレグマチュレインの全アミノ酸配列が決定された。

【0008】cDNAの配列を基にしたオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、発芽したダイズより各DNAを抽出・精製し、これを鋳型としてPCR法を行い、レ

グマチュレイン遺伝子をクローニングした。

【0009】すなわち、請求項1記載の本発明は、以下の(a)又は(b)の植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードするcDNAである。

(a)配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなる植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ

(b)配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列に対し1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列からなり、かつ植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ活性を有するタンパク質また、請求項2記載の本発明は、以下の(a)又は(b)の植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードする遺伝子である。

(a)配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列からなる植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ

(b)配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列に対し1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列からなり、かつ植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ活性を有するタンパク質

【0010】

【発明の実施の形態】本発明について以下に詳しく説明する。請求項1記載の本発明は、以下の(a)又は(b)の植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードするcDNAである。

(a)配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなる植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ

(b)配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列に対し1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列からなり、かつ植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ活性を有するタンパク質

【0011】本発明の対象とする植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ、すなわちレグマチュレインは、上述したように、ペプチドやタンパク質のアミノ酸配列のうち、アスパラギン残基のC-末端側でペプチド等を切断する作用を有している酵素である。

【0012】本発明者らは、以下のようにして請求項1記載のcDNAの取得に成功した。

① まず、植物中に含まれるレグマチュレインを抽出、精製した。レグマチュレインは各種の植物、特に種子中に含まれる貯蔵タンパク質に含まれている。例えば、ダイズの種子からレグマチュレインを抽出する場合は、登熟初期から完熟期まで、特に登熟初期から登熟後期までのものを用いることが好ましい。

【0013】ここで、レグマチュレインのみを得るためには、材料である植物を高度に精製する必要がある。1例を示すと、登熟初期から完熟期までの植物種子を粉碎し、これを適当な緩衝液で抽出し、その可溶性画分を透析後、固液分離する。得られる粗酵素液を疎水クロマト

グラフィー、ゲルろ過等にかけることにより、ほぼ純粋なレグマチュレインまで精製することが可能である。

【0014】② 得られた精製レグマチュレインのアミノ酸配列のうち、N-末端のアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列の決定は、Edman分解により行うことができ、自動アミノ酸シーケンサーを用いると簡便に行うことができる。

【0015】③ 一方、上記②とは別に、精製レグマチュレインの部分アミノ酸配列を得た。まず、レグマチュレインを短いペプチドに酵素分解し、それぞれのペプチドサンプルを高速液体クロマトグラフィー等により分画した上で、各サンプルのアミノ酸配列、すなわちレグマチュレインの内部のアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列の決定は、上記②と同様の方法により行うことができる。各アミノ酸配列のうち、縮重のあるオリゴヌクレオチド2つを選択し、後述のPCR反応でプライマーとして用いた(配列表の配列番号3および4参照)。

【0016】④ 次に、植物の種子よりRNAを抽出し、これに相補的なcDNAを合成した。植物からのRNA抽出は、Fukazawa C. et al., Journal of Biological Chemistry, 200, 6234-6239 (1985)に従い、SDS-フェノール法を用いて行うことができる。抽出した全RNAからpoly(A)+RNAを調製し、これにオリゴ(dT)をプライマーとした逆転写酵素による逆転写反応を行って、1本鎖cDNAを得た。

【0017】⑤ この1本鎖cDNAを鋳型として、先に作成した合成オリゴヌクレオチド(配列表の配列番号3および4参照)との間でPCRを行い、レグマチュレインの部分的なcDNA(400bp)をクローニングした。得られたバンドをベクターにサブクローニングし、先に決定したレグマチュレインの内部のアミノ酸配列を含んでいるかどうか解析した。その結果、該バンドは、レグマチュレインの部分的なcDNAであることが確認された。

【0018】⑥ 次に、同じ植物種子のmRNAを用いて2本鎖cDNAを合成し、ファージベクターにアダプターを介して組み込み、cDNAライブラリーを構築した。cDNAライブラリーの作成には、岡山-Berg法、ガブラー-ホフマン(Gubler-Hoffman)法を採用できるが、簡略な点から後者の方が好ましい。以下、ガブラー-ホフマン法を採用した場合について述べる。

【0019】まず、先述のpoly(A)+RNAから2本鎖のcDNAを合成する。このcDNAに、EcoRI、NotI、BamHI等の制限酵素部位を含むアダプターをライゲーションし、制限酵素によりcDNAを切断する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により500bp以上の長さのものだけをゲルから切り出して集めると共に、アダプターを除去する。その後、得られたヌクレオチドの5'位にリン酸基を導入し、制限酵素で切断し、脱リン酸化してあるgt10ファージベク

ターアーム(宝酒造社製)にライゲーションする。これをファージにパッケージングした。こうして、cDNAライブラリーを作成した。

【0020】⑦ 上記⑤のPCR法により得た部分的なレグマチュレインcDNAをラベルし、これをプローブとして、⑥のcDNAライブラリーからスクリーニングを行った。次いで、完全長のレグマチュレインcDNAをクローニングした。スクリーニングは、先に得たレグマチュレイン部分cDNAを放射標識等したものをプローブとして、約10万プラークのcDNAライブラリーにプラークハイブリダイゼーションすることにより行うことができる。その結果、約10万プラークのうち、数個のプラークが陽性を示したので、これを分離した。

【0021】分離した陽性プラークを純化し、大腸菌に感染させファージを増やした後に、ファージ粒子を精製した。ファージDNAの精製は、CsClステップワイズ密度勾配を用いた超遠心法等により行うことができる。精製したファージDNAから制限酵素でインサートを切り出し、アガロースゲル等で精製した。これをプラスミドベクターにサブクローニングした後、DNAシーケンスを行った。

【0022】その結果、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するcDNAが得られた。このcDNAが、請求項1記載の本発明のcDNAである。該配列はレグマチュレインの全長を含んでいる。また、EMBL、GenBank等のデータベースと比較したところ、全く新規な配列であることが明らかとなった。

【0023】請求項1記載の本発明のcDNAは、全長1055bpからなり、うち14bpがpolyAであった。アミノ酸数は、開始メチオニンからの全体で241残基、シグナルペプチドは21残基であり、成熟型タンパク質のN-末端配列からクローニングされたcDNAから推定されるアミノ酸のC-末端まで220残基であった。C-末端解析から得られた結果およびイオンスプレームススペクトロメトリーで得られた分子量の結果から、レグマチュレインは、C-末端側でプロセスを受けるプレプロ型のタンパク質であることが明らかとなった。

【0024】この配列中、レグマチュレイン活性に関与する糖鎖の結合部位は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列のうち、71~78番目の部分であった。この部分の構造は、N-末端側から、塩基性アミノ酸-疎水性アミノ酸-アスパラギン(糖鎖)-疎水性アミノ酸-スレオニン/セリン-疎水性アミノ酸-酸性アミノ酸-システインとなっている。この糖鎖結合部位は、アスパラギン残基のC-末端側でアミノ酸を特異的に切断する活性を有するレグマチュレインの安定化に関与すると考えられる。この糖鎖が欠失すると、酵素活性の急速な低下がみられる。

【0025】次に、請求項2記載の本発明について説明

する。請求項2記載の本発明は、請求項1記載の本発明のcDNAの一次構造解析により得られるレグマチュレインの全遺伝子である。まず、配列表の配列番号1記載のcDNAの塩基配列をもとに、25merと26merの2つのオリゴヌクレオチドプライマー（配列表の配列番号5、6参照）を合成した。

【0026】一方、ダイズの芽生えから合成したDNAを調製した。調製は、CTAB法[Fukazawa C. et al., Journal of Biological Chemistry, 200, 6234-6239 (1985)]等により行うことができる。このDNAを鋳型にして配列表の配列番号5、6記載のプライマーを用いてPCR法を行った。

【0027】その結果、約3.1bpの単一バンドが得られた。このバンドをTAVベクター[pCR2.1](Invitrogen社製)にサブクローニング後、上記の方法でDNAシーケンスを行った。その結果、配列表の配列番号2に示す塩基配列が得られた。

【0028】請求項2記載の本発明の遺伝子の全長（配列表の配列番号2参照）は3077bpで、4つのイントロンにより5つのエクソンに分断されている。各イントロンの塩基数は、第1イントロンよりそれぞれ67、705、1113、200bpであった。一方、各エクソンの塩基数は、第1エクソンよりそれぞれ321、66、141、93、420bpであった（配列表の配列番号2参照）。前記cDNAに存在した活性に関する糖鎖結合部位は、第1エクソン上に存在していた（配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列の71～78番目参照）。

【0029】請求項2記載の本発明は、以下の(a)又は(b)の植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードする遺伝子である。

(a) 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列からなる植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ  
(b) 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列に対し1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列からなり、かつ植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ活性を有するタンパク質

【0030】このようにして得られた請求項1記載の本発明のcDNAおよび請求項2記載の本発明の遺伝子を利用することによって、アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ（レグマチュレイン）を大量に、しかも効率よく生産することが可能となる。

【0031】なお、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列に対して1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列を有するものであっても、同様の作用効果を奏するものは、本発明に含まれる。同じく、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列に対して1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換または付加がなされたアミノ酸配列を有するものであ

ても、同様の作用効果を奏するものは、本発明に含まれる。

【0032】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら制限を受けるものではない。

実施例1〔レグマチュレインのアミノ酸配列の決定およびPCR法を用いた部分cDNAのクローニング〕

(1) 鋳型の作成

開花後13日目のダイズの種子より、Fukazawa C. et al., Journal of Biological Chemistry, 200, 6234-6239 (1985)に従い、SDS-フェノール法を用いて全RNAを抽出した。抽出した全RNAからPoly A Tractキット（プロメガ社製）により、Poly(A)+RNAを調製した。

【0033】調製したPoly(A)+RNA1μgにつき、オリゴ(dT)をプライマーとし、逆転写酵素RAV-2（宝酒造社製）100Uを用いて42、60分間逆転写反応を行い、1本鎖のcDNAを得た。残存するRNAを分解するため、終濃度0.5N-NaOHで25、一晩アルカリ分解した。アルカリ分解後、終濃度0.5MのHEPES緩衝液pH7.2で中和後、セファデックスG-50（アマシャム-ファルマシア社製）を充填したゲルろ過カラム（0.8cm×27cm）を通し、分解したRNAを除去した。こうして得られる1本鎖のcDNAを以下のPCRに用いた。

【0034】(2) プライマーの作成

高度に生成したレグマチュレインのN-末端アミノ酸配列を、気相式アミノ酸シーケンサー（パーキンエルマー社製477A型）により決定した。一方、Arahira M. and Fukazawa C., Plant Molecular Biology, 25, 597-605(1994)の方法に従い、V8プロテアーゼ（宝酒造社製）およびリジルエンドペプチダーゼ（和光純薬社製）により、レグマチュレインを分解した。

【0035】分解後、それぞれのサンプルを逆相カラム（東ソー社製、Silica ODS 120T 4.6mm×150mm）を接続した高速液体クロマトグラフィー（島津社製LC-6AD）を用いて、0.1%TFA-0.1%TFA/60%アセトニトリルの直線濃度勾配をかけた溶媒系で分画した。得られたペプチドを、N-末端のアミノ酸配列決定と同様に、気相式アミノ酸シーケンサー（パーキンエルマー社製、477A型）で決定し、内部のアミノ酸配列とした。このアミノ酸配列のうち、PCRのプライマーとして適する配列を検討し、20merと32merの2つの縮重のあるプライマーを合成した（配列表の配列番号3および4参照）。

【0036】(3) PCRによるレグマチュレインの部分cDNAクローニング

上記(2)で合成したオリゴヌクレオチドプライマーを

用いて、前記(1)で合成した一本鎖cDNAを鋳型としてPCR反応を行った。PCRの条件としては、TaqポリメラーゼはTaKaRa ExTaq(宝酒造社製)を1反応当たり2.5U用いた。また、プライマーは終濃度0.4μM、dNTPmixは0.2mM、鋳型となる一本鎖cDNAは10ng使用した。遺伝子増幅装置は、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480(宝酒造社製)を用い、変性温度95、30秒、アニーリング温度56、30秒、伸長反応72、1分30秒、35サイクルの条件で行った。

【0037】その結果、約400bpの単一のバンドが得られたので、これをTAベクター[pCR2.1](Invitrogen社製)にサブクローニングした。クローン化した大腸菌から、プラスミドDNAを常法[Maniatis T. et al., "Molecular cloning" Cold Spring Harbor Labo. (1982)]に従い調製した。

【0038】調製したプラスミドについて、島津社製、DNAシーケンサーDSQ1000を用いた蛍光オートシーケンスを行った。その結果、サブクローニングしたバンドは、前記(2)で決定したレグマチュレインの内部のアミノ酸配列を含んでいることが明らかとなった。このことから、クローニングしたバンドは、レグマチュレインの部分cDNAであることが確認された。

【0039】実施例2〔登熟初期のcDNAライブラリーの作成〕

実施例1の(1)で得られたpoly(A)+RNA 2.5μgを、ガブラー-ホフマン(Gubler-Hoffman)法の原理に基づいたcDNA合成キット(アマシャム-ファルマシア社製)を用いて、<sup>32</sup>P]-dCTPを加えて合成をモニターしながら2本鎖DNAを合成した。

【0040】1nmolのEcoRI-NotI-BamHIアダプター(宝酒造社製)をニッポンジーン社製、ライゲーションパックでライゲーションした。このcDNAをFukazawa C. et al., Journal of Biological Chemistry, 200, 6234-6239(1985)の方法に従い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、500bp以上の長さのものをゲルから切り出して集めると共に、アダプターを除去した。アダプターには、5'位にリン酸がないので、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(ニッポンジーン社製)を用いてリン酸基を導入した。

【0041】その後、EcoRIで切断し、脱リン酸化してあるgt10ファージベクターアーム(宝酒造社製)に、上記と同様に、ニッポンジーン社製、ライゲーションパックでライゲーションし、*in vitro* パッケージングキット(アマシャム-ファルマシア社製)でラムダファージにパッケージングを行った。このようにして、開花後13日目のダイズ登熟種子cDNAライブラリーを作成した。

【0042】実施例3〔完全長レグマチュレインcDNAのクローニング〕

実施例1で得たレグマチュレイン部分cDNAを、PCR法を用いて<sup>32</sup>P]-dCTPで、Arahira M. and Fukazawa C., Plant Molecular Biology, 25, 597-605 (1994)の方法に従いラベルした。これをプローブとして、実施例2で作成した開花後13日目のダイズの登熟種子ライブラリーから、Arahira M. and Fukazawa C., Plant Molecular Biology, 25, 597-605 (1994)の方法に従って、ブランクハイブリダイゼーションを実施した。その結果、cDNA約10万ブランクから、数個の陽性ブランクが分離できた。

【0043】陽性ブランクを純化し、大腸菌に感染させてファージを増やした後に、ファージ粒子をCsClステップウイズ密度勾配を用いた超遠心法により精製し、ファージDNAを精製した。精製したファージDNAから、BamHIでインサートを切り出し、アガロースゲルから精製した後に、pUC19プラスミドベクターにサブクローニングした。その後、実施例1と同様の方法で、DNAシーケンスを行った。解析の結果、得られたcDNAは、レグマチュレインの全長を含んでおり、配列表の配列番号1に示す塩基配列およびアミノ酸配列を有していた。このcDNAは、EMBL、GenBank等のデータベースとの比較により、全く新規な配列であることが明らかとなった。

【0044】本cDNAの全長は、1055bp、うち14bpがpoly Aであった。アミノ酸数は、開始メチオニンからの全体で241残基、シグナルペプチドは、21残基であり、成熟型タンパク質のN-末端配列からクローニングされたcDNAから推定されるアミノ酸のC-末端まで220残基であった。C-末端解析から得られた結果およびイオンスプレームススペクトロメトリーで得られた分子量の結果から、レグマチュレインは、C-末端側でプロセスを受けるプレプロ型のタンパク質であることが明らかとなった。

【0045】また、活性に関与する糖鎖の結合部位は1カ所(配列表の配列番号1のアミノ酸配列の71~78番目)であった。結合部位の配列は、塩基性アミノ酸(アルギニン)-疎水性アミノ酸(アラニン)-アスパラギン(糖鎖)-疎水性アミノ酸(アラニン)-スレオニン/セリン-疎水性アミノ酸(フェニルアラニン)-酸性アミノ酸(アスパラギン酸)-システインであった。

【0046】実施例4〔レグマチュレイン遺伝子のクローニング〕

実施例3で得られたcDNAの塩基配列を基に、25merと26merのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した(配列表の配列番号5および6参照)。ダイズの芽生えからCTAB法[Fukazawa C. et al., Nucleic Acid Research, 8117-8117 (1987)]により核DNAを調製した。このDNA10ngを鋳型として、実施例1と同じ条件でPCR法を行った。

【0047】その結果、約3.1kbpの単一バンドが得られた。TAベクター [pCR2.1](Invitrogen社製) にサブクローニングした後、実施例3に記載した方法でDNAシーケンスを行った。解析の結果、クローニングした遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に示す通りであった。

【0048】該遺伝子の全長は3077bpで、4つのイントロンにより5つのエクソンに分断されていた。各イントロンの塩基数は、第1イントロンよりそれぞれ、67、705、1113、200bpであった。一方、各エクソンの塩基数は、第1エクソンよりそれぞれ321、66、141、93、420bpであった(配列表

の配列番号2参照)。なお、活性に関与する糖鎖結合部位は、第1エクソン上に存在していた。

【0049】

【発明の効果】本発明のcDNAおよび遺伝子を利用することにより、不安定なために精製が困難と考えられていたアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ(レグマチュレイン)の大量、かつ効率的な生産が可能となる。また、部位特異的変異法を利用してレグマチュレインの安定性の増大や酵素活性の改良等に寄与することができる。

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<;110>; Director of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

<;120>; cDNA and genomic sequence of asparagin-bond specific endoprotease

<;130>; P100997K

<;160>; 6

<;210>; 1

<;211>; 1055

<;212>; DNA

<;213>; Glycine max

<;220>;

<;221>; CDS

<;222>; (85)...(810)

<;400>; 1

ttggtgtag ctgttacgag tcagcaagag agaatatct tgttgagttg atttctgatc 60

ccaaattgag tttgagtttc agcc atg gta tct gtt tct ctg ctc tta ttc 111

Met Val Ser Val Ser Leu Leu Leu Phe

1

5

cta tct ttc ttt gcc ttc ttt gca ccc tct gaa tct cac gac aaa gtc 159

Leu Ser Phe Phe Ala Phe Phe Ala Pro Ser Glu Ser His Asp Lys Val

10 15 20 25

tcg ttg gaa ttg tac tac gaa agc tta tgc ccc tac agc gcc aac ttc 207

Ser Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Ser Leu Cys Pro Tyr Ser Ala Asn Phe

30 35 40

atc gtg aat cac ctc cca aaa atc ttc acc cca gat ctt gcc cca atc 255

Ile Val Asn His Leu Pro Lys Ile Phe Thr Pro Asp Leu Ala Pro Ile

45 50 55

gtt cac ctc aaa ctc gtt cct tgg ggc aat gcc aaa ctc cgt gcc aac 303

Val His Leu Lys Leu Val Pro Trp Gly Asn Ala Lys Leu Arg Ala Asn

60 65 70

gcc acc ttt gac tgc cag cat ggg cca tat gag tgc ttg ctg aac aca 351

Ala Thr Phe Asp Cys Gln His Gly Pro Tyr Glu Cys Leu Leu Asn Thr

75 80 85

gtt gaa gcc tgt gca att cac atc tgg cct caa ctc agc aaa cat ttt 399

Val Glu Ala Cys Ala Ile His Ile Trp Pro Gln Leu Ser Lys His Phe

90 95 100 105

cct ttc atc tac tgt gtt gag gat ctg gtg ttt cag agt aag cgt gag 447

Pro Phe Ile Tyr Cys Val Glu Asp Leu Val Phe Gln Ser Lys Arg Glu

```

          110          115          120
gaa tgg gaa tct tgt ttt gag aaa ctg gat ctt gat tcg gaa cct att 495
Glu Trp Glu Ser Cys Phe Glu Lys Leu Asp Leu Asp Ser Glu Pro Ile
          125          130          135
aat cag tgt tat aat agt gaa cat gga aaa cag ttg gag cta caa tat 543
Asn Gln Cys Tyr Asn Ser Glu His Gly Lys Gln Leu Glu Leu Gln Tyr
          140          145          150
gca gct gaa aca agt gct ctg gag cct cct cac aag tat gtt cct tgg 591
Ala Ala Glu Thr Ser Ala Leu Glu Pro Pro His Lys Tyr Val Pro Trp
          155          160          165
gta gtt gtg gat gga gaa cca ctc tat gag gat tat gag aac ttc tta 639
Val Val Val Asp Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asp Tyr Glu Asn Phe Leu
          170          175          180          185
agc tat ctt tgt aag gct tat aaa ggc act gtt aca ccc caa agt tgc 687
Ser Tyr Leu Cys Lys Ala Tyr Lys Gly Thr Val Thr Pro Gln Ser Cys
          190          195          200
acc caa gca tca tac cta aga gaa gtg aat gca aag cct aag cat tcg 735

Thr Gln Ala Ser Tyr Leu Arg Glu Val Asn Ala Lys Pro Lys His Ser
          205          210          215
gtt tgc tac aag gac agt ggg att atg cta aca tgg gaa aaa gtg agg 783
Val Cys Tyr Lys Asp Ser Gly Ile Met Leu Thr Trp Glu Lys Val Arg
          220          225          230
tca acc att gca tca tgg atg cac tag atgaatcttg gcagtgcat 830
Ser Thr Ile Ala Ser Trp Met His Stop
          235          240
ttagatgtgc caatgctgca tttagtagca gtttgttctg gttatcttgt gtgtagttgt 890
gttgcacct ccaaaagtgc aaatagaact tgtgatgcac ataaaacat atcgactct 950
cataaaaaaa ataaaacat gatgtgtatg tgtatgaggc acttaagtac aatatatata 1010
gagagagaaa aaaaaaagta agtgcaattc taataaaaaaa aaaaa 1055
<;210>; 2
<;211>; 1055
<;212>; DNA
<;213>; Glycine max
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (85)-(321), (389)-(454), (1160)-(1300), (2414)-(2506), (2707)-(289
5)
<;400>; 2
ttggtggtag ctgttacgag tcagcaagag agaaatatct tgttgagttg atttctgatc 60
ccaaattgag tttgagtttc agcc atg gta tct gtt tct ctg ctc tta ttc 111
Met Val Ser Val Ser Leu Leu Leu Phe
          1          5
cta tct ttc ttt gcc ttc ttt gca ccc tct gaa tct cac gac aaa gtc 159
Leu Ser Phe Phe Ala Phe Phe Ala Pro Ser Glu Ser His Asp Lys Val
          10          15          20          25
tcg ttg gaa ttg tac tac gaa agc tta tgc ccc tac agc gcc aac ttc 207
Ser Leu Glu Leu Tyr Tyr Glu Ser Leu Cys Pro Tyr Ser Ala Asn Phe
          30          35          40
atc gtg aat cac ctc cca aaa atc ttc acc cca gat ctt gcc cca atc 255

```





tttttacaaa actctaaagc agtgtaatat gatctacaaa ttaccttatt gtcatacatg 2160  
 attgctcttt gctacagata ctgccacacg atctaataga actgccaatt ttagcttct 2220  
 gaacattcat ctttttcaa gctaatttct caaaatcctt tttcaatctt gctgaatgtg 2280  
 aagactatct cttgatgaaa aacaaaacat atgacagatg tgctgaatac atcattgttt 2340  
 gactggaatt ttgtctcaag tagcatttac tatcttgttt tgatcattag taacatttac 2400  
 tatctttatg tag ttg gag cta caa tat gca gct gaa aca agt gct ctg 2449  
 Leu Glu Leu Gln Tyr Ala Ala Glu Thr Ser Ala Leu  
 150 155 160  
 gag cct cct cac aag tat gtt cct tgg gta gtt gtg gat gga gaa cca 2497  
 Glu Pro Pro His Lys Tyr Val Pro Trp Val Val Val Asp Gly Glu Pro  
 165 170 175  
 ctc tat gag gtca gttttgcaat tttatatcgg ctgaaccaag cccattccc 2550  
 Leu Tyr Glu  
 agtgtttggga attttacta aaaaatactt ctaattaaca aataacttat aacactgaaa 2610  
 tttgtgtttt acatatgtaa gttgtgttat attaataatgaat cgaattagaa gtgtacagga 2670  
 aattcaaaaa gaacttgcaa atttcttttg ctgcag gat tat gag aac ttc tta 2724  
 Asp Tyr Glu Asn Phe Leu  
 180 185  
 agc tat ctt tgt aag gct tat aaa ggc act gtt aca ccc caa agt tgc 2772  
 Ser Tyr Leu Cys Lys Ala Tyr Lys Gly Thr Val Thr Pro Gln Ser Cys  
 190 195 200  
 acc caa gca tca tac cta aga gaa gtg aat gca aag cct aag cat tcg 2820  
 Thr Gln Ala Ser Tyr Leu Arg Glu Val Asn Ala Lys Pro Lys His Ser  
 205 210 215  
 gtt tgc tac aag gac agt ggg att atg cta aca tgg gaa aaa gtg agg 2868  
 Val Cys Tyr Lys Asp Ser Gly Ile Met Leu Thr Trp Glu Lys Val Arg  
 220 225 230  
 tca acc att gca tca tgg atg cac tag atgaa tcttggcagt gcattttaga 2920  
 Ser Thr Ile Ala Ser Trp Met His Stop  
 235 240  
 tgtgccaatg ctgcatttag tagcagtttg ttcgtgttat cttgtgtgta gttgtgtga 2980  
 tccctccaaa agtgcaaata gaacttgtga tgcacataaa accatatcgt actctcataa 3040  
 aaaaaataaa accatgatgt gtatgtgtat gaggtac 3077  
 <;210>; 3  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Designed nucleotide based on legumaturain amino acid sequence.  
 <;400>; 3  
 gnaayttya thgtnaayca 20  
 <;210>; 4  
 <;211>; 32  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Designed nucleotide based on legumaturain amino acid sequence.  
 <;400>; 4  
 tcncrcrna cnacnaccca nggnacrtay tt 32  
 <;210>; 5

<;211>; 25  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Designed nucleotide based on legumaturain cDNA sequence.  
 <;400>; 5  
 ttggtgtag ctgttacgag tcagc 25  
 <;210>; 6  
 <;211>; 26  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Designed nucleotide based on legumaturain cDNA sequence.  
 <;400>; 6  
 gtacctcata cacatacaca tcatgg 26

**【要約】**

**【課題】** アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼの遺伝的情報を得て、本酵素の量産化を可能にすること。

**【解決手段】** 特定のアミノ酸配列を有する植物由来の

アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードするcDNAおよび配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有する植物由来のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼをコードする遺伝子。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS(DIALOG)

WPI(DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ/G

eneSeq