

(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2000 - 139472

(P 2 0 0 0 - 1 3 9 4 7 2 A)

(43)公開日 平成12年5月23日(2000.5.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*]	(参考)
C12N 15/09 9/50	ZNA	C12N 15/00 9/50	ZNA A	4B024 4B050
//(C12N 15/09 C12R 1:91)	ZNA			

審査請求 有 請求項の数 2 F D (全11頁)

(21)出願番号	特願平10 - 327537	(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11月4日(1998.11.4)	(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)
		Fターム(参考)	4B024 AA05 BA14 CA04 HA19 4B050 CC03 DD13 LL02

(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 D N A および遺伝子

(57)【要約】 (修正有)

【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 c D N A 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。

【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。

【請求項 2】 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。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【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 cDNA および遺伝子に関するものである。

【0002】

【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、配列表の配列番号 1 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 cDNA である。また、請求項 2 記載の本発明は、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である。

【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、配列表の配列番号 1 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 cDNA である。

【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、cDN

A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TA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に存在した活性に關与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】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が、請求項2記載の本発明のアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ遺伝子である。

【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。

【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 °C、30 秒、アニーリング温度 56 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、1 分 30 秒、3.5 サイクルの条件で行った。

【0037】その結果、約 400 bp 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。クローニングした大腸菌から、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 シークエンサー DSQ1000 を用いた蛍光オートシークエンスを行った。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 2.5 µg 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、³²P]-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】1 nmol 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、500 bp 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 ³²P]-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 ステップワ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 シークエンスを行った。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、1055 bp、うち 14 bp 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マ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、活性に關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、25 mer と 26 mer 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 DNA 10 ng 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 3.1 kb 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 シークエンスを行った。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 3077 bp 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、活性に關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 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
 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

11	12		
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 gtttgttcgt <u>gttatcttgt gtgtagttgt</u>	890		
<u>gttgatccct</u> ccaaaagtgc aaatagaact tgtgatgcac ataaaacat atcgactct	950		
cataaaaaaa ataaaacat gatgtgtatg tgtatgaggt acttaagtac aatatatata	1010		
gagagagaaa aaaaaagta agtgcaattc taaaaaaaa aaaaa	1055		
<210> 2			
<211> 1055			
<212> DNA			
<213> Glycine max			
<220>			
<221> CDS			
<222> (85)-(321), (389)-(454), (1160)-(1300), (2414)-(2506), (2707)-(2895)			
<400> 2			
ttggtgtag 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		
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			

13		14	
60	65	70	
gcc acc ttt gac tgc cag gtactctctt ctccaatctt atacacactc			351
Ala Thr Phe Asp Cys Gln			
75			
ttcacctatt tttatttaat tctgatgaca attgcag cat ggg cca tat gag tgc			406
		His Gly Pro Tyr Glu Cys	
	80	85	
ttg ctg aac aca gtt gaa gcc tgt gca att cac atc tgg cct caa ctc			454
Leu Leu Asn Thr Val Glu Ala Cys Ala Ile His Ile Trp Pro Gln Leu			
90	95	100	
gtaagtaaca attgctgtgc ctttgcccct ttctttcttt ctttctttt tcttttttct			514
ttgatttggg atcagaactt aagaatgctt tttttattat tataatatta tgttattatt			574
acggattatt cagcatcgat ttttfcagat gattaatitt tattggattt tgattaggtt			634
attttcttcc aattatittt tttatccaaa aaggagatga agttgttggg gaacttagga			694
gtgccittat tattattggt attatgittat tgtaaggag tattcattga ttttatagat			754
gattaatitt cattggatca cctttgatta ggttatttcc tttcaattat tttatittt			814
atgaaaagg agatgaagtc tgggtccacc tggacgaatg agttgttggg gaacttagaa			874
gtactattat aattatgata aattttgaaa aataaaaaata aaaaaggagt acttttggtc			934
agtgaacag tgcttttagaa agatgctcta gcttgagcac tgtgcttaag ttgctataaa			994
ttcctgttat ccgagtttga ttctatgga taaagttggt attataaatt ctggcacct			1054
gagttcgagt tcaatttga cggataaaaa agtttagcag tgctttgcat gtgtacctcg			1114
gtatctctgt tatgagtggt ttatgtaaat cacactcttt tgacag agc aaa cat ttt			1171
		Ser Lys His Phe	
		105	
cct ttc atc tac tgt gtt gag gat ctg gtg ttt cag agt aag cgt gag			1219
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 tgc gaa cct att			1267
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 gttggtgttt ttctctgatt			1320
Asn Gln Cys Tyr Asn Ser Glu His Gly Lys Gln			
140	145		
tcgctcttgt ccttgcttga gctaccatgt tgtgattgag atagtattat gtacattagt			1380
ttagttttca tgccctccga gtgtaagtat gacttgtaaa ctagtacta caaagtattc			1440
taagatccta tttggataaa atttgttaca aatacttga ggtgaagaaa ataagaagat			1500
aaaataaatt gagtttttct tccgtgagtt aaaatcaaat caacttcggc acctcggatt			1560
ttggaagagt taaatgagac tgagaacttt tatggaagtt tagtgtaag ttgattttag			1620
cttgtgagag aagctcaatt tattttactt tcttattttc tcatcttata agtgcttatg			1680
aaaaagtga tctaaacagg acttaaaatg tttttaacta accttctct tctatggttg			1740
ttttttatga accttaaagt tatactaaca ttgctaaatg atacaagcta gtggaaagtt			1800
gggaattaga aaatttgaac agttatacag ttacagggtt ggtggtgact tctcaattcc			1860
ttattttaaac taatcttaag tgtcatagat aattgaatct tcttcgaggt gagatataat			1920
ccatgtcaac tagccgtaac tgggctctgt tatgtgaaac ttggatggta aggtctggta			1980
tttgttatgt gccggtctac tactttgctt ttattcttca agacaacaaa atgaaatagc			2040
taatgagaag taattttaaact ttattccagc aattacttca aaaattggtc atgttcttca			2100
tttttataaaa actctaaagc agtgtaatat gatctacaaa ttaccttatt gtacatacatg			2160
attgctcttt gctacagata ctgccacagc atctaataga actgccaatt ttagcttct			2220
gaacattcat ctttcttcaa gctaatttct caaaatcctt tttcaatctt gctgaatgtg			2280
aagactatct cttgatgaaa aacaaaacat atgacagatg tgctgaatac atcattgttt			2340

15
 gactggaatt ttgtctcaag tagcatttac tatcttggtt 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
 agtgtttggg attttcacta aaaaatactt ctaattaaca aataacttat aacactgaaa 2610
 ttgtgtttt acatatgtaa gttgtgttat attaatgaat 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 gttgtgttga 2980
 tcctcctaaa agtgcaaata gaacttgga 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
 gcnaayttya thgtnaayca 20
 <210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Designed nucleotide based on legumaturain amino acid sequence.
 <400> 4
 tncrcrtcna cnacnaccca nggnacrtaay tt 32
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

17

<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

18

【手続補正書】

【提出日】平成 1 1 年 1 0 月 4 日 (1 9 9 9 . 1 0 . 4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【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 D N A。

(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

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 9

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 0 9】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 c D N A 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

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 0

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 1 0】

【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 c D N A 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

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【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