

(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
(P2000-139472A)

(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 | ターマート* (参考) |
|------------------------------------|-------|-----------------------|--------------------------------|
| C 1 2 N 15/09 9/50 | Z N A | C 1 2 N 15/00 9/50 | Z N A A 4 B 0 2 4 4 B 0 5 0 |
| // (C 1 2 N 15/09 C 1 2 R 1:91) | Z N A | | |

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 cDNA 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 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。

【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、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ステップウ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】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、35 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 ヲ所 (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 CTA B 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 atttctgac 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 gcagtgcaatt 830
Ser Thr Ile Ala Ser Trp Met His Stop
235 240
ttagatgtgc caatgctgca tttagtagca gtttgttcgt gttatcttgt gtgtagttgt 890
gttgatccct ccaaaagtgc aaatagaact tgtgatgcac ataaaacat atcgactct 950
cataaaaaaa ataaaacat gatgtgatg tgtatgagg 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)-(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

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 60 | 65 | 70 | |
| gcc acc ttt gac tgc cag gtactctctt ctccaatctt atacacactc | | | 351 |
| Ala Thr Phe Asp Cys Gln | | | |
| 75 | | | |
| ttcacctatt tttatntaat 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 ctttcttttt tcttttttct | | | 514 |
| ttgatttggg atcagaactt aagaatgctt tttttattat tataatatta tgttattatt | | | 574 |
| acggattatt cagcatcgat ttttcagat gattaatntt tattggattt tgattaggtt | | | 634 |
| atnttcttcc aattatnttt tttatccaaa aaggagatga agttgttggg gaacttagga | | | 694 |
| gtgcctttat tattattgntt attatgntt tgntaaggag tattcattga ttttatagat | | | 754 |
| gattaatntt cattggatca ctttgatta gnttatttcc tttcaattat tttatntttt | | | 814 |
| atgaaaagg agatgaagtc tggtgccacc tggacgaatg agttgttggg gaacttagaa | | | 874 |
| gtactattat aattatgata aatnttgaaa aataaaaaata aaaaaggagt actnttggtc | | | 934 |
| agtgtaacag tgcttttagaa agatgctcta gcttgagcac tgtgcttaag ttgctataaa | | | 994 |
| ttcctgntt ccgagnttga ttcctatgga taaagntgntt attataaatt ctggcacct | | | 1054 |
| gagntcgagt tcaatntgta cggataaaaa agnttagcag tgctntgcat gtgtacctcg | | | 1114 |
| gtatctctgt tatgagntt ttatgntaat cacactcttt tgcag agc aaa cat ttt | | | 1171 |
| Ser Lys His Phe | | | |
| | | | 105 |
| cct ttc atc tac tgt gnt 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 tcg 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 gntgntgntt ttctctgatt | | | 1320 |
| Asn Gln Cys Tyr Asn Ser Glu His Gly Lys Gln | | | |
| 140 | 145 | | |
| tcgctctgt ccttgcttga gctaccatgt tgtgattgag atagtattat gtacattagt | | | 1380 |
| ttagntttca tgccctccga gtgtaagtat gacttntaaa ctagtacta caaagtattc | | | 1440 |
| taagatccta tttgataaaa atttnttaca aatacttntca gntgaagaaa ataagaagat | | | 1500 |
| aaaaataaatt gagnttttct tccgtgagntt aaaaatcaaat caacttccggc acctcggatt | | | 1560 |
| ttggaagagt taaatgagac tgagaactntt tatggaagntt tagtnttaag ttgattnttag | | | 1620 |
| cttntgagag aagctcaatt tattnttactt tcttattntc tcatctntata agtntctatg | | | 1680 |
| aaaaagntga tctaaacagg actntaaaatg tntnttaacta acctnttctct tctatgnttg | | | 1740 |
| tntnttatga acctaaagt tatactaaca ttgntaaatg atacaagnta gtggaagntt | | | 1800 |
| gggaattaga aaatntgaac agntatacag ttacaggntt gntgntgact tctcaattcc | | | 1860 |
| tntnttaaac taatctntaag tntcatagat aatntaatct tctntcagagnt gagatntaat | | | 1920 |
| ccatntcaac tagccntaac tggntctctgt tatntgaaac ttgntagnta agntctgnta | | | 1980 |
| tntnttatgt gccgntctac tactnttgctt ttattctntca agacaacaaa atgaaatagc | | | 2040 |
| taatgagaag taatnttaac ttattccagc aatntactntca aaaaatgntc atnttctntca | | | 2100 |
| tntnttcaaaa actntaaagc agntntaatat gatntcaaaa ttacctnttnt gtcatatag | | | 2160 |
| atntctnttt gntacagata ctgccacagc atntaataga actntcaaat tttagctntct | | | 2220 |
| gaacnttcat cttnttntca gntaattntct caaaaatctnt tntcaatctnt gntgaatntg | | | 2280 |
| aagactntct cttgatntaa aacaaaacat atntcagatg tntntgaatac atcattnttt | | | 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
agtgtttgga attttacta aaaaatactt ctaattaaca aataacttat aacactgaaa 2610
tttgtgtttt 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 tcttgccagt gcattttaga 2920
Ser Thr Ile Ala Ser Trp Met His Stop
235 240
tgtgccaatg ctgcatttag tagcagtttg ttcgtgttat cttgtgtgta gttgtgttga 2980
tccctccaaa agtgcaaata gaactgtgta 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
tcnccrtcna cnacnaccca nggnacrta 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

【手続補正書】

【提出日】平成 11 年 10 月 4 日 (1999.10.4)

【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 cDNA。

(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】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【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

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【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

【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