

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 1)

(11) 特許番号

第2990280号

(45) 発行日 平成11年(1999)12月13日

(24) 登録日 平成11年(1999)10月15日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00
1/21		1/21
// C12N 9/48		C12N 9/48
(C12N 1/21		
C12R 1:19)		

請求項の数 6 (全15頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11 - 34231	(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
(22) 出願日	平成11年(1999) 2月12日	(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(1999) 7月 6日	(72) 発明者	ラジャンデルナス・パニカール 茨城県つくば市二の宮 1 - 24 - 8 パル シャスつくば 1 - 303
微生物の受託番号	F E R M P - 1 7 1 7 8	(74) 代理人	弁理士 久保田 藤郎 (外 1 名)
		審査官	内田 俊生
		(58) 調査した分野(Int.Cl. ⁶ , D B 名)	C12N 15/00 - 15/90 GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

(54) 【発明の名称】 アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子、該遺伝子を含むベクタ並びに形質転換体

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アミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子。

【請求項 2】 請求項 1 記載のアミノペプチダーゼ前駆体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 7 1 7 8) 。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼの遺伝子。

【請求項 5】 請求項 4 記載のアミノペプチダーゼ遺伝子を含むプラスミド。 10

【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】

【 0 0 0 1 】

2

【発明の属する技術分野】 本発明は、アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドベクター並びに形質転換体に関する。アミノペプチダーゼは、タンパク質やペプチドの N 末端側に作用し、アミノ酸単位で加水分解する酵素であり、ペプチドやアミノ酸を主成分とする調味液の製造等に活用されている。また、一部のものは、ペプチド性の苦味を除去・低減する作用を有している。この発明は、アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子に関するものであり、本酵素を活用することにより、苦味を低減ないし消滅することができるので、食品分野における活用が期待される。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 近年、調味液やカルシウム吸収促進作用を持つカゼイン分解物など、タンパク質の加水分解物を含む素材が開発され、

各種食品分野で利用されている。しかし、これらのタンパク質分解物を含有する素材は、苦味を呈するものも多し。そのため、商品化に困難をきたす原因となることもある。これには、タンパク質が酵素等によって分解された際に生じる疎水性アミノ酸に富む苦味ペプチドが関与していることが多い。

【0003】この苦味ペプチドをタンパク質分解酵素で分解すれば、苦味は低減あるいは消滅させることができる。しかしながら、タンパク質を分解する酵素のうち、N末端からアミノ酸を分解するアミノペプチダーゼに関しては、市販されているものが少なく、実用化も限られている。また、フラボバクテリウム属微生物に由来するアミノペプチダーゼの遺伝子を単離したという報告もなされていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アミノペプチダーゼを食品加工の分野等に活用するために、フラボバクテリウム属微生物からのアミノペプチダーゼ遺伝子のクローニングを計画し、本遺伝子のクローニングと大量生産に成功し、本発明を完成させた。

【0005】すなわち、請求項1記載の本発明は、配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するアミノペプチダ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記載のアミノペプチダーゼ前駆体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(FERM P-17178)である。

【0006】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アミノペプチダーゼの遺伝子である。請求項5記載の本発明は、請求項4記載のアミノペプチダーゼ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。

【0007】

【発明の実施の形態】以下において本発明を詳しく説明する。本発明者らは、以下のようにして本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子を解明することに成功した。

【0008】(1)アミノペプチダーゼ遺伝子の部分塩基配列の決定

本発明者らは、高いアミノペプチダーゼ活性を有するフラボバクテリウム属の細菌の1種、フラボバクテリウム・ブレブ(*Flavobacterium breve*) T-382株を用いて以下の操作を行った。なお、本発明に使用できる微生物は、フラボバクテリウム属に属するものであればよく、上記のT-382株に限定されない。

【0009】フラボバクテリウム・ブレブT-382株を常法により栄養培地で培養したのち、培養物から菌体を除去して得られた培養上清から、高度に精製したアミノペプチダーゼを得た。精製手段は、イオン交換クロマトグラフィーなどの既知の方法を適用することができ

る。ついで、常法により、この精製酵素のN末端のアミノ酸配列を決定し(配列表の配列番号3に記載)、該配列をもとにフォワードプライマー(配列表の配列番号4に記載)及びリバースプライマー(配列表の配列番号5に記載)を作成した。

【0010】これらのプライマー(配列表の配列番号4および5参照)と、フラボバクテリウム・ブレブT-382株から斉藤の方法(蛋白質核酸酵素,第11巻,446頁)により抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCR反応により増幅させた。その結果、800bpの明瞭なバンドが得られた。該バンドのDNA塩基配列を解読し、その塩基配列の情報をつなぎ合わせて、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)が得られた。この715bp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末端のアミノ酸配列(配列表の配列番号3に記載)の21番目からの配列が認められることから、アミノペプチダーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【0011】(2)5'及び3'側未知領域の塩基配列の決定

上記(1)において得られた塩基配列は、アミノペプチダーゼ遺伝子の一部であることから、未解明の部分についても塩基配列の特定を試みた。この実験を行うにあたり、本発明者らは、Genomics、25号、674頁、1995年に記載されたサーマル・アシメトリック・インターレースドPCR(TAIL-PCR)を利用した。

【0012】TAIL-PCRとは、既知の配列に特異的なプライマーと非特異的なプライマーとを組合せて使用することにより、既知の配列に隣接する未知DNA配列を特異的に増幅する方法である。すなわち、鋳型DNAへのアニーリング温度が異なる2種類のオリゴヌクレオチドである特異的なプライマー及び非特異的なプライマーを用意し、PCRのアニーリング温度を变化的に制御することにより、非特異的な産物の増幅を抑制し、目的配列を優先的に増幅するものである。前記(1)で得られた715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の情報をもとに、3つのフォワードプライマー(配列表の配列番号7~9に記載)、3つのリバースプライマー(配列表の配列番号10~12に記載)を化学合成した。また、未知領域に非特異的に結合する混合プライマー(配列表の配列番号13に記載)を化学合成した。

【0013】まず、3つのフォワードプライマーのそれぞれ(配列表の配列番号7~9に記載)と混合プライマー(配列表の配列番号13に記載)との組み合わせを用い、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としたTAIL-PCRを行った。増幅したDNA断片のDNA塩基配列を解読し、解読した塩基配列の情報をつなぎ合わせたところ、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列が得られ

た。このDNA塩基配列をアミノ酸に翻訳した。その結果、前記(1)で得られた715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の一部(139番目から238番目のアミノ酸)が認められた。このことから、得られたDNA塩基配列(配列表の配列番号14に記載)は、アミノペプチダーゼ遺伝子の3'下流部分であることが判明した。

【0014】また、同様に、3つのリバースプライマーのそれぞれ(配列表の配列番号10~12に記載)と混合プライマー(配列表の配列番号13に記載)との組合せを用いて、先に抽出したフラボバクテリウム・プレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としたTAIL-PCRを行った。増幅したDNA断片のDNA塩基配列を解読し、得られた塩基配列の情報をつなぎ合わせたところ、プライマー部分以外に新たなDNA塩基配列(配列表の配列番号15に記載)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、715bpのDNA塩基配列(配列表の配列番号6に記載)の一部(1番目から66番目のアミノ酸)が認められることから、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の5'上流部分であることが判明した。

【0015】なお、本発明者らは、上記配列の解明に際してTAIL-PCRを用いたが、他の方法によることもできる。例えば、フラボバクテリウム・プレブT-382株のゲノムライブラリーから標識したプローブを用いてスクリーニングする方法が挙げられる。すなわち、フラボバクテリウム・プレブT-382株のゲノムDNAを適当な制限酵素で断片化した後、ファージベクターに組み込み、ゲノムライブラリーを作成する。続いて、このゲノムライブラリーの中から、天然酵素のアミノ酸配列を基に化学合成したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするクローンをスクリーニングすることによって、上記配列を得ることができる。

【0016】(3)請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の全塩基配列の決定
上記(1)及び(2)で得られたDNA塩基配列の情報から、最終的に、アミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子のDNA塩基配列を決定した(配列表の配列番号1に記載)。すなわち、これが請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子である。請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子は、全長2521bpからなり、497個のアミノ酸をコードする。

【0017】この配列、とりわけ構造遺伝子部分の塩基配列が正しいことを確認するため、以下の操作を行った。まず、上記(2)で得られた3'下流および5'上流のDNA塩基配列(配列表の配列番号14と15に記載)の情報を基に化学合成したフォワードプライマー(配列表の配列番号16に記載)とリバースプライマー(配列表の配列番号17に記載)とを用いて、先に抽出したフラボバクテリウム・プレブT-382株のゲノム

DNAを鋳型としたPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片の塩基配列を解読し、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子(配列表の配列番号1に記載)の190~2282番目が正しいことを再確認した。

【0018】請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子のうち、活性型酵素をコードする遺伝子の部分を特定するために、まず、前記(1)で解明した活性型酵素のN末端のアミノ酸配列(配列表の配列番号3参照)との比較を行った。その結果、請求項1記載の本発明のアミノ酸配列(配列表の配列番号1参照)のうち、1039番目以降の部分に活性型アミノペプチダーゼの遺伝子を有することが明らかとなった。

【0019】続いて、活性型アミノペプチダーゼの遺伝子のC末端側を特定した。その際、C末端側はホモロジー検索の結果から推定される部位とした。得られた塩基配列は、配列表の配列番号2に示す通りであり、全長912bpからなり、304個のアミノ酸をコードする。すなわち、これが請求項4記載の本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子である。

【0020】請求項4記載の本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質の分子量は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定したところ、34,000ダルトンであり、本遺伝子でコードされる蛋白の分子量33,914と良く一致していた。

【0021】なお、請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子および請求項4記載の本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子は、本発明者らが先に解明したアエロモナス属微生物由来のアミノペプチダーゼ(特開平8-173168号公報)とは全く異なる塩基配列を有するものである。本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子は、新規な塩基配列を有する遺伝子であり、National Center for Biotechnology Informationのpsi-BLASTによるホモロジー検索の結果、平成11年2月9日現在、これと40%以上の相同性が認められる遺伝子は見当たらなかった。

【0022】(4)酵素遺伝子の発現
請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体遺伝子のプラスミドへのクローニングと発現を実施した。まず、プラスミドpQE60を制限酵素により分解した。次に、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、請求項1記載の本発明のアミノペプチダーゼ前駆体をコードする遺伝子のDNA塩基配列を基に作成したフォワードプライマー(配列表の配列番号18に記載)とリバースプライマー(配列表の配列番号19に記載)を用い、フラボバクテリウム・プレブT-382株のゲノムDNAを鋳型としてPCR法により、アミノペプチダーゼ前駆体をコードするDNAを増幅した。

【0023】増幅されたDNA断片を制限酵素で分解

し、これを先に精製した制限酵素分解したプラスミドと混合し、定法によりライゲーション反応を行い、プラスミド p F B A P N M C を調製した。これが請求項 2 記載の本発明のプラスミドである。この請求項 2 記載の本発明のプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌が請求項 3 記載の本発明の形質転換された大腸菌である。この形質転換された大腸菌は、工業技術院生命工学工業研究所に寄託されており、その受託番号は F E R M P - 1 7 1 7 8 である。

【 0 0 2 4 】 請求項 3 記載の形質転換された大腸菌から発現するタンパク質は、後述の実施例に示すように、アミノペプチダーゼ活性を示すことが明らかである。すなわち、請求項 1 記載の本発明の前駆体遺伝子から得られる前駆体アミノペプチダーゼが、該前駆体を活性型に変換する酵素によるプロセッシングを受けて活性型のアミノペプチダーゼとなること、また、請求項 4 記載の本発明の遺伝子がコードする活性型アミノペプチダーゼは、プロセッシングを受けることなく高いアミノペプチダーゼ活性を発現することが明らかとなった。

【 0 0 2 5 】 次に、請求項 4 記載の本発明のアミノペプチダーゼ遺伝子のプラスミドへのクローニングと発現を実施した。まず、寄託した大腸菌 (F E R M P - 1 7 1 7 8) から得られるプラスミド p F B A P N M C を鋳型とし、二つのプライマー (配列表の配列番号 2 0 と 2 1) を用いて、P C R 法によりアミノペプチダーゼをコードする DNA を増幅した。なお、本発明者らは、上記 P C R の鋳型にプラスミド p F B A P N M C を用いたが、フラボバクテリウム・ブレブ T - 3 8 2 株のゲノム DNA を用いることもできる。増幅された DNA 断片を制限酵素分解し、これを先述の前駆体の場合に用いたのと同様の制限酵素分解プラスミドと混合し、常法によりライゲーション反応を行ってプラスミド p F B A P M を調製した。得られたプラスミドが請求項 5 記載の本発明のプラスミドである。

【 0 0 2 6 】 このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換して得られる形質転換大腸菌が、請求項 6 記載の本発明の形質転換体である。この形質転換体からは、微量ではあるがアミノペプチダーゼ活性を有することが確認されている。

【 0 0 2 7 】 以上に説明したように、本発明は、フラボバクテリウム・ブレブ T - 3 8 2 株由来のアミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子並びにそれらの大量発現系を提供するものである。アミノペプチダーゼは、調味液の製造等に活用される他、苦味を低減あるいは消滅する作用を有する。本発明により、このアミノペプチダーゼの遺伝情報が提供され、該酵素の大量生産に有用である。

【 0 0 2 8 】

【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

(1) 部分塩基配列の決定

フラボバクテリウム・ブレブ (*Flavobacterium breve*) T - 3 8 2 株を栄養培地に培養したのち、菌体を除去して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アミノペプチダーゼを得た。この精製酵素を用いて、プロテインシーケンサー G 1 0 0 5 A 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 に記載) を決定した。

【 0 0 2 9 】 解読できたアミノ酸配列の中から、コドンの縮重の少ない領域を選び出し、1 箇所のフォーワードプライマー (配列表の配列番号 4 に記載) を化学合成した。リバースプライマー (配列表の配列番号 5 に記載) は、N 末端のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 3 に記載) 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メントを作成し、保存されているアミノ酸配列領域を見だし、そのアミノ酸配列領域の情報を基にして作成した。

【 0 0 3 0 】 フラボバクテリウム・ブレブ T - 3 8 2 株から、斉藤の方法 (蛋白質核酸酵素, 第 1 1 巻, 4 4 6 頁) によりゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を鋳型とし、先の二つのプライマー (配列表の配列番号 4 と 5) を用いて P C R 反応により増幅させた。その結果、8 0 0 b p の明瞭なバンドが得られた。

【 0 0 3 1 】 得られたバンドをクローニングし、d ローダミン・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て、プライマー部分以外に新たな DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 6 に記載) が得られた。この 7 1 5 b p 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 末端のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 3 に記載) の 2 1 番目以降の配列が認められることから、アミノペプチダーゼ遺伝子の一部であることが判明した。

【 0 0 3 2 】 (2) 5 ' 及び 3 ' 側未知領域の塩基配列の決定

次に、Genomics、25 号、674 頁、1995 年に記載されたサーマル・アシンメトリック・インターレースド P C R (T A I L - P C R) を実施するために、次のプライマーを用意した。上記 (1) で得られた 7 1 5 b p の DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 6 に記載) の情報をもとに、フォーワードプライマー 1 (配列表の配列番号 7 に記載)、フォーワードプライマー 2 (配列表の配列番号 8 に記載)、フォーワードプライマー 3 (配列表の配列番号 9 に記載)、リバースプライマー 1 (配列表の配列番号 1 0 に記載)、リバースプライマー 2 (配列表の配列番号 1 1 に記載)、リバースプライマー 3 (配列表の配列番号 1 2 に記載) を化学合成した。また、未知領域に非特異的に結合する混合プライマー 1 (配列表の配列

番号 1 3 に記載) を化学合成した。

【 0 0 3 3 】先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブ T - 3 8 2 株のゲノム DNA を鋳型とし、化学合成したフォワードプライマー 1 (配列表の配列番号 7 に記載) と混合プライマー 1 (配列表の配列番号 1 3 に記載) とを用い、1 回目の T A I L - P C R を行った。T A I L - P C R の温度条件は、9 7 - 1 分間、9 8 - 1 分間を 1 サイクル、9 8 - 3 0 秒間、5 6 - 1 5 秒間、7 2 - 3 0 秒間を 5 サイクル、9 8 - 3 0 秒間、3 0 - 3 分間、3 0 から 7 2 まで 3 分間で昇温、7 2 - 1 分間を 1 サイクル、9 8 - 3 0 秒間、5 8 - 1 5 秒間、7 2 - 3 0 秒間、9 8 - 3 0 秒間、5 8 - 1 5 秒間、7 2 - 3 0 秒間、9 8 - 3 0 秒間、3 8 - 1 5 秒間、7 2 - 3 0 秒間を 1 5 サイクル、7 2 - 5 分間を 1 サイクルとした。

【 0 0 3 4 】続いて、1 回目の T A I L - P C R 産物を鋳型とし、先に化学合成したフォワードプライマー 2 (配列表の配列番号 8 に記載) と混合プライマー 1 (配列表の配列番号 1 3 に記載) を用いて 2 回目の T A I L - P C R を行った。

【 0 0 3 5 】さらに、2 回目の T A I L - P C R 産物を鋳型とし、先に化学合成したフォワードプライマー 3 (配列表の配列番号 9 に記載) と混合プライマー 1 (配列表の配列番号 1 3 に記載) を用い、3 回目の T A I L - P C R を行い、増幅した DNA 断片の 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て、プライマー部分以外に新たな DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 1 4 に記載) が得られた。

【 0 0 3 6 】この DNA 塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、前記 (1) で得られた 7 1 5 b p の DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 6 に記載) の一部 (1 3 9 番目から 2 3 8 番目のアミノ酸配列) が認められた。このことから、得られた DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 1 4 に記載) は、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の 3 ' 下流部分であることが判明した。

【 0 0 3 7 】また、同様に、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブ T - 3 8 2 株のゲノム DNA を鋳型とし、先に化学合成したリバースプライマー 1 (配列表の配列番号 1 0 に記載) と混合プライマー 1 (配列表の配列番号 1 3 に記載) を用い、1 回目の T A I L - P C R を行った。

【 0 0 3 8 】続いて、1 回目の T A I L - P C R 産物を鋳型とし、先に化学合成したリバースプライマー 2 (配列表の配列番号 1 1 に記載) と混合プライマー 1 (配列表の配列番号 1 3 に記載) を用い、2 回目の T A I L - P C R を行った。

【 0 0 3 9 】さらに、2 回目の T A I L - P C R 産物を鋳型とし、先に化学合成したリバースプライマー 3 (配列表の配列番号 1 2 に記載) と混合プライマー 1 (配列表の配列番号 1 3 に記載) を用い、3 回目の T A I L -

P C R を行い、増幅した DNA 断片の 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て、プライマー部分以外に新たな DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 1 5 に記載) 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 7 1 5 b p の DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 6 に記載) の一部 (1 番目から 6 4 番目のアミノ酸) が認められることから、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の 5 ' 上流部分であることが判明した。

10 【 0 0 4 0 】 (3) アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子の全塩基配列の決定

次に、T A I L - P C R により明らかになった DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 1 4 と 1 5 に記載) の情報と、先のアミノ酸配列情報を基に作成したプライマーから得られた DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 6 に記載) の情報から、最終的に、アミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子の DNA 塩基配列を決定した (配列表の配列番号 1) 。

20 【 0 0 4 1 】この配列、とりわけ構造遺伝子部分の塩基配列が正しいことを確認するため、以下の操作を行った。まず、フォワードプライマー 4 (配列表の配列番号 1 6 に記載) とリバースプライマー 4 (配列表の配列番号 1 7 に記載) を化学合成し、これらのプライマーを用いて、先に抽出したフラボバクテリウム・ブレブ T - 3 8 2 株のゲノム DNA を鋳型とした P C R により DNA 断片を増幅した。その DNA 断片の塩基配列を解読したところ、決定したアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子の DNA 塩基配列 (配列表の配列番号 1) のうちの、1 9 0 番目 ~ 2 2 8 2 番目の部分の塩基配列が確認され

30 た。【 0 0 4 2 】一方、前記 (1) でアミノペプチダーゼ活性型酵素の N 末端のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 3 参照) を解読しており、そのアミノ酸配列は配列番号 1 に示したアミノ酸配列中の 1 1 3 番目以降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 1 0 3 9 番目以降に活性型アミノペプチダーゼ遺伝子を見いだした。

40 【 0 0 4 3 】活性型酵素の遺伝子は、アミノペプチダーゼの N 末端アミノ酸配列をもとに、アミノペプチダーゼ前駆体遺伝子から構成し、配列表の配列番号 2 に示した。その際、C 末端側はホモロジー検索の結果から推定される領域とした。活性型酵素の分子量は、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定したところ、3 4 , 0 0 0 ダルトンであり、本遺伝子でコードされる蛋白の分子量 3 3 , 9 1 4 と良く一致していた。

50 【 0 0 4 4 】 (4) 酵素遺伝子の大腸菌における発現次に、アミノペプチダーゼとその前駆体遺伝子のプラスミドへのクローニングと発現を実施した。まず、プラスミド p Q E 6 0 を制限酵素 Nco I と Bam HI で分解した (A) 。次に、この制限酵素切断プラスミド (A) と D

11

NAの塩基配列が合致するよう、アミノペプチダーゼ前駆体をコードするDNA塩基配列を基に、フォワードプライマー5（配列表の配列番号18に記載）とリバースプライマー5（配列表の配列番号19に記載）を化学合成した。

【0045】フラボバクテリウム・ブレブT-382株のゲノムDNAを鋳型とし、両プライマーを用いて、PCR法によりアミノペプチダーゼ前駆体をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNA断片を、制限酵素Nco I とBam HIで分解した（B）。制限酵素分解したプラスミド（A）と制限酵素分解したDNA断片（B）とを混合し、常法によりライゲーション反応を行い、プラスミドpFBAPNMCを調製した。得られたプラスミドを用い大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌を液体培養し、これを遠心処理し上澄を得た（C）。一方、菌体を超音波破碎し、遠心により可溶性画分を得た（D）。

【0046】得られる上澄（C）と可溶性画分（D）には、アミノペプチダーゼ前駆体が含まれることから、前駆体を活性型に変換する酵素で上澄（C）と可溶性画分（D）を処理し、それらのアミノペプチダーゼ活性を測定した。すなわち、アミノペプチダーゼ前駆体にプロセッシング酵素を与えた後、20mMトリスバッファー（pH8.5）中で30、1時間反応させ、アミノペプチダーゼ前駆体を活性型に変換した。その結果、上澄（C）と可溶性画分（D）は、それぞれ50単位/mL、40単位/mLのアミノペプチダーゼ活性が得られた。

SEQUENCE LISTING

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

<120> Gene of aminopeptidase precursor, and vector containing said gene and transformat

<130> P111018K

<160> 24

<210> 1

<211> 2521

<212> DNA

<213> Flabovacterium breve T-382

<400> 1

```
cgcaaaaatt taagaatgag aaagataaat cagaagattt gaagaaaata aaaccttcca 60
taatgtagt caaccgactc gcaagaagaac cataaatgct tttcatttga aaggaaaatg 120
gcgcgaaaag tttttcaaaa acgataatcc aattgttttg gaattgggtt gtggaaaagg 180
cgaatatact gttgcatgag cgcgctcgaga tgcccatcgt aattttatag gtgttgatat 240
aaaaggtgca cgattttggc gaggtgcaaa aactgccatc gaagaaggat tgaataatgt 300
tggttttata cgtacacaaa ttgaattgat tgatcatttg tttgaccaa acgaggttga 360
cgaaatttgg attacttttc cagatccaca aatcaaattt agacgtacca aacaccgttt 420
gactcaccca gattttttga atcgatatgc taaaatttta aaaccagaag gaactgttaa 480
tttgaaaacc gattcagaat ttttcatagg ctatacacat ggtgttatac agcttttagg 540
tcacaaagtt ttgaaatcat cacatgacgt ttaccatcca gatcgtgctg atatacctgc 600
```

12

【0047】次に、プラスミドpFBAPNMCを鋳型とし、二つのプライマー（配列表の配列番号20と21）を用いてPCR法により、活性型アミノペプチダーゼをコードするDNAを増幅した。増幅されたDNA断片を、制限酵素Nco I とBam HIで分解した（E）。制限酵素分解DNA断片（E）と、先に調製した制限酵素分解プラスミド（A）とを混合し、常法によりライゲーション反応を行い、プラスミドpFBAPMを調製した。

【0048】得られたプラスミドを用い大腸菌を形質転換した。得られた形質転換菌を液体培養し、これを遠心処理し上澄を得た（F）。一方、菌体を超音波破碎し、遠心により可溶性画分を得た（G）。上澄（F）と可溶性画分（G）のアミノペプチダーゼ活性を測定したところ、それぞれ極微量（1単位/mL程度）の活性が得られた。また、大腸菌体内において発現した大半の酵素は封入体を形成した。

【0049】（5）まとめ

10 以上の実施例から、フラボバクテリウム・ブレブT-382株由来のアミノペプチダーゼ前駆体および活性型アミノペプチダーゼをクローニングし、形質転換した大腸菌からアミノペプチダーゼを得ることができた。

【0050】

【発明の効果】本発明によれば、アミノペプチダーゼ及びその前駆体の遺伝子が提供される。これを発現させて得られるアミノペプチダーゼは、調味料の製造や脱苦味等に有用であることから、本発明の遺伝子は食品産業等の分野における活用が期待される。

【配列表】

13	14
agttgtaact gaggtgcaaa ctttttacga atcaaaattt ttacaagaaa ataaaaaat	660
tacgtacatt agtttttcat taacacctta aaaatcaaga aa atg ctt ctg aac	714
Met Leu Leu Asn	
1	
aaa att tta cta ctt tca ctt tct cta tta aat gtt ggt ctc ttt gca	762
Lys Ile Leu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Leu Asn Val Gly Leu Phe Ala	
5 10 15 20	
caa cat tcg cac aaa cta cca aaa gat act ccc aaa agt tac ttt tat	810
Gln His Ser His Lys Leu Pro Lys Asp Thr Pro Lys Ser Tyr Phe Tyr	
25 30 35	
gca acg atg aat gct gat cag gcc gat aaa tta aag gtt tta cat ccc	858
Ala Thr Met Asn Ala Asp Gln Ala Asp Lys Leu Lys Val Leu His Pro	
40 45 50	
aat gat gtt aaa att tta gcc atc aac aaa aat gaa gct gta gtc aac	906
Asn Asp Val Lys Ile Leu Ala Ile Asn Lys Asn Glu Ala Val Val Asn	
55 60 65	
atg agc aat tat gct gct gca gat tta cat caa ttt gta ttg tcg cat	954
Met Ser Asn Tyr Ala Ala Ala Asp Leu His Gln Phe Val Leu Ser His	
70 75 80	
ggt cca ggt ttt ata ctt cat acg gat gaa aaa atc gct aaa aat tat	1002
Gly Pro Gly Phe Ile Leu His Thr Asp Glu Lys Ile Ala Lys Asn Tyr	
85 90 95 100	
tta caa aga cca caa acc aaa act tca agt gtt ctt gat ttt aac att	1050
Leu Gln Arg Pro Gln Thr Lys Thr Ser Ser Val Leu Asp Phe Asn Ile	
105 110 115	
agc gaa gat gaa att gta aaa gat tac atc aca caa gtt aaa gaa gga	1098
Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln Val Lys Glu Gly	
120 125 130	
aat ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att cat aca cga ttt	1146
Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile His Thr Arg Phe	
135 140 145	
cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac atc aaa aat ttg	1194
His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr Ile Lys Asn Leu	
150 155 160	
tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat ttg aaa gtc gag	1242
Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp Leu Lys Val Glu	
165 170 175 180	
ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt att ttc acg atc	1290
Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val Ile Phe Thr Ile	
185 190 195	
gaa ggc aac gaa gaa gca gat gaa tac atc att att ggc ggt cat gcc	1338
Glu Gly Asn Glu Glu Ala Asp Glu Tyr Ile Ile Ile Gly Gly His Ala	
200 205 210	
gac agt att gtg agt tca tct tgg ggc gga aat tac gaa ttg cgt tca	1386
Asp Ser Ile Val Ser Ser Ser Trp Gly Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Ser	
215 220 225	
cct gga gct gat gat aat gcg agt gga att gcc acc gtt aca gaa gcg	1434
Pro Gly Ala Asp Asp Asn Ala Ser Gly Ile Ala Thr Val Thr Glu Ala	
230 235 240	
ttg aga ata ttg gta gaa aat agt ttt cgt ccc aaa aaa acc att cag	1482

15	16
Leu Arg Ile Leu Val Glu Asn Ser Phe Arg Pro Lys Lys Thr Ile Gln	
245	250 255 260
att atg gcc tat gca gcc gaa gaa gtt gga ttg gtg gga tct aat gaa	1530
Ile Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Val Gly Ser Asn Glu	
	265 270 275
atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt atg gac gtc aaa gca tat gta	1578
Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly Met Asp Val Lys Ala Tyr Val	
	280 285 290
caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt tct cca aat gat gtt tac atc	1626
Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly Ser Pro Asn Asp Val Tyr Ile	
	295 300 305
act aca gat tca tac aat tca aat gac cta aat tta ttt ttg gtc gaa	1674
Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp Leu Asn Leu Phe Leu Val Glu	
	310 315 320
tta atg gaa cat tac aat gct tct gga gat cat tct ttt act tat ggt	1722
Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly Asp His Ser Phe Thr Tyr Gly	
	325 330 335 340
tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct gat cat gca tcg tgg gca aac	1770
Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala Ser Trp Ala Asn	
	345 350 355
aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc gag tcg agt ttt aat gat agt	1818
Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe Glu Ser Ser Phe Asn Asp Ser	
	360 365 370
aat cct aac att cac act agt aat gat acc tat tca aaa tca aat gaa	1866
Asn Pro Asn Ile His Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Ser Lys Ser Asn Glu	
	375 380 385
agt agt gcg cat gcc gca aaa ttt gca aaa tta gca ctg caa ttt tta	1914
Ser Ser Ala His Ala Ala Lys Phe Ala Lys Leu Ala Leu Gln Phe Leu	
	390 395 400
gta gaa gcg act aaa cca act gat gat tta ggt cta aat aac acc tca	1962
Val Glu Ala Thr Lys Pro Thr Asp Asp Leu Gly Leu Asn Asn Thr Ser	
	405 410 415 420
aag agc aat tct aaa ata gtg gtg aat caa aaa aca tta aac tat ttt	2010
Lys Ser Asn Ser Lys Ile Val Val Asn Gln Lys Thr Leu Asn Tyr Phe	
	425 430 435
tta gaa agc tcg atg aat aat aac cga gtg aaa att atc aat cca aca	2058
Leu Glu Ser Ser Met Asn Asn Asn Arg Val Lys Ile Ile Asn Pro Thr	
	440 445 450
ggt caa att gtt tat caa aac gat aaa ctt tca tca aat gga caa ctt	2106
Gly Gln Ile Val Tyr Gln Asn Asp Lys Leu Ser Ser Asn Gly Gln Leu	
	455 460 465
aat tta aca caa tta acc aat ggc atg tat atc gtt gtt ttc gaa tcc	2154
Asn Leu Thr Gln Leu Thr Asn Gly Met Tyr Ile Val Val Phe Glu Ser	
	470 475 480
gat aag ggt gaa aaa ttc act tca aaa ttc tta att cat taa acaacatat	2205
Asp Lys Gly Glu Lys Phe Thr Ser Lys Phe Leu Ile His Stop	
	485 490 495
actttaggac ataaaaaaaa gaggcataag cctctttttt tatatttata tccaatcaaa	2265
acttaattta aactctgcaa ataagcaatc caacctaagg tttggtactc ttttgctgcc	2325
gttttgaaat ctaccgctct atataatcca cgaccgacaa tcataaaatc ggtatggtaa	2385

17	18
tttttgaata caatctctgg cgtattatat tgttgcctt tgttgcctt gacaccgaaa	2445
tattaacacc tgggtgtaaat aataacaatt tattaccac tttacgttgc gctacacacc	2505
cccaaaacat taggtt	2521
<210> 2	
<211> 912	
<212> DNA	
<213> Flabovacterium breve T-382	
<400> 2	
gat ttt aac att agc gaa gat gaa att gta aaa gat tac atc aca caa	48
Asp Phe Asn Ile Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln	
1 5 10 15	
gtt aaa gaa gga aat ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att	96
Val Lys Glu Gly Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile	
20 25 30	
cat aca cga ttt cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac	144
His Thr Arg Phe His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr	
35 40 45	
atc aaa aat ttg tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat	192
Ile Lys Asn Leu Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp	
50 55 60	
ttg aaa gtc gag ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt	240
Leu Lys Val Glu Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val	
65 70 75 80	
att ttc acg atc gaa ggc aac gaa gaa gca gat gaa tac atc att att	288
Ile Phe Thr Ile Glu Gly Asn Glu Glu Ala Asp Glu Tyr Ile Ile Ile	
85 90 95	
ggc ggt cat gcc gac agt att gtg agt tca tct tgg ggc gga aat tac	336
Gly Gly His Ala Asp Ser Ile Val Ser Ser Ser Trp Gly Gly Asn Tyr	
100 105 110	
gaa ttg cgt tca cct gga gct gat gat aat gcg agt gga att gcc acc	384
Glu Leu Arg Ser Pro Gly Ala Asp Asp Asn Ala Ser Gly Ile Ala Thr	
115 120 125	
gtt aca gaa gcg ttg aga ata ttg gta gaa aat agt ttt cgt ccc aaa	432
Val Thr Glu Ala Leu Arg Ile Leu Val Glu Asn Ser Phe Arg Pro Lys	
130 135 140	
aaa acc att cag att atg gcc tat gca gcc gaa gaa gtt gga ttg gtg	480
Lys Thr Ile Gln Ile Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Val	
145 150 155 160	
gga tct aat gaa atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt atg gac gtc	528
Gly Ser Asn Glu Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly Met Asp Val	
165 170 175	
aaa gca tat gta caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt tct cca aat	576
Lys Ala Tyr Val Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly Ser Pro Asn	
180 185 190	
gat gtt tac atc act aca gat tca tac aat tca aat gac cta aat tta	624
Asp Val Tyr Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp Leu Asn Leu	
195 200 205	
ttt ttg gtc gaa tta atg gaa cat tac aat gct tct gga gat cat tct	672
Phe Leu Val Glu Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly Asp His Ser	
210 215 220	

19 20

ttt act tat ggt tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct gat cat gca 720
Phe Thr Tyr Gly Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala
225 230 235 240

tcg tgg gca aac aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc gag tcg agt 768
Ser Trp Ala Asn Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe Glu Ser Ser
245 250 255

ttt aat gat agt aat cct aac att cac act agt aat gat acc tat tca 816
Phe Asn Asp Ser Asn Pro Asn Ile His Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Ser
260 265 270

aaa tca aat gaa agt agt gcg cat gcc gca aaa ttt gca aaa tta gca 864
Lys Ser Asn Glu Ser Ser Ala His Ala Ala Lys Phe Ala Lys Leu Ala
275 280 285

ctg caa ttt tta gta gaa gcg act aaa cca act gat gat tta ggt cta 912
Leu Gln Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Pro Thr Asp Asp Leu Gly Leu
290 295 300

<210> 3
<211> 55
<212> PRT
<213> Flabovacterium breve T-382
<400> 3
Asp Phe Asn Ile Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln
1 5 10 15
Val Lys Glu Gly Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile
20 25 30
His Thr Arg Phe His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr
35 40 45
Ile Lys Asn Leu Trp Gln Ser
50 55

<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> Flabovacterium breve T-382
<400> 4
attgtaaaag attatattac acaagtnaar gargg 35

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Flabovacterium breve T-382
<400> 5
gtatcttggtg twgtatgaat ctttgrttr tartc 35

<210> 6
<211> 715
<212> DNA
<213> Flabovacterium breve T-382
<400> 6

a aat ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att cat aca cga 46
Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile His Thr Arg
1 5 10 15

ttt cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac atc aaa aat 94
Phe His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr Ile Lys Asn

21		20		25		30	22
	ttg tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat ttg aaa gtc						142
	Leu Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp Leu Lys Val						
	35		40		45		
	gag ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt att ttc acg						190
	Glu Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val Ile Phe Thr						
	50		55		60		
	atc gaa ggc aac gaa gaa gca gat gaa tac atc att att ggc ggt cat						238
	Ile Glu Gly Asn Glu Glu Ala Asp Glu Tyr Ile Ile Ile Gly Gly His						
	65		70		75		
	gcc gac agt att gtg agt tca tct tgg ggc gga aat tac gaa ttg cgt						286
	Ala Asp Ser Ile Val Ser Ser Ser Trp Gly Gly Asn Tyr Glu Leu Arg						
	80		85		90		95
	tca cct gga gct gat gat aat gcg agt gga att gcc acc gtt aca gaa						334
	Ser Pro Gly Ala Asp Asp Asn Ala Ser Gly Ile Ala Thr Val Thr Glu						
	100		105		110		
	gcg ttg aga ata ttg gta gaa aat agt ttt cgt ccc aaa aaa acc att						382
	Ala Leu Arg Ile Leu Val Glu Asn Ser Phe Arg Pro Lys Lys Thr Ile						
	115		120		125		
	cag att atg gcc tat gca gcc gaa gaa gtt gga ttg gtg gga tct aat						430
	Gln Ile Met Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Val Gly Leu Val Gly Ser Asn						
	130		135		140		
	gaa atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt atg gac gtc aaa gca tat						478
	Glu Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly Met Asp Val Lys Ala Tyr						
	145		150		155		
	gta caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt tct cca aat gat gtt tac						526
	Val Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly Ser Pro Asn Asp Val Tyr						
	160		165		170		175
	atc act aca gat tca tac aat tca aat gac cta aat tta ttt ttg gtc						574
	Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp Leu Asn Leu Phe Leu Val						
	180		185		190		
	gaa tta atg gaa cat tac aat gct tct gga gat cat tct ttt act tat						622
	Glu Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly Asp His Ser Phe Thr Tyr						
	195		200		205		
	ggt tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct gat cat gca tcg tgg gca						670
	Gly Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala Ser Trp Ala						
	210		215		220		
	aac aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc gag tcg agt ttt aat						715
	Asn Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe Glu Ser Ser Phe Asn						
	225		230		235		

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Flavobacterium breve T-382

<400> 7

aggcaacgaa gaagcagatg aa 22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Flavobacterium breve T-382

23

<400> 8
caccgttaca gaagcgttga g 21
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 9
ctatgcagcc gaagaagtg g 21
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 10
atattctcaa cgcttctgta acg 23
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 11
ttccactcgc attatcatca gc 22
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 12
atgtattcat ctgcttcttc gtt 23
<210> 13
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial Sequence
<220>
<221> unsure
<222> 5, 10
<223> Designed oligonucleotide based on random sequence.
<400> 13
agwcnngawgn acwaaa 16
<210> 14
<211> 1010
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 14
a ttg gtg gga tct aat gaa atc gct aca aaa tat cga aat caa ggt 46
Leu Val Gly Ser Asn Glu Ile Ala Thr Lys Tyr Arg Asn Gln Gly
1 5 10 15
atg gac gtc aaa gca tat gta caa ttt gac atg acc aat tat aaa ggt 94
Met Asp Val Lys Ala Tyr Val Gln Phe Asp Met Thr Asn Tyr Lys Gly
20 25 30
tct cca aat gat gtt tac atc act aca gat tca tac aat tca aat gac 142
Ser Pro Asn Asp Val Tyr Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Asn Ser Asn Asp
35 40 45

25 26
 cta aat tta ttt ttg gtc gaa tta atg gaa cat tac aat gct tct gga 190
 Leu Asn Leu Phe Leu Val Glu Leu Met Glu His Tyr Asn Ala Ser Gly
 50 55 60
 gat cat tct ttt act tat ggt tac acc att tgt aac tat ggc tgt tct 238
 Asp His Ser Phe Thr Tyr Gly Tyr Thr Ile Cys Asn Tyr Gly Cys Ser
 65 70 75
 gat cat gca tcg tgg gca aac aaa ggt ttt cct gct gct ttc cct ttc 286
 Asp His Ala Ser Trp Ala Asn Lys Gly Phe Pro Ala Ala Phe Pro Phe
 80 85 90 95
 gag tcg agt ttt aat gat agt aat cct aac att cac act agt aat gat 334
 Glu Ser Ser Phe Asn Asp Ser Asn Pro Asn Ile His Thr Ser Asn Asp
 100 105 110
 acc tat tca aaa tca aat gaa agt agt gcg cat gcc gca aaa ttt gca 382
 Thr Tyr Ser Lys Ser Asn Glu Ser Ser Ala His Ala Ala Lys Phe Ala
 115 120 125
 aaa tta gca ctg caa ttt tta gta gaa gcg act aaa cca act gat gat 430
 Lys Leu Ala Leu Gln Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Pro Thr Asp Asp
 130 135 140
 tta ggt cta aat aac acc tca aaa agc aat tct aaa ata gtg gtg aat 478
 Leu Gly Leu Asn Asn Thr Ser Lys Ser Asn Ser Lys Ile Val Val Asn
 145 150 155
 caa aaa aca tta aac tat ttt tta gaa agc tcg atg aat aat aac cga 526
 Gln Lys Thr Leu Asn Tyr Phe Leu Glu Ser Ser Met Asn Asn Asn Arg
 160 165 170 175
 gtg aaa att atc aat cca aca ggt caa att gtt tat caa aac gat aaa 574
 Val Lys Ile Ile Asn Pro Thr Gly Gln Ile Val Tyr Gln Asn Asp Lys
 180 185 190
 ctt tca tca aat gga caa ctt aat tta aca caa tta acc aat ggc atg 622
 Leu Ser Ser Asn Gly Gln Leu Asn Leu Thr Gln Leu Thr Asn Gly Met
 195 200 205
 tat atc gtt gtt ttc gaa tcc gat aag ggt gaa aaa ttc act tca aaa 670
 Tyr Ile Val Val Phe Glu Ser Asp Lys Gly Glu Lys Phe Thr Ser Lys
 210 215 220
 ttc tta att cat taa acaacatata ctttaggaca taaaaaaaaag aggcataagc c 726
 Phe Leu Ile His Stop
 225
 tcttttttta tatttatatc caatcaaac ttaatttaa ctctgcaaat aagcaatcca 786
 acctaagggtt tggfactcct ttgctgccgt ttgaaatct accgctctat ataatccacg 846
 accgacaatc ataaatcgg tatgtaatt ttgaaatac atctctggcg tattatattg 906
 ttgtcctttg ttgtccctga caccgaaata ttaacacctg gtgtaaataa taacaattta 966
 ttaccactt tacgttgcg tacacacccc caaacatta gggt 1010
 <210> 15
 <211> 1296
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 15
 cgcaaaaatt taagaatgag aaagataaat cagaagattt gaagaaaata aaaccttcga 60
 taatgtagtg caaccgactc gcgaagaac cataaatgct tttcatttga aaggaaaatg 120
 gcgcgaaaag tttttcaaaa acgataatcc aattgttttg gaattgggtt gtggaaaagg 180
 cgaatatact gttgcatg cgcgctcgaga tgccatcgt aattttatag gtgttgatat 240

27	28
aaaaggtgca cgattttggc gaggtgcaaa aactgccatc gaagaaggat tgaataatgt	300
tggttttata cgtacacaaa ttgaattgat tgatcatttg ttgaccaaa acgaggtgga	360
cgaatttgg attacttttc cagatccaca aatcaaattt agacgtacca aacaccgttt	420
gactcaccca gatTTTTTga atcgatatgc taaaatttta aaaccagaag gaactgtaa	480
tttgaaaacc gattcagaat ttttcatg ctatacat ggtgttatac agcttttagg	540
tcacaaagt ttgaatcat cacatgacgt ttaccatcca gatcgtgctg atatacctgc	600
agttgtaact gaggtgcaaa ctttttacga atcaaaattt ttacaagaaa ataaaaaat	660
tacgtacatt agtttttcat taacacctta aaaatcaaga aa atg ctt ctg aac	714
	Met Leu Leu Asn
	1
aaa att tta cta ctt tca ctt tct cta tta aat gtt ggt ctc ttt gca	762
Lys Ile Leu Leu Leu Ser Leu Ser Leu Leu Asn Val Gly Leu Phe Ala	
5 10 15 20	
caa cat tcg cac aaa cta cca aaa gat act ccc aaa agt tac ttt tat	810
Gln His Ser His Lys Leu Pro Lys Asp Thr Pro Lys Ser Tyr Phe Tyr	
25 30 35	
gca acg atg aat gct gat cag gcc gat aaa tta aag gtt tta cat ccc	858
Ala Thr Met Asn Ala Asp Gln Ala Asp Lys Leu Lys Val Leu His Pro	
40 45 50	
aat gat gtt aaa att tta gcc atc aac aaa aat gaa gct gta gtc aac	906
Asn Asp Val Lys Ile Leu Ala Ile Asn Lys Asn Glu Ala Val Val Asn	
55 60 65	
atg agc aat tat gct gct gca gat tta cat caa ttt gta ttg tcg cat	954
Met Ser Asn Tyr Ala Ala Ala Asp Leu His Gln Phe Val Leu Ser His	
70 75 80	
ggt cca ggt ttt ata ctt cat acg gat gaa aaa atc gct aaa aat tat	1002
Gly Pro Gly Phe Ile Leu His Thr Asp Glu Lys Ile Ala Lys Asn Tyr	
85 90 95 100	
tta caa aga cca caa acc aaa act tca agt gtt ctt gat ttt aac att	1050
Leu Gln Arg Pro Gln Thr Lys Thr Ser Ser Val Leu Asp Phe Asn Ile	
105 110 115	
agc gaa gat gaa att gta aaa gat tac atc aca caa gtt aaa gaa gga	1098
Ser Glu Asp Glu Ile Val Lys Asp Tyr Ile Thr Gln Val Lys Glu Gly	
120 125 130	
aac ata caa acg acc ata caa gct tta gaa gca att cat aca cga ttt	1146
Asn Ile Gln Thr Thr Ile Gln Ala Leu Glu Ala Ile His Thr Arg Phe	
135 140 145	
cat ttg tca aac act cga aat gtc ggc atg gaa tac atc aaa aat ttg	1194
His Leu Ser Asn Thr Arg Asn Val Gly Met Glu Tyr Ile Lys Asn Leu	
150 155 160	
tgg caa tcc att att gat gaa tcg gga aga gat gat ttg aaa gtc gag	1242
Trp Gln Ser Ile Ile Asp Glu Ser Gly Arg Asp Asp Leu Lys Val Glu	
165 170 175 180	
ttt tat acc cac aat aac aca cct caa tat tca gtt att ttc acg atc	1290
Phe Tyr Thr His Asn Asn Thr Pro Gln Tyr Ser Val Ile Phe Thr Ile	
185 190 195	
gaa ggc	1296
Glu Gly	
<210> 16	
<211> 22	

29

<212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 16
 gttgtggaaa aggcgaatat ac 22
 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 17
 cttaggttgg attgcttatt tg 22
 <210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 18
 atcaagacca tggttctgaa caaaatttta c 31
 cgccgcatg gcgcgagaac agg 23
 <210> 19
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 19
 gtccataaagg atccgttgtt taatgaatta ag 32
 <210> 20
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 20
 agtgttcca tggtaacat tagcgaagat g 31
 <210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 21
 gctcttggat ccgttttat agacctaaat catc 34

30

【要約】

【課題】 ペプチド性の苦味除去・低減作用を有し、ペプチドやアミノ酸を主成分とする調味液の製造等、食品産業上有用なアミノペプチダーゼの遺伝的情報および大量発現システムを提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列を有

するアミノペプチダーゼ前駆体の遺伝子、プラスミドおよび形質転換大腸菌 (FERM P - 17178)、ならびに、配列表の配列番号 4 記載の塩基配列を有するアミノペプチダーゼの遺伝子、プラスミドおよび形質転換大腸菌。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:20)

識別記号

Z N A

F I