

(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 - 232885

(P 2 0 0 0 - 2 3 2 8 8 5 A)

(43)公開日 平成12年 8月29日 (2000.8.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*]	(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA A	4B024
C07K 14/195		C07K 14/195		4B050
C12N 1/21		C12N 1/21		4B065
9/48		9/48		4H045

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全16頁)

(21)出願番号 特願平11 - 34231

(22)出願日 平成11年 2月12日 (1999.2.12)

(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

(72)発明者 林 清

茨城県土浦市乙戸南 1丁目 5 - 3

(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

ヤスつくば 1 - 303

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外 1名)

最終頁に続く

(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ー並びに形質転換体

(57)【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 (F E R M P - 1 7 1 7 8)、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。

【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 (FERMP-17178)。

【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。

【請求項 6】 請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、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。

【0002】

【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い。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 (FERMP-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 (*Flabovacterium 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、800 bp 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 715 bp 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・アシンメトリック・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プライマー及び非特異的プライマーを用意し、PCRのアニーリング温度を変化的に制御することにより、非特異的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・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、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・ブレブ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・ブレブ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・ブレブ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) 酵素遺伝子の大腸菌における発現請求項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・ブレブ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pFBAPNMC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FERM P-17178である。

【0024】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。

【0025】次に、請求項4記載の本発明のアミノペ

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（FERM P-17178）から得られるプラスミド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PCRの鋳型にプラスミドpFBAPNMCを用いたが、フラボバクテリウム・ブレブT-382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pFBAPM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。

【0026】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。

【0027】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-382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。

【0028】

【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-382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G1005A型（ヒューレットパッカード社製）により、そのN末端のアミノ酸配列（配列表の配列番号3に記載）を決定した。

【0029】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。

【0030】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 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 PCR 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 ロードミン・ターミネーター・サイクルシーケンシング・キット（パーキンエルマー社製）を用いて DNA 塩基配列を解読した。解読した塩基配列の情報をつなぎ合わせて、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 PCR (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、フォワードプライマー 1（配列表の配列番号 7 に記載）、フォワードプライマー 2（配列表の配列番号 8 に記載）、フォワードプライマー 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。

【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）。

【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 16 に記載) とリバースプライマー 4 (配列表の配列番号 17 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 - 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。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、190 番目 ~ 2282 番目の部分の塩基配列が確認された。

【0042】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 113 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 1039 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。

【0043】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、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。

【0044】(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 pQE60 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 DNA 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

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

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、20 mM トリスバッファー (pH 8.5) 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。

【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

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】

10

20

30

40

11 12

<210> 1
 <211> 2521
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 1

cgcaaaaatt taagaatgag aaagataaat cagaagattt gaagaaaata aaaccttcga 60
 taatgtagtg caaccgactc gcaagaaac cataaatgct tttcatttga aaggaaaatg 120
 gcgcgaaaag tttttcaaaa acgataatcc aattgttttg gaattgggtt gtggaaaagg 180
 cgaataact gttgcatgg cgcgtcgaga tgcccatcgt aattttatag gtgttgatat 240
 aaaaggtgca cgattttggc gaggtgcaaa aactgccatc gaagaaggat tgaataatgt 300
 tggttttata cgtacacaaa ttgaattgat tgatcatttg tttgaccaa acgagggtgga 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
 agttgtaact gaggtgcaaa ctttttacga atcaaaaatt ttacaagaaa ataaaaaaat 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

13													14						
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			
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						

15	16
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
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
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
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
actttaggac ataaaaaaaa gaggcataag cctctttttt tatattttata tccaatcaaaa	2265
acttaattta aactctgcaa ataagcaatc caacctaagg tttgttactc ttttgctgcc	2325
gttttgaaat ctaccgctct atataatcca cgaccgacaa tcataaaaatc ggtatggtaa	2385
tttttgaaata caatctctgg cgtattatat tgttgtcctt tgttgtccct 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
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
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
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
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
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
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
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
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

17 18
 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 oga 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
 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

19
 <210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Flavobacterium breve T-382
 <400> 5
 gtatcttggtg twgtatgaat ctttgrrtr tartc 35

20
 <210> 6
 <211> 715
 <212> DNA
 <213> Flavobacterium 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
 20 25 30

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

21 22
 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
 <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

23

24

<223> Designed oligonucleotide based on random sequence.

<400> 13

agwcnagawn acwaaa 16

<210> 14

<211> 1010

<212> DNA

<213> Flabovacterium 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
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

```

25
 ttc tta att cat taa acaacatata ctttaggaca taaaaaaaaag aggcataagc c 726
 Phe Leu Ile His Stop
 225
 tcttttttta tatttatatc caatcaaac ttaatttaa ctctgcaaat aagcaatcca 786
 acctaagggt tggactctt ttgctgccgt ttgaaatct accgctctat ataatccacg 846
 accgacaatc ataaaatcgg tatgtaatt ttgaaatca atctctggcg tattatattg 906
 ttgtcctttg ttgtccctga caccgaaata ttaacacctg gtgtaataa taacaattta 966
 ttaccactt tacgttgcgc tacacacccc caaacatta gggt 1010
 <210> 15
 <211> 1296
 <212> DNA
 <213> Flabovacterium breve T-382
 <400> 15
 cgcaaaaatt taagaatgag aaagataaat cagaagattt gaagaaaata aaaccttcca 60
 taatgtagtg caaccgactc gcgaagaaac cataaatgct ttctatttga aaggaaaatg 120
 gcgcgaaaag ttttcaaaa acgataatcc aattgttttg gaattgggtt gtggaaaagg 180
 cgaatatact gttgcatgg cgcgtcgaga tgccatcgt aattttatag gtgttgatat 240
 aaaagggtgca cgattttggc gaggtgcaaa aactgccatc gaagaaggat tgaataatgt 300
 tggttttata cgtacacaaa ttgaattgat tgatcatttg ttgacacaaa acgagggtgga 360
 cgaatttgg attacttttc cagatccaca aatcaaattt agacgtacca aacaccgttt 420
 gactcaccca gattttttga atcgatagc taaaatttta aaaccagaag gaactgttaa 480
 ttgaaaacc gattcagaat tttfacatgg ctatacacat ggtgttatac agcttttagg 540
 tcacaaagtt ttgaaatcat cacatgacgt ttaccatcca gatcgtgctg atatacctgc 600
 agttgtaact gaggtgcaaa ctttttacga atcaaaaatt ttacaagaaa ataaaaaaaa 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

27

28

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
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 16
gttgtggaaa aggcaatat ac 22
<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 17
cttaggttg attgcttatt tg 22
<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 18
atcaagacca tggttctgaa caaaatttta c 31
cgccgcatg gcgcgagaac agg 23
<210> 19
<211> 32
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 19
gtcctaaagg atccgttggt taatgaatta ag 32
<210> 20
<211> 31
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382
<400> 20
agtgttcca tggtaacat tagcgaagat g 31
<210> 21
<211> 34
<212> DNA
<213> Flavobacterium breve T-382

29

30

<400> 21

gctcttggat ccgttttat agacctaaat catc 34

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA05 BA14 BA80 CA03 DA06

EA04 GA11

4B050 CC03 CC06 DD02 LL02

4B065 AA26X AA27Y AB01 AC14

BA02 CA24 CA33 CA41

4H045 AA50 BA10 CA11 DA89 EA01

FA72 FA74 HA05