(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3559609号
(P3559609)
(45)発行日　平成16年9月2日(2004.9.2)　(24)登録日　平成16年5月28日(2004.5.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 9/24	C12N	9/24	
C12P 19/14	C12P	19/14	Z
// C12N 1/21	C12N	15/00	ZNAA
C12N 15/09	C12N	1/21	
(C12N 1/21	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 22　(全 47 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-72533
(22)出願日　平成7年3月7日(1995.3.7)
(65)公開番号　特開平7-298880
(43)公開日　平成7年11月14日(1995.11.14)
審査請求日　平成13年3月6日(2001.3.6)
(31)優先権主張番号　特願平6-59834
(32)優先日　平成6年3月7日(1994.3.7)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

微生物の受託番号　FERM BP-4130
微生物の受託番号　FERM BP-4316

前置審査

(73)特許権者　000155908
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井１丁目２番３号
(72)発明者　久保田　倫夫
大阪府茨木市主原町１２番６号
(72)発明者　津▲さき▼　桂二
岡山県倉敷市福田町古新田４７２番地
(72)発明者　服部　和子
岡山県邑久郡牛窓町牛窓３８４９番地
(72)発明者　杉本　利行
岡山県岡山市東畦６９５番４４号

審査官　鈴木　恵理子

(56)参考文献　特開平０７－２１３２８３（ＪＰ，Ａ）
最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換え型酵素とその製造方法並びに用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離し、かつ、配列表における配列番号１又は２のアミノ酸配列か、配列表における配列番号１又は２のアミノ酸配列において、１個又は２個以上のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有する組換え型酵素をコードするＤＮＡと自律複製可能なベクターを含む組換えＤＮＡを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法。
【請求項２】
ＤＮＡが、配列表における配列番号３又は４の塩基配列か、配列表における配列番号３又は４の塩基配列において、コードする酵素の酵素活性を実質的に変えることなく、１個又は２個以上の塩基が置換、欠失、若しくは付加した塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項１に記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項３】
ＤＮＡが配列表における配列番号５又は６に示す塩基配列を有する請求項１又は２に記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項４】
ＤＮＡがリゾビウム属又はアルスロバクター属の微生物に由来する請求項１乃至３のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項５】

宿主が大腸菌である請求項１乃至４のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項６】
自律複製可能なベクターがプラスミドベクターＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）である請求項１乃至５のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項７】
形質転換体を炭素源及び窒素源を含むｐＨ２乃至８の液体培地に植菌し、温度２５乃至６５℃で１乃至６日間培養する請求項１乃至６のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項８】
培養物中の組換え型酵素を遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項１乃至７のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法。
【請求項９】
末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質に請求項１乃至８のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法によって得られる組換え型酵素を作用させて該非還元性糖質からトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元性糖質の変換方法。
【請求項１０】
非還元性糖質の濃度が５０％（ｗ／ｗ）以下の水溶液中に組換え酵素を共存せしめ、温度４０乃至５５℃、ｐＨ５乃至１０で作用させることを特徴とする請求項９に記載の非還元性糖質の変換方法。
【請求項１１】
非還元性糖質がα－グルコシルトレハロース、α－マルトシルトレハロース、α－マルトトリオシルトレハロース、α－マルトテトラオシルトレハロース又はα－マルトペンタオシルトレハロースである請求項９又は１０に記載の非還元性糖質の変換方法。
【請求項１２】
末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質に請求項１乃至８のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法によって得られる組換え型酵素を作用させてトレハロースを生成させる工程を含んでなるトレハロースの製造方法。
【請求項１３】
非還元性糖質が、グルコース重合度３以上の還元性澱粉糖に、非還元性糖質生成酵素を作用させて得られたものである、請求項１２に記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１４】
還元性澱粉糖が、澱粉又は澱粉質を酸及び／又は酵素により加水分解して得られたものである請求項１３に記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１５】
酵素が、アミラーゼ及び／又は澱粉枝切酵素である請求項１４に記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１６】
澱粉枝切酵素が、プルラナーゼ又はイソアミラーゼであることを特徴とする請求項１５に記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１７】
還元性澱粉糖が、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオースである請求項１３乃至１６のいずれかに記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１８】
還元性澱粉糖が、グルコース重合度３以上のマルトオリゴ糖の１種又は２種以上からなることを特徴とする請求項１３乃至１７のいずれかに記載のトレハロースの製造方法。
【請求項１９】

還元性澱粉糖が、濃度が５０％（ｗ／ｗ）以下の還元性澱粉糖水溶液である請求項１３乃至１８のいずれかに記載のトレハロースの製造方法。
【請求項２０】
非還元性糖質が、グルコース重合度３以上の還元性澱粉糖に、非還元性糖質生成酵素を、温度４０乃至５５℃、ｐＨ５乃至１０で作用させて得られたものである請求項１２乃至１９のいずれかに記載のトレハロースの製造方法。
【請求項２１】
非還元性糖質が、α－グルコシルトレハロース、α－マルトシルトレハロース、α－マルトトリオシルトレハロース、α－マルトテトラオシルトレハロース又はα－マルトペンタオシルトレハロースである請求項１２乃至２０のいずれかに記載のトレハロースの製造方法。
【請求項２２】
請求項１乃至８のいずれかに記載の組換え型酵素の製造方法によって得られる組換え型酵素と、非還元性糖質生成酵素及び／又はグルコアミラーゼとを組み合わせて用いることを特徴とするトレハロースの製造方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型酵素と、その製造方法並びに用途に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】
トレハロースは、グルコース２分子が還元性基同士結合した二糖類であり、天然には細菌、真菌、藻類、昆虫などに微量存在する。トレハロースは分子中に還元性基を持たないので、アミノ酸類の存在下で加熱しても褐変反応を起こすことがなく、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできる利点がある。しかしながら、従来の製造方法では所望量を入手するのが難しく、実際に飲食物の甘味付けに使われることは殆どなかった。
【０００３】
これまでの製造方法は、微生物の菌体を利用する方法と、糖質に複合酵素系を作用させる方法とに大別される。前者の方法は、特開昭５０－１５４４８５号公報などにも見られるように、細菌、酵母などの微生物を栄養培地で増殖させ、培養物中の菌体からトレハロースを採取するものである。一方、後者の方法は、特開昭５８－２１６６９５号公報などにも見られるように、基質にマルトースを使用し、これにマルトース・フォスフォリラーゼとトレハロース・フォスフォリラーゼからなる複合酵素系を作用させ、生成したトレハロースを系外に取出すものである。前者の方法は、微生物そのものの増殖は比較的容易なものの、トレハロースを菌体から採取するのに一連の繁雑な工程を要し、しかも、菌体に含まれるトレハロースが１５％（ｗ／ｗ）と僅少であるという問題があった。後者の方法は、トレハロースそのものの分離は比較的容易なものの、反応自体が２種類の酵素による平衡反応であり、しかも、その平衡が常時グルコース燐酸側に傾いていることから、基質を高濃度にして反応させ、トレハロースの収量を上げることが原理的に難しかった。
【０００４】
斯かる状況に鑑み、本発明者が、澱粉糖からトレハロース構造を有する糖質を生成する酵素につき鋭意検索したところ、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１やアルスロバクター・スピーシーズＱ３６などの微生物がグルコース重合度３以上の還元性澱粉糖から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成するという、従来未知の全く新規な酵素を産生することが判明した。この知見とあい前後して、この非還元性糖質は、同じくリゾビウム・スピーシーズＭ－１１やアルスロバクター・スピーシーズＱ３６などが産生する別の酵素により、ほぼ定量的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖に加水分解されることが判明した。これら酵素を併用することにより、澱粉を原料に所望量のトレ

ハロースが比較的容易に得られることとなり、トレハロースに係わる前記課題は悉く解決されていくものと期待される。しかしながら、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１もアルスロバクター・スピーシーズＱ３６もこれら酵素の産生能が充分でなく、トレハロースや末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を大規模に製造しようとすると、微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

【０００５】

一方、昨今の組換えＤＮＡ技術の進歩には目覚しいものがある。今日では、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードするＤＮＡを含む組換えＤＮＡを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、両酵素をコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

【０００６】

【発明が解決しようとする課題】

この発明の目的は、組換えＤＮＡ技術を応用して斯かる酵素を創製することにある。

【０００７】

この発明の別の目的は、その創製された酵素の製造方法を提供することにある。

【０００８】

この発明のさらに別の目的は、その創製された酵素を使用する末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質の変換方法を提供することにある。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

この発明は、前記第一の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する組換え型酵素により解決するものである。

【００１０】

この発明は、前記第二の課題を、その組換え型酵素を産生する形質転換体を培養し、培養物から組換え型酵素を採取する組換え型酵素の製造方法により解決するものである。

【００１１】

この発明は、前記第三の課題を、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質にその組換え型酵素を作用させて該非還元性糖質からトレハロースを遊離させる工程を含んでなる非還元糖質の変換方法により解決するものである。

【００１２】

【作用】

この発明による組換え型酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質に作用してトレハロースを遊離する。

【００１３】

この発明の製造方法にしたがって形質転換体を培養すれば、所望量の組換え型酵素が比較的容易に得られる。

【００１４】

この発明の変換方法により、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質は、トレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換される。

【００１５】

この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する、従来未知の全く新規な酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素はリゾビウム・スピーシーズＭ－１１やアルスロバクター・スピーシーズＱ３６の培養物から得ることができ、本発明者がカラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの酵素を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質はポリペプチドであり、次のような理化学的性質を有することが判明した。

（１）　作用

末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する。
（２）　分子量
約５７，０００乃至６８，０００ダルトン（ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動）
（３）　等電点
約３．３乃至４．６（等電点電気泳動）
（４）　至適温度
ｐＨ７．０で３０分間インキュベートすると、３５乃至４５℃付近に至適温度を示す。
（５）　至適ｐＨ
４０℃で３０分間インキュベートすると、ｐＨ６．０乃至７．５付近に至適ｐＨを示す。
（６）　熱安定性
ｐＨ７．０で６０分間インキュベートすると、３０乃至４５℃付近まで安定である。
（７）　ｐＨ安定性
２５℃で１６時間インキュベートすると、ｐＨ５．５乃至１０．０付近まで安定である。
【００１６】
次に、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１又はアルスロバクター・スピーシーズＱ３６が産生する酵素（以下、それぞれ「酵素Ｍ－１１」又は「酵素Ｑ３６」と言う。）の理化学的性質を解明すべく行なった実験について説明する。
【００１７】
【実験例１　酵素の精製】
【００１８】
【実験例１－１　酵素Ｍ－１１の精製】
５００ｍｌ容三角フラスコに松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス＃４』２．０％（ｗ／ｖ）、ペプトン０．５％（ｗ／ｖ）、酵母エキス０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸水素二ナトリウム０．１％（ｗ／ｖ）及び燐酸二水素カリウム０．１％（ｗ／ｖ）を含む液体培地（ｐＨ７．０）を１００ｍｌずつとり、１２０℃で２０分間オートクレーブして滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地にリゾビウム・スピーシーズＭ－１１を植菌し、回転振盪下、２７℃で２４時間種培養した。別途、３０ｌ容ジャーファーメンタに上記と同組成の液体培地を２０ｌとり、滅菌後、上記で得た種培養液を１％（ｖ／ｖ）接種し、液体培地をｐＨ６乃至８に保ちつつ、３０℃で２４時間通気撹拌培養した。
【００１９】
次に、上記で得た培養物約１８ｌを超高圧菌体破砕装置にとり、菌体を破砕後、遠心分離により採取した上清約１６ｌに硫酸アンモニウムを２０％飽和になるように加え、４℃で１時間静置後、遠心分離により沈澱部を除去した。得られた上清に６０％飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、４℃で２４時間静置後、沈澱部を遠心分離により採取し、最少量の１０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）に溶解し、１０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）に対して２４時間透析後、遠心分離により不溶物を除去した。得られた上清を予め１０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）により平衡化させておいた東ソー製イオン交換クロマトグラフィー用カラム『ＤＥＡＥ－トヨパール』に負荷し、０Ｍから０．５Ｍに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに１０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）を通液した。溶出液より酵素を含む画分を採取し、２Ｍ硫酸アンモニウムを含む５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）に対して１０時間透析後、遠心分離により不溶物を除去した。その後、上清を予め２Ｍ硫酸アンモニウムを含む５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）により平衡化させておいた東ソー製疎水クロマトグラフィー用カラム『ブチルトヨパール』に負荷し、２Ｍから０Ｍに低下する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、カラムに５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）を通液した。溶出液から酵素を含む画分を採取し、予め５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）により平衡化させておいた東ソー製ゲル濾過カラムクロマトグラフィー用カラム『トヨパールＨＷ－５５』に負荷し、カラムに５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）を通液し、溶出液から酵素を含む画分を採取した。このようにして精製した酵素Ｍ－１１の比活性は約２４０単位／ｍｇ蛋白質であり、収量は培養物１ｌ当たり約６５０単位であった。

【００２０】
なお、この発明を通じて、酵素の活性は次の方法により測定した活性値（単位）で表示する。すなわち、α－マルトトリオシルトレハロースを１．２５％（ｗ／ｖ）含む５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）を４ｍｌとり、これに酵素液を１ｍｌ加え、４０℃で３０分間インキュベートして反応させる。そして、反応液を１ｍｌとり、ソモギ銅液２ｍｌに加えて反応を停止させた後、ソモギ・ネルソン法により還元力を測定する。対照には、予め１００℃で１０分間加熱して失活させた酵素を上記と同様に処理する。当該酵素の１単位とは、上記条件下において、１分間に１μｍｏｌのグルコースに相当する還元力を増加させる酵素の量と定義する。
【００２１】
【実験例１－２　酵素Ｑ３６の精製】
実験例１－１と同様にアルスロバクター・スピーシーズＱ３６を培養し、培養物を処理したところ、比活性約４５０単位／ｍｇ蛋白質の精製酵素Ｑ３６が、培養物１ｌ当たり、約６５０単位の収量で得られた。
【００２２】
【実験例２　酵素の理化学的性質】
【００２３】
【実験例２－１　作用】
特開平７－１４３８７６号公報（特願平５－３４９２１６号明細書）に開示された方法により、α－グルコシルトレハロース、α－マルトシルトレハロース、α－マルトトリオシルトレハロース、α－マルトテトラオシルトレハロース又はα－マルトペンタオシルトレハロースを固形分当たり９８％以上含む非還元性糖質を調製した。そして、そのいずれかを基質として５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）に濃度２０％（ｗ／ｖ）になるように溶解し、溶液に実験例１で得た精製酵素Ｍ－１１又は酵素Ｑ３６を基質１ｇ当たり２単位加え、４０℃で４８時間反応させた。常法により反応物を脱塩した後、和光純薬製高速液体クロマトグラフィー用カラム『ＷＢ－Ｔ－３３０』に負荷し、溶出液の糖濃度を東ソー製示差屈折計『ＲＩ－８０１２型』でモニターしながら、室温下にてカラムに蒸留水を０．５ｍｌ／分の流速で通液することにより、反応物に含まれる糖質を分離した。別途、非還元性糖質に代えて高純度のマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースのいずれかを含む水溶液を上記と同様に処理し、処理物を分析して対照とした。表１及び表２に、それぞれ、Ｍ－１１及びＱ３６を加えた場合の基質並びに反応物の糖組成を示す。
【００２４】
【表１】

基　　質	反応物中の糖質	糖組成(%)
α－グルコシルトレハロース	トレハロース	17.5
	グルコース	6.5
	α－グルコシルトレハロース	76.0
α－マルトシルトレハロース	トレハロース	44.3
	マルトース	44.4
	α－マルトシルトレハロース	11.3
α－マルトトリオシルトレハロース	トレハロース	39.5
	マルトトリオース	60.0
	α－マルトトリオシルトレハロース	0.5
α－マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	34.2
	マルトテトラオース	65.5
	α－マルトテトラオシルトレハロース	0.3
α－マルトペンタオシルトレハロース	トレハロース	29.1
	マルトペンタオース	70.6
	α－マルトペンタオシルトレハロース	0.3
マルトトリオース	マルトトリオース	100.0
マルトテトラオース	マルトテトラオース	100.0
マルトペンタオース	マルトペンタオース	100.0
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	100.0
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	100.0

【００２５】
【表２】

基　　質	反応物中の糖質	糖組成(%)
α－グルコシルトレハロース	トレハロース	19.3
	グルコース	10.2
	α－グルコシルトレハロース	70.5
α－マルトシルトレハロース	トレハロース	44.5
	マルトース	44.4
	α－マルトシルトレハロース	11.1
α－マルトトリオシルトレハロース	トレハロース	38.8
	マルトトリオース	60.7
	α－マルトトリオシルトレハロース	0.5
α－マルトテトラオシルトレハロース	トレハロース	34.1
	マルトテトラオース	65.7
	α－マルトテトラオシルトレハロース	0.2
α－マルトペンタオシルトレハロース	トレハロース	29.3
	マルトペンタオース	70.4
	α－マルトペンタオシルトレハロース	0.3
マルトトリオース	マルトトリオース	100.0
マルトテトラオース	マルトテトラオース	100.0
マルトペンタオース	マルトペンタオース	100.0
マルトヘキサオース	マルトヘキサオース	100.0
マルトヘプタオース	マルトヘプタオース	100.0

【００２６】
表１及び表２に示すように、酵素Ｍ－１１及び酵素Ｑ３６は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースとグルコース又はマルトオリゴ糖をほぼ定量的に遊離した。一方、グルコース重合度３以上のマルトオリゴ糖を基質にすると、両酵素とも全く作用を示さなかった。これらの事実は、当該酵素が末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質に選択的に作用し、そのトレハロース残基とグリコシル残基間のグリコシド結合を特異的に加水分解することを示唆している。斯かる酵素作用は未だ報告されておらず、全く新規な作用機序を辿るものと推定される。
【００２７】
【実験例２－２　分子量】
ユー・ケー・レムリが『ネーチャー』、第２２７巻、第６８０～６８５頁（１９７０年）に報告している方法に準じて精製酵素をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、酵素Ｍ－１１、酵素Ｑ３６とも、分子量約５７，０００乃至６８，０００ダルトンに相当する位置に単一バンドを示した。なお、このときの分子量マーカは、ミオシン（２

００，０００ダルトン）、β－ガラクトシダーゼ（１１６，２５０ダルトン）、フォスフォリラーゼＢ（９７，４００ダルトン）、血清アルブミン（６６，２００ダルトン）及びオボアルブミン（４５，０００ダルトン）であった。

【００２８】

【実験例２－３　等電点】

等電点電気泳動法により測定したところ、酵素Ｍ－１１、酵素Ｑ３６とも、約３．３乃至４．６に等電点を示した。

【００２９】

【実験例２－４　至適温度】

常法により、５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）中で３０分間インキュベートする条件で試験したところ、図１又は図２に示すように、酵素Ｍ－１１、酵素Ｑ３６とも、３５乃至４５℃付近に至適温度を示した。

【００３０】

【実験例２－５　至適ｐＨ】

常法により、ｐＨの相違する５０ｍＭ酢酸緩衝液、燐酸緩衝液又は炭酸ナトリウム－炭酸水素ナトリウム緩衝液中、４０℃で３０分間インキュベートする条件で試験したところ、図３又は図４に示すように、酵素Ｍ－１１、酵素Ｑ３６とも、ｐＨ６．０乃至７．５付近に至適ｐＨを示した。

【００３１】

【実験例２－６　熱安定性】

常法により、５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）中で６０分間インキュベートする条件で試験したところ、図５又は図６に示すように、酵素Ｍ－１１、酵素Ｑ３６とも、３０乃至４５℃付近まで安定であった。

【００３２】

【実験例２－７　ｐＨ安定性】

常法により、ｐＨの相違する５０ｍＭ酢酸緩衝液、燐酸緩衝液又は炭酸ナトリウム－炭酸水素ナトリウム緩衝液中、２５℃で１６時間インキュベートする条件で試験したところ、図７又は図８に示すように、酵素Ｍ－１１、酵素Ｑ３６とも、ｐＨ５．５乃至１０．０付近まで安定であった。

【００３３】

【実験例２－８　Ｎ末端アミノ酸配列】

常法により、アプライッド・バイオシステム製気相プロテイン・シーケンサ『４７０Ａ型』を使用して分析したところ、酵素Ｍ－１１は、Ｎ末端に配列表における配列番号７に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【００３４】

同様に分析したところ、酵素Ｑ３６は、Ｎ末端に配列表における配列番号８に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【００３５】

【実験例２－９　部分アミノ酸配列】

実験例１－１で得た精製酵素Ｍ－１１を適量とり、１０ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ９．０）に対して４℃で１８時間透析後、１０ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ９．０）を加えて酵素濃度を約１ｍｇ／ｍｌとした。この溶液を約１ｍｌとり、リジルエンドペプチダーゼを１０μｇ加え、３０℃で２２時間インキュベートして酵素を部分加水分解した。加水分解物を、予め１６％（ｖ／ｖ）水性アセトニトリルを含む０．１％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸により平衡化させておいた資生堂製逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム『カプセルパックＣ１８』に負荷し、１６％（ｖ／ｖ）から６４％（ｖ／ｖ）に上昇するアセトニトリルの濃度勾配下、カラムに０．１％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸を０．９ｍｌ／分の流速で通液した。そして、通液開始から約４３分後又は約５７分後に溶出したペプチド断片（以下、それぞれ「ペプチド断片Ａ」又は「ペプチド断片Ｂ」と言う。）を含む画分を採取し、真空乾燥後、５０％（ｖ／ｖ）水性アセトニトリルを含む０．１％（ｖ

／ｖ）トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、実験例２－８と同様に分析したところ、ペプチド断片Ａ及びＢは、配列表における配列番号９及び１０に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【００３６】

別途、実験例１－２で得た精製酵素Ｑ３６を上記と同様にして部分加水分解し、予め２４％（ｖ／ｖ）水性アセトニトリルを含む０．１％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸により平衡化させておいた日本ミリポア・リミテッド製逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンダパックＣ１８』に負荷し、２４％（ｖ／ｖ）から４４％（ｖ／ｖ）に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに０．１％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸を０．９ｍｌ／分の流速で通液した。そして、通液開始から約４分後又は約２４分後に溶出したペプチド断片（以下、それぞれ「ペプチド断片Ｃ」又は「ペプチド断片Ｄ」と言う。）を含む画分を採取し、真空乾燥後、５０％（ｖ／ｖ）水性アセトニトリルを含む０．１％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸に溶解した。以後、上記と同様に分析したところ、ペプチド断片Ｃ及びＤは、配列表における配列番号１１及び１２に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【００３７】

以上のような理化学的性質を有する酵素は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。なお、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１は岡山県岡山市の土壌から分離され、平成４年１２月２４日以降、茨城県つくば市東１丁目１番３号にある通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託番号『ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０』で寄託されている。一方、アルスロバクター・スピーシーズＱ３６は岡山県総社市の土壌から分離されたものであり、平成５年６月３日以降、同センターに寄託番号『ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６』で寄託されている。特開平７－２１３２８３号公報（特願平５－３４０３４３号明細書）には、酵素の性質・性状とともに、両微生物の菌学的性質が詳細に開示されている。

【００３９】

そこで、本発明者が、実験例２－８又は２－９で明らかにした酵素Ｍ－１１の部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１の染色体ＤＮＡを鋭意検索したところ、配列表における配列番号３に示す塩基配列を有する１，７６７塩基対からなるＤＮＡ断片が得られた。そして、その塩基配列を解読したところ、酵素Ｍ－１１は５８９個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号１に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【００４０】

一方、酵素Ｑ３６の部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにし、アルスロバクター・スピーシーズＱ３６の染色体ＤＮＡを同様に検索したところ、配列表における配列番号４に示す塩基配列を有する１，７９１塩基対からなるＤＮＡ断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、酵素Ｑ３６は５９７個のアミノ酸からなり、配列表における配列番号２に示すアミノ酸配列を有していることが判明した。

【００４１】

配列表における配列番号１乃至４に示す塩基配列及びアミノ酸配列を解明するに到った一連の工程を要約すると、次のようになる。

（１）　供与体微生物の培養物から当該酵素を分離し、高度に精製した。精製酵素をプロテアーゼにより部分加水分解後、加水分解物より２種類のペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

（２）　　別途、供与体微生物の菌体より染色体ＤＮＡを分離し、精製後、制限酵素により部分的に切断した約２，０００乃至６，０００塩基対からなるＤＮＡ断片を採取した。ＤＮＡリガーゼにより、このＤＮＡ断片を予め制限酵素で切断しておいたプラスミドベクターに連結し、組換えＤＮＡを作製した。

（３）　　大腸菌に組換えＤＮＡを導入して形質転換体を作製し、前記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするコロニーハイブリダイゼーシ

ョンにより当該酵素をコードするＤＮＡを含む形質転換体を選択した。
（４）　形質転換体から組換えＤＮＡを採取し、プライマーとともにアニーリング後、ＤＮＡポリメラーゼを作用させてプライマーを伸長し、得られた相補鎖ＤＮＡをジデオキシ・チェーン・ターミネータ法により分析して塩基配列を決定した。そして、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列とを比較し、その塩基配列が当該酵素をコードしていることを確認した。
【００４２】
次の実験例３乃至６では、上記の工程（２）乃至（４）を具体的に説明するが、これら実験例で用いる手法自体は斯界において公知のものであり、例えば、ジェー・サムブルック等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、第２版、１９８９年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス発行などにも詳述されている。
【００４３】
【実験例３　リゾビウム・スピーシーズＭ－１１由来のＤＮＡを含む組換えＤＮＡと形質転換体の調製】
【００４４】
【実験例３－１　染色体ＤＮＡの調製】
リゾビウム・スピーシーズＭ－１１をバクト・ニュートリエント・ブロス培地（ｐＨ７．０）に植菌し、２７℃で２４時間回転振盪培養した。遠心分離により培養物から菌体を分離し、ＴＥＳ緩衝液（ｐＨ８．０）に浮遊させ、リゾチームを０．０５％（ｗ／ｖ）加えた後、３７℃で３０分間インキュベートした。処理物を－８０℃で１時間凍結後、ＴＳＳ緩衝液（ｐＨ９．０）を加えて６０℃に加温し、ＴＥＳ緩衝液／フェノール混液を加え、氷冷後、遠心分離により上清を採取した。この上清に２倍容の冷エタノールを加え、沈澱した粗染色体ＤＮＡを採取し、ＳＳＣ緩衝液（ｐＨ７．１）に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテアーゼをそれぞれ７．５μｇ又は１２５μｇ加え、３７℃で１時間インキュベートして反応させた。その後、反応物にクロロフォルム／イソアミルアルコール混液を加えて染色体ＤＮＡを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体ＤＮＡを含む沈澱を採取した。このようにして得た精製染色体ＤＮＡを濃度約１ｍｇ／ｍｌになるようにＳＳＣ緩衝液（ｐＨ７．１）に溶解し、溶液を－８０℃で凍結した。
【００４５】
【実験例３－２　組換えＤＮＡ　ｐＢＭＵ２７と形質転換体ＢＭＵ２７の調製】
実験例３－１で得た精製染色体ＤＮＡ溶液を約１ｍｌとり、これに制限酵素Ｓａｕ　３ＡＩを約３５単位加え、３７℃で約２０分間反応させて染色体ＤＮＡを部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約２，０００乃至６，０００塩基対からなるＤＮＡ断片を採取した。別途、プラスミドベクターＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）を１μｇとり、常法により制限酵素Ｂａｍ　ＨＩを作用させて完全に切断した後、上記で得たＤＮＡ断片１０μｇとＴ４　ＤＮＡリガーゼを２単位加え、４℃で一夜静置することによりＤＮＡ断片をベクター断片に連結した。そして、得られた組換えＤＮＡに東洋紡績製コンピテントセル『Ｅｐｉｃｕｒｉａｎ　Ｃｏｌｉ　ＸＬＩ－Ｂｌｕｅ』を３０μｌ加え、氷冷下に３０分間静置後、４２℃に加温し、ＳＯＣブロスを加えて３７℃で１時間インキュベートすることにより、組換えＤＮＡを大腸菌に導入した。
【００４６】
上記で得た形質転換体を５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－ガラクトシド５０μｇ／ｍｌを含む寒天平板培地（ｐＨ７．０）に植菌し、３７℃で１８時間培養後、培地上にナイロン膜を載置し、培地上に形成された約６，０００個のコロニーをナイロン膜上に固定した。別途、常法により、配列表における配列番号９に示すアミノ酸配列における第８乃至１３番目のＰｈｅ－Ａｓｐ－Ｉｌｅ－Ｔｒｐ－Ａｌａ－Ｐｒｏで表される配列に基づき５′－ＴＴＹＧＡＹＡＴＨＴＧＧＧＣＮＣＣ－３′で表される塩基配列のプローブ１を化学合成し、同位体^{32}Ｐで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダイズさせ、顕著な会合が認められた１４種類の形質転換体を選択した

。

【００４７】

その後、常法により、これら１４種類の形質転換体から組換えＤＮＡを採取し、配列表における配列番号１０に示すアミノ酸配列における第２乃至６番目のＡｓｐ－Ｔｒｐ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｌａで表される配列に基づき化学合成した５′－ＧＡＹＴＧＧＧＣＮＧＡＲＧＣ－３′で表される塩基配列のプローブ２をイー・エム・サザーン『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第９８巻、第５０３～５１７頁（１９７５年）に記載されている方法に準じてハイブリダイズさせ、プローブ２と顕著な会合を示した組換えＤＮＡを選択した。以上のようにして選択した組換えＤＮＡと形質転換体を、それぞれ、『ｐＢＭＵ２７』又は『ＢＭＵ２７』と命名した。

【００４８】

上記で得た形質転換体ＢＭＵ２７をアンピシリン１００μｇ／ｍｌを含むＬ－ブロス培地（ｐＨ７．０）に植菌し、３７℃で２４時間回転振盪培養した。培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常一般のアルカリ法により組換えＤＮＡを菌体外に溶出させた。処理物を常法により精製し、分析したところ、組換えＤＮＡ　ｐＢＭＵ２７は約５，７００塩基対からなり、図９に示す制限酵素地図で表される構造を有していた。図９に示すように、酵素Ｍ－１１をコードする１，７６７塩基対からなるＤＮＡは、制限酵素Ｅｃｏ　ＲＶによる切断部位付近の下流に位置していることが判明した。

【００４９】

【実験例３－３　形質転換体ＢＭＵ２７による酵素の産生】

松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス＃４』２．０％（ｗ／ｖ）、ペプトン０．５％（ｗ／ｖ）、酵母エキス０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸水素二ナトリウム０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸二水素カリウム０．１％（ｗ／ｖ）を含む液体培地をｐＨ７．０に調整し、アンピシリンを５０μｇ／ｍｌ加え、１２０℃で２０分間加熱滅菌し、冷却後、実験例３－２で得た形質転換体ＢＭＵ２７を植菌し、３７℃で２４時間回転振盪培養した。培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物１ｌ当たりに換算して、約４，０００単位の酵素が産生していた。

【００５０】

別途、対照として、大腸菌ＸＬＩ－Ｂｌｕｅ株及びリゾビウム・スピーシーズＭ－１１をアンピシリン無含有の同じ組成の液体培地に植菌し、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１の場合、培養温度を３０℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の活性を測定したところ、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１による酵素の産生は培養物１ｌ当たり約２，０００単位と、形質転換体ＢＭＵ２７と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌ＸＬＩ－Ｂｌｕｅ株は、当該酵素を全く産生しなかった。

【００５１】

その後、形質転換体ＢＭＵ２７が産生した酵素を実験例１－１と同様に精製し、その性質・性状を調べたところ、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量値約５７，０００乃至６８，０００ダルトンを、また、等電点電気泳動で約３．３乃至４．６に等電点を示すなど、酵素Ｍ－１１と同様の理化学的性質を有することが判明した。このことは、組換えＤＮＡ技術によっても当該酵素を製造でき、且つ、酵素の生産性も有意に向上することを示唆している。

【００５２】

【実験例４　リゾビウム・スピーシーズＭ－１１に由来する相補鎖ＤＮＡの調製とその塩基配列、アミノ酸配列の決定】

実験例３－２で得た組換えＤＮＡ　ｐＢＭＵ２７を、常法に従って、各種制限酵素で分解し、Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）にサブクローニングして、塩基配列決定用ＤＮＡとした。これら塩基配列決定用ＤＮＡを２μｇとり、これに２Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加えて変性させた後、適量の冷エタノールを加え、生成したテンプレートＤＮＡを含む沈澱を採取し、真空乾燥した。このテンプレートＤＮＡに化学合成した５′－ＧＴＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴ－３′で表される塩基配列のプライマー１を５０ｐｍｏ

ｌ／ｍｌと、２０ｍＭ塩化マグネシウムと２０ｍＭ塩化ナトリウムを含む４０ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）を１０μｌ加え、６５℃で２分間インキュベートしてアニーリングした後、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ及びｄＴＴＰをそれぞれ７．５μＭ含む水溶液を２μｌと、［α－^{32}Ｐ］ｄＣＴＰ（２ｍＣｉ／ｍｌ）を０．５μｌと、０．１Ｍジチオスレイトールを１μｌと、１．５単位／ｍｌのＴ７　ＤＮＡポリメラーゼを２μｌ加え、２５℃で５分間インキュベートすることによりプライマー１を５′末端から３′末端に向かって伸長させ、相補鎖ＤＮＡを生成させた。

【００５３】

次に、上記で得た相補鎖ＤＮＡを含む反応物を四等分し、それぞれにｄｄＡＴＰ、ｄｄＣＴＰ、ｄｄＧＴＰ及びｄｄＴＴＰのいずれかを８μＭと８０μＭ　ｄＮＴＰを含む５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液を２．５μｌ加え、３７℃で５分間インキュベートして反応させ、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％（ｗ／ｖ）ブロムフェノールブルー及び０．０５％（ｗ／ｖ）キシレンシアノールを含む９８％（ｖ／ｖ）水性ホルムアミド溶液を４μｌ加えて反応を停止させた。反応物を沸騰水溶中で３分間加熱後、６％（ｗ／ｖ）ポリアクリルアミドゲル上にとり、約２，０００Ｖの定電圧を印加しながら電気泳動してＤＮＡ断片を分離し、次いで、常法によりゲルを固定し、乾燥させた後、オートラジオグラフィーした。

【００５４】

ラジオグラム上に分離したＤＮＡ断片を解析した結果、相補鎖ＤＮＡは配列表における配列番号５に示す２，１６１塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列表における配列番号５に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号７、９又は１０に示す酵素Ｍ－１１のＮ末端アミノ酸配列、部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号７のＮ末端アミノ酸配列は配列表における配列番号５における第８乃至２７番目の配列に、また、配列番号９又は１０の部分アミノ酸配列は配列表における配列番号５における第１０乃至３０番目又は第４９３乃至５０９番目の配列に一致した。これは、酵素Ｍ－１１が配列表における配列番号１に示すアミノ酸配列を有するものであり、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１においては、酵素Ｍ－１１が配列表における配列番号３に示す塩基配列のＤＮＡによりコードされていることを示している。

【００５５】

【実験例５　アルスロバクター・スピーシーズＱ３６由来のＤＮＡを含む組換えＤＮＡと形質転換体の調製】

【００５６】

【実験例５－１　染色体ＤＮＡの調製】

実験例３－１と同様にしてアルスロバクター・スピーシーズＱ３６から染色体ＤＮＡを分離・精製し、濃度約１ｍｇ／ｍｌになるようにＳＳＣ緩衝液（ｐＨ７．１）に溶解し、－８０℃で凍結した。

【００５７】

【実験例５－２　組換えＤＮＡ　ｐＢＲＴ３２と形質転換体ＢＲＴ３２の調製】

実験例５－１で得た精製染色体ＤＮＡ溶液を実験例３－２と同様に部分切断した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約２，０００乃至６，０００塩基対からなるＤＮＡ断片を採取した。その後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを使用し、このＤＮＡ断片を実験例３－２と同様に制限酵素Ｂａｍ　ＨＩによるベクターＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）の消化物に連結し、得られた組換えＤＮＡを大腸菌ＸＬＩ－Ｂｌｕｅ株に導入した。得られた形質転換体を実験例３－２と同様に５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－ガラクトシドを含む寒天平板培地で培養し、生成した約５，０００個のコロニーをナイロン膜上に固定する一方、配列表における配列番号１１に示すアミノ酸配列における第５乃至１０番目のＭｅｔ－Ｇｌｙ－Ｔｒｐ－Ａｓｐ－Ｐｒｏ－Ａｌａで表される配列に基づき５′－ＡＴＧＧＧＮＴＧＧＧＡＹＣＣＮＧＣ－３′で表される塩基配列のプローブ３を化学合成し、同位体^{32}Ｐで標識後、前記ナイロン膜上に固定した形質転換体のコロニーにハイブリダ

イズさせ、顕著な会合が認められた１０種類の形質転換体を選択した。

【００５８】

実験例３－２と同様にして、これら１０種類の形質転換体から組換えＤＮＡを採取し、これに配列表における配列番号１２に示すアミノ酸配列における第８乃至１２番目のＴｙｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ｔｒｐ－Ａｌａで表される配列に基づき化学合成した５′－ＴＡＹＧＡＹＧＴＮＴＧＧＧＣ－３′で表される塩基配列のプローブ４をハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した組換えＤＮＡを選択した。以上のようにして選択した組換えＤＮＡと形質転換体を、それぞれ、『ｐＢＲＴ３２』又は『ＢＲＴ３２』と命名した。

【００５９】

その後、この形質転換体ＢＲＴ３２をアンピシリンを含むＬ－ブロス培地で実験例３－２と同様に培養し、培養物より採取した菌体から組換えＤＮＡを溶出させ、精製し、分析したところ、組換えＤＮＡ　ｐＢＲＴ３２は約６，２００塩基対からなり、図１０に示す制限酵素地図で表される構造を有していた。図１０に示すように、酵素Ｑ３６をコードする１，７９１塩基対からなるＤＮＡは、制限酵素Ｋｐｎ　Ｉによる切断部位付近の下流に位置していることが判明した。

【００６０】

【実験例５－３　形質転換体ＢＲＴ３２による酵素の産生】

松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス＃４』２．０％（ｗ／ｖ）、ペプトン０．５％（ｗ／ｖ）、酵母エキス０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸水素二ナトリウム０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸二水素カリウム０．１％（ｗ／ｖ）を含む液体培地をｐＨ７．０に調整し、アンピシリンを５０μｇ／ｍｌ加え、１２０℃で２０分間加熱滅菌し、冷却後、実験例５－２で得た形質転換体ＢＲＴ３２を植菌し、３７℃で２４時間回転振盪培養した。培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物１ｌ当たりに換算して、約３，９００単位の酵素が産生していた。

【００６１】

別途、対照として、大腸菌ＸＬＩ－Ｂｌｕｅ株及びアルスロバクター・スピーシーズＱ３６をアンピシリン無含有の同じ組成の液体培地に植菌し、アルスロバクター・スピーシーズＱ３６の場合、培養温度を３０℃に設定した以外は上記と同様に培養・処理した。処理物の活性を測定したところ、アルスロバクター・スピーシーズＱ３６による酵素の産生は培養物１ｌ当たり約１，８００単位と、形質転換体ＢＲＴ３２と比較して有意に低いものであった。なお、宿主に使用した大腸菌ＸＬＩ－Ｂｌｕｅ株は、当該酵素を全く産生しなかった。

【００６２】

その後、形質転換体ＢＲＴ３２が産生した酵素を実験例１－１と同様に精製し、その性質・性状を調べたところ、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量値約５７，０００乃至６８，０００ダルトンを、また、等電点電気泳動で約３．３乃至４．６に等電点を示すなど、酵素Ｑ３６と同様の理化学的性質を有することが判明した。このことは、組換えＤＮＡ技術によっても当該酵素を製造でき、且つ、酵素の生産性も有意に向上することを示唆している。

【００６３】

【実験例６　アルスロバクター・スピーシーズＱ３６に由来する相補鎖ＤＮＡの調製とその塩基配列、アミノ酸配列の決定】

実験例５－２で得た組換えＤＮＡ　ｐＢＲＴ３２を実験例４と同様に処理してテンプレートＤＮＡとし、これをプライマー１とともにアニーリング後、Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼを作用させてプライマー１を５′末端から３′末端に向かって伸長させ、相補鎖ＤＮＡを生成させた。実験例４と同様に、この相補鎖ＤＮＡにジデオキシ・チェーン・ターミネータ法を適用し、ラジオグラム上に分離したＤＮＡ断片を解析した結果、相補鎖ＤＮＡは配列表における配列番号６に示す２，０５６塩基対からなる塩基配列を含んでいることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列表における配列番号６に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と配列表における配列番号８、１１又は１２に示すＮ

末端アミノ酸配列、部分アミノ酸配列を比較したところ、配列番号８のＮ末端アミノ酸配列は配列表における配列番号６における第２乃至２１番目の配列に、また、配列番号１１又は１２の部分アミノ酸配列は配列表における配列番号６における第４７０乃至４８９番目又は第１２乃至３１番目の配列に一致した。これは、酵素Ｑ３６が配列表における配列番号２のアミノ酸配列を有するものであり、アルスロバクター・スピーシーズＱ３６においては、酵素Ｑ３６が配列表における配列番号４に示す塩基配列のＤＮＡによりコードされていることを示している。

【００６４】

以上説明したように、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する酵素は、本発明者が長年に亙る研究の一成果として見出されたものであり、従来公知の酵素には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明は、組換えＤＮＡ技術を応用することにより、この酵素を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の組換え型酵素とその製造方法並びに用途につき、具体的に説明する。

【００６５】

この発明でいう組換え型酵素とは、組換えＤＮＡ技術により創製され、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する酵素全般を意味する。この発明の組換え型酵素は、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号１又は２に示すＮ末端からのアミノ酸配列かそれに相同的なアミノ酸配列が挙げられる。配列表における配列番号１又は２に示すアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の酵素作用を実質的に変えることなく、配列表における配列番号１又は２に示すアミノ酸配列における構成アミノ酸の１個又は２個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じＤＮＡであっても、それを導入する宿主や、そのＤＮＡを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成、培養温度・ｐＨなどに依っては、宿主内酵素によるＤＮＡ発現後の修飾などにより、所期の酵素作用は保持しているものの、配列表における配列番号１又は２に示すアミノ酸配列におけるＮ末端付近のアミノ酸が１個又は２個以上欠失したり、Ｎ末端に１個又は２個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の産生することがある。斯かる変異体も、それが末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離するかぎり、当然、この発明の組換え型酵素に包含される。

【００６６】

この発明による組換え型酵素は、特定のＤＮＡを含む形質転換体の培養物から採取することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号３又は４に示す塩基配列かそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のＤＮＡを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子の縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の１個又は２個以上を他の塩基で置き換えてもよい。また、ＤＮＡが宿主中で実際に当該酵素の産生を発現するために、当該酵素又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の１個又は２個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは言うまでもない。

【００６７】

この発明で使用するＤＮＡは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、リゾビウム・スピーシーズＭ－１１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３０）、アルスロバクター・スピーシーズＱ３６（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４３１６）、ブレビバクテリウム・ヘロボルム（ＡＴＣＣ１１８２２）及びミクロコッカス・ロゼウス（ＡＴＣＣ１８６）を含むリヒゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、ミクロコッカス属の微生物が挙げられ、これら微生物の菌体からはこの発明のＤＮＡを含む遺伝子が得られる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に植菌し、好気的条件下で約１乃至３日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームやβ－グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理する

ことにより当該ＤＮＡを含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、細胞壁溶解酵素にプロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、菌体を超音波処理する際、ＳＤＳなどの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くして得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈澱、遠心分離、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的のＤＮＡが得られる。一方、ＤＮＡを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号３又は４に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号１又は２に示すアミノ酸配列をコードするＤＮＡを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えＤＮＡとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を採取し、その菌体から当該ＤＮＡを含むプラスミドを採取すればよい。

【００６８】

斯かるＤＮＡは、通常、組換えＤＮＡの形態で宿主に導入される。組換えＤＮＡは、通常、ＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなり、ＤＮＡが入手できれば、通常一般の組換えＤＮＡ技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）、ｐＵＢ１１０、ｐＴＺ４、ｐＣ１９４、ｐＨＶ１４、ＴＲｐ７、ＹＥｐ７、ｐＢＳ７などのプラスミドベクターやλｇｔ・λＣ、λｇｔ・λＢ、ρ１１、φ１、φ１０５などのファージベクターが挙げられ、このうち、この発明のＤＮＡを大腸菌で発現させるにはｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＳＫ（＋）、λｇｔ・λＣ及びλｇｔ・λＢが好適であり、一方、枯草菌で発現させるにはｐＵＢ１１０、ｐＴＺ４、ｐＣ１９４、ρ１１、φ１及びφ１０５が好適である。ｐＨＶ１４、ＴＲｐ７、ＴＥｐ７及びｐＢＳ７は、組換えＤＮＡを２種以上の宿主内で増殖させる場合に有用である。

【００６９】

ＤＮＡを斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、ＤＮＡを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成したＤＮＡ断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、ＩＩ型の制限酵素、詳細には、Ｓａｕ　３ＡＩ、ＥｃｏＲＩ、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ、Ｂａｍ　ＨＩ、Ｓａｌ　Ｉ、Ｘｂａ　Ｉ、Ｓａｃ　Ｉ、Ｐｓｔ　Ｉなどを使用すれば、ＤＮＡ断片とベクター断片を連結するのが容易となる。ＤＮＡ断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でＤＮＡリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えＤＮＡは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【００７０】

このようにして得られる組換えＤＮＡは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えＤＮＡとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質を含む栄養培地で培養し、該非還元性糖質よりトレハロースを遊離するものを選択すればよい。

【００７１】

斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該酵素を産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア若しくはアンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンスティープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に植菌し、栄養培地を温度２５乃至６５℃、ｐＨ２乃至８に保ちつつ、通気撹拌などによる好気的条件下で約１乃至６日間培養すれ

ば、当該酵素を含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体を破砕した後、濾過、遠心分離などにより酵素を菌体又は菌体破砕物から分離し、精製する。精製には酵素を精製するための通常一般の方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破砕物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの１種若しくは２種以上を適宜組合せて適用すればよい。

【００７２】

前述のとおり、この発明による組換え型酵素は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離するという、従来の酵素には見られない顕著な作用を有する。トレハロースはまろやかで上品な甘味を有し、そして、何よりも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく飲食物を甘味付けできるという大きな利点がある。

【００７３】

斯かる変換方法につきさらに説明すると、この発明による組換え型酵素の基質にはα－グルコシルトレハロース、α－マルトシルトレハロース、α－マルトトリオシルトレハロース、α－マルトテトラオシルトレハロース、α－マルトペンタオシルトレハロースなどの末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の一連の非還元性糖質が用いられる。斯かる非還元性糖質は、澱粉又はアミロペクチン、アミロースなどの澱粉質を酸及び／又はアミラーゼによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉加水分解物に特願平５－３４９２１６号明細書に開示されている非還元性糖質生成酵素を作用させることにより得ることができる。斯かる澱粉加水分解物は、通常、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース重合度３以上のマルトオリゴ糖の１種若しくは２種以上を含んでなる。アミラーゼ研究会編『ハンドブック・オブ・アミレーシーズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ』、１９８８年、パーガモン・プレス発行に記載されているα－アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ及びマルトヘキサオース生成アミラーゼは、斯かる澱粉加水分解物の調製に特に有用であり、これらアミラーゼのいずれかを使用することにより、グルコース重合度３以上の還元性澱粉糖を豊富に含む澱粉糖混合物が容易且つ効率的に得られる。なお、このとき、必要に応じて、プルラナーゼやイソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を併用すれば、非還元性糖質生成酵素の基質となり得る還元性澱粉糖の収量を上げることができる。斯かる還元性澱粉糖の１種又は２種以上を濃度５０％（ｗ／ｖ）まで含む水溶液に非還元性糖質生成酵素を適量共存せしめ、水溶液を、通常、温度約４０乃至５５℃に、また、ｐＨを約６乃至８の範囲に保ちつつ、所望量の非還元性糖質が生成するまで反応させる。

【００７４】

この発明による変換方法においては、通常、基質として上記したような非還元性糖質の１種又は２種以上を含む水溶液にこの発明による組換え型酵素を共存せしめ、水溶液を所定の温度、ｐＨに保ちつつ、所望量のトレハロースが遊離するまで反応させる。反応は０．１％（ｗ／ｗ）程度の基質濃度下でも進行するが、この発明による変換方法を大規模に実施する場合には、より高濃度の２％（ｗ／ｖ）以上、望ましくは、５乃至５０％（ｗ／ｗ）とするのがよい。反応時の温度とｐＨは組換え型酵素が失活することなく基質に効率的に作用するレベルに設定され、温度は５５℃付近まで、望ましくは、約４０乃至５５℃に、また、ｐＨは５乃至１０、望ましくは、約６乃至８の範囲に設定される。組換え型酵素の量と反応時間は、反応の進行具合に依って適宜に設定する。斯かる反応により、非還元性糖質は効率的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換され、α－マルトトリオシルトレハロースの場合、変換率はほぼ１００％に達する。澱粉加水分解物に前記アミラーゼのいずれかと、非還元性糖質生成酵素及び当該組換え型酵素を同時に作用させるときには、非還元性糖質が生成すると同時にトレハロースとグ

ルコース及び／又はマルトオリゴ糖に分解されるので、トレハロース含量の高い糖組成物が収量良く、効率的に得られる実益がある。

【００７５】

この発明の変換方法により得られた反応物はそのまま使用可能ではあるが、通常、使用に先立ち精製する。すなわち、濾過・遠心分離などにより反応物から不溶物を除去し、活性炭により脱色した後、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮してシロップ状物とする。用途に依っては、このシロップ状物を真空乾燥、噴霧乾燥などにより固状物としてもよい。実質的にトレハロースのみからなる製品を得るには、上記シロップ状物にイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどによる糖質を分離するための種々のクロマトグラフィー、アルコール、アセトンなどにより分別沈澱、膜濾過、酵母により発酵、アルカリによる還元性糖質の分解除去などの１種若しくは２種以上を適用する。大量の反応物を処理するには、例えば、特開昭５８－２３７９９号公報や特開昭５８－７２５９８号公報に開示されている強酸性カチオン交換樹脂を使用する固定床方式、移動床方式又は擬似移動床方式のイオン交換クロマトグラフィーが有用であり、これらの方法によるときには、従来、大量入手が難しかったトレハロース含量が高い製品を大量且つ効率的に得ることができる。

【００７６】

斯くして得られるトレハロース及びトレハロースを含む糖組成物は、糖質甘味剤の還元性を嫌う種々の物品に広範な用途を有し、例えば、食品一般、化粧品、医薬品の甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として極めて有用である。

【００７７】

以下、２～３の実施例により、この発明による組換え型酵素の製造方法と非還元性糖質の変換方法を具体的に説明する。

【００７８】

【実施例Ａ－１　組換え型酵素の製造】

５００ｍｌ容三角フラスコに松谷化学工業製澱粉加水分解物『パインデックス＃４』２．０％（ｗ／ｖ）、ペプトン０．５％（ｗ／ｖ）、酵母エキス０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸水素二ナトリウム０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸二水素カリウム０．１％（ｗ／ｖ）を含む液体培地（ｐＨ７．０）を１００ｍｌずつとり、アンピシリンを５０μｇ／ｍｌ加えた後、１２０℃で２０分間オートクレーブして加熱滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地に実験例３－２の方法で得た形質転換体ＢＭＵ２７を植菌し、回転振盪下、２７℃で２４時間種培養した。別途、３０ｌ容ジャーファーメンタに上記と同組成の液体培地を１８ｌとり、アンピシリンを５０μｇ／ｍｌ加え、１２０℃で２０分間加熱滅菌し、冷却後、上記で得た種培養液を１％（ｖ／ｖ）接種し、液体培地をｐＨ６乃至８に保ちつつ、３０℃で２４時間通気撹拌培養した。培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離より不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物１ｌ当りに換算して、約３，９００単位の酵素が産生していた。この上清を実験例１－１の方法により精製したところ、比活性約２９０単位／ｍｇ蛋白質の組換え型酵素を１ｍｌ当たり１６５単位含む水溶液が６７ｍｌ得られた。

【００７９】

【実施例Ａ－２　組換え型酵素の製造】

実験例５－２の方法により得た形質転換体ＢＲＴ３２を実施例Ａ－１と同様に培養し、培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の酵素活性を測定したところ、培養物１ｌ当たりに換算して、約４，０００単位の酵素が産生していた。この上清を実験例１－１の方法により精製したところ、比活性約４２０単位／ｍｇ蛋白質の組換え型酵素を１ｍｌ当たり２００単位含む水溶液が５５ｍｌ得られた。

【００８０】

【実施例Ｂ－１　組換え型酵素による非還元性糖質の変換】

【００８１】

【実施例Ｂ－１（ａ）　非還元性糖質生成酵素の調製】

５００ｍｌ容三角フラスコにマルトース２．０％（ｗ／ｖ）、ペプトン０．５％（ｗ／ｖ

）、酵母エキス０．１％（ｗ／ｖ）、燐酸水素二ナトリウム０．１％（ｗ／ｖ）及び燐酸二水素カリウム０．１％（ｗ／ｖ）を含む液体培地（ｐＨ７．０）を１００ｍｌずつとり、１２０℃で２０分間オートクレーブして滅菌した。冷却後、三角フラスコ内の液体培地にリゾビウム・スピーシーズＭ－１１を植菌し、回転振盪下、２７℃で２４時間種培養した。別途、３０ｌ容ジャーファーメンタに上記と同組成の液体培地を２０ｌとり、滅菌後、上記で得た種培養液を１％（ｖ／ｖ）接種し、液体培地をｐＨ７乃至８に保ちつつ、３０℃で２４時間通気撹拌培養した。培養物を超音波処理して菌体を破砕し、遠心分離により不溶物を除去後、実験例１－１の方法に準じて精製したところ、比活性約１９５単位／ｍｇ蛋白質の非還元性糖質生成酵素が、培養物１ｌ当たりに換算して、約２２０単位の収量で得られた。

【００８２】

なお、この発明を通じて、非還元性糖質生成酵素の活性は、次の方法により測定した活性値（単位）で表示する。すなわち、マルトペンタオースを１．２５％（ｗ／ｖ）含む５０ｍＭ燐酸緩衝液（ｐＨ７．０）を４ｍｌとり、これに酵素液を１ｍｌ加え、４０℃で６０分間インキュベートして反応させた後、反応液を１００℃で１０分間加熱して反応を停止させる。反応液を蒸留水で１０倍希釈した後、ソモギ・ネルソン法により還元力を測定する。非還元性糖質生成酵素の１単位とは、上記条件下において、１分間にマルトペンタオース１μｍｏｌに相当する還元力を低下させる酵素の量と定義する。

【００８３】

【実施例Ｂ－１（ｂ）　トレハロースを含むシロップ状物の調製】

トウモロコシ澱粉を濃度１５％（ｗ／ｗ）になるように水中に懸濁し、懸濁液に炭酸カルシウムを０．１％（ｗ／ｗ）加えた。ｐＨ６．０に調整後、ノボ・ノルディスク・インダストリー製α－アミラーゼ剤『ターマミル６０Ｌ』を０．２％（ｗ／ｗ）加え、９５℃で１５分間反応させて澱粉を糊化・液化した。液化液を１２０℃で３０分間オートクレーブして酵素を失活させ、４５℃に急冷後、澱粉固形分１ｇ当たり、林原生物化学研究所製プルラナーゼ剤を１，０００単位、実施例Ｂ－１（ａ）で得た非還元性糖質生成酵素を３．４単位、実施例Ａ－１の方法で得た組換え型酵素を４．２単位加え、４８時間反応させた。反応物を９５℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して、濃度約６０％（ｗ／ｗ）のシロップ状物を澱粉固形分当たり約９２％の収量で得た。

【００８４】

実験例２－１の方法により分析したところ、本品は、固形分当たりトレハロースを７０．２％、α－グルコシルトレハロースを２．４％、α－マルトシルトレハロースを３．３％、グルコースを０．７％、マルトースを１０．１％、マルトトリオースを１２．９％、グルコース重合度４以上のマルトオリゴ糖を０．４％含んでいた。まろやかで上品な甘味に加えて適度の保湿性を有し、粘度と還元性が低い本品は、食品一般、化粧品、医薬品などに配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【００８５】

【実施例Ｂ－１（ｃ）　トレハロースを含む粉状物の調製】

東京有機化学工業製強酸性カチオン交換樹脂『ＸＴ－１０１６（Na^+）』を　内径５．４ｃｍ、長さ５ｍのジャケット付きステンレス製カラム４本に均一に充填し、カラムを直列に連結して全長を２０ｍとした。カラム内温度を５５℃に保ちつつ、実施例Ｂ－１（ｂ）で得たシロップ状物を樹脂に対して約５％（ｖ／ｖ）の割合で負荷し、５５℃の温水をＳＶ０．３の流速で通液してシロップ状物中の糖質を分画した。溶出液の糖組成を分析し、トレハロース含量の高い画分のみを採取し、濃縮し、真空乾燥し、破砕して、固形分当たりトレハロースを約９７％含む粉状物を原料固形分当たり約５６％の収率で得た。

【００８６】

まろやかで上品な甘味を有しながらも、実質的な還元性を有しない本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【００８７】
【実施例Ｂ－１（ｄ）　結晶性トレハロース粉状物の調製】
実施例Ｂ－１（ｃ）で得たトレハロース含量の高い画分を一部とり、濃度約７５％（ｗ／ｗ）に濃縮後、助晶罐に移し、種晶としてトレハロース含水結晶を固形分当たり約２％加え、緩やかに撹拌しながら助晶して結晶化度約４５％のマスキットを得た。このマスキットを約１５０ｋｇ／ｃｍ^{2}の圧力下、噴霧乾燥塔の上　部に設けた噴霧ノズルより噴霧乾燥塔の下方に向かって噴霧する一方、約８５℃の温風を噴霧乾燥塔の上部から下方に向かって送風しつつ、噴霧乾燥塔の底部に設けたベルトコンベア上に蓄積した結晶性粉状物を噴霧乾燥塔外に徐々に搬出した。その後、粉状物を熟成塔に移し、約４０℃の温風を送風しながら１０時間熟成して結晶化と乾燥を完了した。このようにして、トレハロース含水結晶からなる粉状物を原料固形分当たり約９０％の収量で得た。
【００８８】
まろやかで上品な甘味を有しながらも、実質的な還元性や吸湿性を有しない本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。
【００８９】
【実施例Ｂ－２　組換え型酵素による非還元性糖質の変換】
馬鈴薯澱粉を濃度６％（ｗ／ｗ）になるように水中に懸濁し、加熱糊化後、温度５０℃、ｐＨ４．５に調整し、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を澱粉固形分１ｇ当たり５００単位加え、２０時間反応させた。反応物をｐＨ６．５に調整し、１２０℃で１０分間オートクレーブして酵素を失活させ、９５℃に急冷後、ノボ・ノルディスク・インダストリー製α－アミラーゼ剤『ターマミル６０Ｌ』を澱粉固形分当たり０．１％（ｗ／ｗ）加え、１５分間反応させた。反応物を１３０℃で３０分間加熱して酵素を失活させ、４５℃に急冷後、澱粉固形分１ｇ当たり、実施例Ｂ－１（ａ）の方法で得た非還元性糖質生成酵素を４．１単位、実施例Ａ－２の方法で得た組換え型酵素を４．９単位加え、６４時間反応させた。反応物を９５℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、５５℃に急冷し、ｐＨ５．０に調整後、ナガセ生化学工業製グルコアミーゼ剤『グルコチーム』を澱粉固形分１ｇ当たり１０単位加え、４０時間反応させた。反応物を９５℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃縮して、固形分当たりトレハロースを８０．５％含む濃度約６０％（ｗ／ｗ）のシロップ状物を得た。このシロップ状物を濃度約８４％（ｗ／ｗ）まで濃縮後、助晶罐に移し、種晶としてトレハロース含水結晶を固形分当たり約２％加え、緩やかに撹拌しながら助晶して結晶化度約４５％のマスキットを得た。このマスキットをプラスチック製バットに分注し、室温で３日間静置して固化・熟成させた後、バットからブロック状物を取出し、切削機により破砕したところ、トレハロース含水結晶を含む固状物が澱粉固形分当たり約９０％の収量で得られた。
【００９０】
実質的な吸湿性を有さず、取扱い易い本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。
【００９１】
【実施例Ｂ－３　組換え型酵素による非還元性糖質の変換】
馬鈴薯澱粉を濃度６％（ｗ／ｗ）になるように水中に懸濁し、ナガセ生化学工業製α－アミラーゼ剤『ネオスピターゼ』を０．０１％（ｗ／ｗ）加え、ｐＨ６．２に調整後、温度８５乃至９０℃に保ちつつ２０分間反応させて澱粉を糊化・液化させた。液化液を１２０℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、４５℃に急冷後、澱粉固形分１ｇ当たり、林原生物化学研究所製イソアミラーゼ剤を５００単位、実施例Ｂ－１（ａ）の方法で得た非還元性糖質生成酵素を３．２単位、実施例Ａ－１の方法で得た組換え型酵素を５．０単位加えて４８時間反応させた。反応物を９５℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、５５℃に急冷後、ｐＨ５．０に調整し、ナガセ生化学工業製グルコアミラーゼ剤『グルコチーム』を澱粉固形分１ｇ当たり１０単位加えて４０時間反応させた。反応物を９５℃で１０分間加

熱して酵素を失活させ、冷却し、濾過後、常法にしたがって活性炭により脱色し、イオン交換樹脂により脱塩・精製し、濃度約６０％（ｗ／ｗ）まで濃縮して、固形分当たりトレハロースを７８．３％含むシロップ状物を得た。このシロップ状物を強酸性カチオン交換樹脂としてオルガノ製『ＣＧ６０００（Ｎａ$^{+}$）』　を使用した以外は実施例Ｂ－１（ｃ）と同様に分画して、固形分当たりトレハロースを約９５％含む画分を得た。この画分を濃度約７５％（ｗ／ｗ）に濃縮後、実施例Ｂ－２と同様に助晶し、得られたマスキットのブロック状物を破砕してトレハロース含水結晶を含む粉状物を澱粉固形分当たり約７０％の収率で得た。

【００９２】

実質的な吸湿性を有さず、取扱い易い本品は、食品一般、化粧品、医薬品に配合使用する甘味剤、呈味改善剤、品質改善剤、安定剤、賦形剤として有用である。

【００９３】

【発明の効果】

以上説明したように、この発明は、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質からトレハロースを遊離する、従来未知の全く新規な酵素の発見に基づくものである。この発明は、組換えＤＮＡ技術により、斯かる酵素を大規模且つ効率的に生産する道を拓くものである。この発明による組換え型酵素を使用する変換方法により、末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度３以上の非還元性糖質は効率的にトレハロースとグルコース及び／又はマルトオリゴ糖からなる糖組成物に変換される。非還元性糖質から遊離したトレハロースは、まろやかで上品な甘味を有し、しかも、分子中に還元性基を有しないので、着色や変質の懸念なく食品一般を甘味付けできる実益がある。加えて、この発明による組換え型酵素は、全アミノ酸配列までが明らかにされた酵素であり、食品等への配合使用を前提とするトレハロースの製造に安心して使用し得るものである。

【００９４】

この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する意義のある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明であると言える。

【００９５】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：589

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

```
Ala Lys Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala
1               5                  10                  15
Gly Thr Val Thr Leu Leu Ala Gly Gly Glu Arg Tyr Glu Met Gly Arg Arg
            20                  25                  30
Pro Gly Asn Gly Pro Ala Asp Glu Gly Trp Trp Thr Ala Ala Asp Ala Pro
        35                  40                  45                  50
Thr Gly Ala Asp Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Leu Asp Gly Asp Glu Ile Pro
                55                  60                  65
Leu Pro Asp Pro Arg Thr Arg Arg Gln Pro Glu Gly Val His Ala Leu Ser
    70                  75                  80                  85
Arg Thr Phe Asp Pro Gly Ala His Arg Trp Gln Asp Ala Gly Trp Gln Gly
                90                  95                  100
Arg Glu Leu Gln Gly Ser Val Ile Tyr Glu Leu His Ile Gly Thr Phe Thr
            105                 110                 115
Pro Glu Gly Thr Leu Asp Ala Ala Ala Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala Gly
        120                 125                 130                 135
Leu Gly Ile Asp Phe Ile Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr
                140                 145                 150
His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln Trp Phe Ala Val His Glu Gly Tyr
    155                 160                 165                 170
Gly Gly Pro Ala Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Ala His Ala Ala Gly
                175                 180                 185
Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro Ser Gly Asn
```

```
        190                 195                 200
Tyr Leu Pro Arg Tyr Gly Pro Tyr Leu Lys His Gly Glu Gly Asn Thr Trp
205                 210                 215                 220
Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro Gly Ser Asp His Val Arg Gln Tyr
            225                 230                 235
Ile Leu Asp Asn Val Ala Met Trp Leu Arg Asp Tyr Arg Val Asp Gly Leu
    240                 245                 250                 255
Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Lys Asp Glu Arg Ala Val His Ile Leu
                260                 265                 270
Glu Glu Phe Gly Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ser Ser Glu Gly Gly Arg Pro
        275                 280                 285
Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro
290                 295                 300                 305
Arg Asp Val Asn Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His
            310                 315                 320
His Ala Val His Val Asn Val Ser Gly Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp
    325                 330                 335                 340
Phe Asp Ser Leu Gly Ala Leu Ala Lys Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His
                345                 350                 355
Asp Gly Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Gly Arg Cys His Gly Arg Pro Ile Asn
        360                 365                 370
Phe Ser Ala Val His Pro Ala Ala Leu Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp
375                 380                 385                 390
Gln Ile Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp Arg Leu Ser Gln Ser Leu Pro Tyr
            395                 400                 405
Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu Thr Leu Thr Gly Pro Phe Thr Pro
    410                 415                 420                 425
Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Tyr Gly Ala Thr Thr Pro Trp Gln Phe Phe
                430                 435                 440
```

```
Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ile
        445                 450                 455
Arg Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp Pro Gln
460                 465                 470                 475
Asp Pro Glu Thr Phe Thr Arg Ser Lys Leu Asp Trp Ala Glu Ala Ser Ala
            480                 485                 490
Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu Tyr Arg Ser Leu Ile Thr Leu Arg
    495                 500                 505                 510
Arg Ser Thr Pro Glu Leu Ala Arg Leu Gly Phe Ala Asp Thr Ala Val Glu
                515                 520                 525
Phe Asp Asp Asp Ala Arg Trp Leu Arg Tyr Trp Arg Gly Gly Val Gln Val
        530                 535                 540
Val Leu Asn Phe Ala Asp Arg Pro Ile Ser Leu Asp Arg Pro Gly Thr Ala
545                 550                 555                 560
Leu Leu Leu Ala Thr Asp Asp Ala Val Arg Met Asp Gly Val Gln Val Glu
            565                 570                 575
Leu Pro Pro Leu Ser Ala Ala Val Leu Arg Asp
    580                 585
```

【００９６】

配列番号：2

配列の長さ：597

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

```
Thr His Thr Tyr Pro Arg Glu Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Pro Ala Arg
1               5                  10                  15
Tyr Asp Val Trp Ala Pro Asn Ala Glu Ser Val Thr Leu Leu Ala Gly Gly
            20                  25                  30
Glu Arg Tyr Ala Met Gln Arg Arg Ala Glu Thr Gly Pro Glu Asp Ala Gly
35                  40                  45                  50
Trp Trp Thr Ala Ala Gly Ala Pro Thr Asp Gly Asn Val Asp Tyr Gly Tyr
                55                  60                  65
Leu Leu Asp Gly Asp Glu Thr Pro Leu Pro Asp Pro Arg Thr Arg Arg Gln
    70                  75                  80                  85
Pro Asp Gly Val His Ala Leu Ser Arg Thr Phe Asp Pro Ser Ala Tyr Ser
                90                  95                  100
Trp Gln Asp Asp Ala Trp Gln Gly Arg Glu Leu Gln Gly Ala Val Ile Tyr
            105                 110                 115
Glu Leu His Leu Gly Thr Phe Thr Pro Glu Gly Thr Leu Glu Ala Ala Ala
120                 125                 130                 135
Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala Gly Leu Gly Val Asp Phe Ile Glu Leu Leu
                140                 145                 150
Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln
    155                 160                 165                 170
Trp Phe Ala Val His Glu Asp Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe
                175                 180                 185
Val Asp Ala Ala His Ala Ala Gly Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr
```

```
        190                 195                 200
Asn His Leu Gly Pro Ser Gly Asn Tyr Leu Pro Arg Phe Gly Pro Tyr Leu
205                 210                 215                 220
Lys Gln Gly Glu Gly Asn Thr Trp Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro
            225                 230                 235
Gly Ser Asp His Val Arg Arg Tyr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Met Trp Leu
    240                 245                 250                 255
Arg Asp Tyr Arg Val Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Lys
                260                 265                 270
Asp Glu Arg Ala Val His Ile Leu Glu Asp Phe Gly Ala Leu Ala Asp Gln
        275                 280                 285
Ile Ser Ala Glu Val Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp Leu
290                 295                 300                 305
Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro Arg Asp Val Asn Gly Tyr Gly Leu Glu
            310                 315                 320
Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His His Ala Val His Val Asn Val Thr Gly
    325                 330                 335                 340
Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp Phe Asp Ser Leu Ala Ala Leu Ala Lys
                345                 350                 355
Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His Asp Gly Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Glu
        360                 365                 370
Arg His His Gly Arg Pro Ile Asn Phe Ser Ala Val His Pro Ala Ala Leu
375                 380                 385                 390
Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp Gln Ile Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp
            395                 400                 405
Arg Leu Ser Gln Thr Leu Pro Tyr Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu
    410                 415                 420                 425
Thr Leu Thr Gly Pro Phe Thr Pro Met Leu Leu Met Gly Glu Glu Tyr Gly
                430                 435                 440
```

Ala Ser Thr Pro Trp Gln Phe Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly
445 450 455
Lys Ala Thr Ala Glu Gly Arg Ile Lys Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp
460 465 470 475
Pro Ala Val Val Pro Asp Pro Gln Asp Pro Glu Thr Phe Arg Arg Ser Lys
480 485 490
Leu Asp Trp Ala Glu Ala Ala Glu Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu
495 500 505 510
Tyr Arg Ser Leu Thr Ala Leu Arg Arg Ser Thr Pro Asp Leu Thr Lys Leu
515 520 525
Gly Phe Glu Asp Thr Gln Val Ala Phe Asp Glu Asp Ala Arg Trp Leu Arg
530 535 540
Phe Arg Arg Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Asn Phe Ser Glu Gln Pro Val
545 550 555 560
Ser Leu Asp Gly Ala Gly Thr Ala Leu Leu Leu Ala Thr Asp Asp Ala Val
565 570 575
Arg Leu Glu Gly Glu Arg Ala Glu Leu Gly Pro Leu Ser Ala Ala Val Val
580 585 590 595
Ser Asp

【００９７】

配列番号：3

配列の長さ：1767

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

GCCAAGCCGG TGCAGGGAGC GGGGCGCTTC GATATCTGGG CGCCCGAGGC AGGCACCGTA 60
ACGCTGCTGG CCGGCGGGGA GCGCTACGAG ATGGGCCGCC GCCCCGGCAA CGGGCCGGCG 120
GACGAAGGCT GGTGGACGGC CGCGGATGCA CCGACAGGCG CGGACGTGGA CTACGGATAC 180
CTGCTCGACG GCGACGAAAT CCCGCTGCCG GACCCCCGGA CCCGCCGCCA GCCCGAAGGC 240
GTCCATGCCC TGTCCCGGAC CTTCGACCCC GGCGCCCACC GCTGGCAGGA CGCCGGGTGG 300
CAGGGCAGGG AACTCCAGGG CTCCGTGATT TACGAACTCC ACATCGGAAC GTTCACGCCG 360
GAAGGGACGC TGGACGCCGC CGCGGGCAAG CTGGACTACC TCGCCGGCCT GGGCATCGAC 420
TTCATTGAGC TGCTGCCCGT GAATGCCTTC AACGGCACGC ACAACTGGGG CTACGACGGC 480
GTCCAGTGGT TTGCCGTGCA TGAAGGCTAC GGCGGGCCTG CGGCGTACCA GCGGTTCGTG 540
GATGCGGCCC ACGCGGCCGG CCTCGGCGTC ATCCAGGACG TGGTCTACAA CCACCTCGGG 600
CCGAGCGGGA ACTACCTCCC CAGGTACGGC CCGTACCTCA AGCACGGCGA AGGCAACACC 660
TGGGGCGATT CGGTCAACCT GGACGGGCCG GGATCCGACC ACGTCCGCCA GTACATCCTG 720
GACAACGTGG CCATGTGGCT GCGCGACTAC CGGGTGGACG GCCTCCGCCT GGACGCCGTC 780
CACGCCCTGA AGGATGAGCG GGCCGTCCAC ATCCTGGAGG AGTTCGGCGC GCTGGCGGAC 840
GCCCTGTCGT CCGAAGGCGG CCGCCCGCTG ACCCTCATCG CCGAGTCCGA CCTCAACAAT 900
CCGCGGCTGC TGTACCCCCG GGATGTCAAC GGCTACGGAC TGGCCGGCCA GTGGAGCGAC 960
GACTTCCACC ACGCCGTGCA CGTCAACGTC AGCGGGGAAA CCACCGGCTA CTACAGCGAC 1020
TTCGACTCGC TCGGAGCCCT CGCCAAGGTC CTGCGTGACG GGTTCTTCCA CGACGGCAGC 1080
TACTCCAGCT TCCGCGGCCG CTGCCACGGC CGGCCGATCA ACTTCAGCGC CGTGCATCCG 1140
GCCGCGCTGG TGGTCTGCTC ACAGAACCAT GACCAGATCG GCAACCGGGC CACCGGGGAC 1200
CGGCTGTCCC AGTCACTTCC GTACGGCAGC CTGGCCCTGG CCGCCGTGCT GACCCTCACC 1260
GGTCCGTTCA CGCCCATGCT GTTCATGGGA GAGGAATACG GGGCCACCAC CCCGTGGCAG 1320
TTCTTCACCT CGCACCCTGA ACCCGAGCTG GGCAAGGCCA CGGCCGAGGG CAGGATCAGG 1380
GAGTTCGAGC GCATGGGGTG GGATCCCGCC GTCGTGCCCG ATCCGCAGGA TCCGGAGACC 1440

TTCACCCGCT CCAAACTGGA CTGGGCGGAA GCGTCCGCCG GCGATCATGC CCGCCTCCTG 1500
GAGCTGTACC GCTCGCTTAT CACGCTGCGG CGGTCAACTC CGGAGCTCGC GCGCCTGGGC 1560
TTTGCGGACA CCGCCGTCGA GTTCGACGAC GACGCCCGCT GGCTCCGTTA TTGGCGCGGA 1620
GGCGTGCAGG TGGTGCTGAA CTTCGCGGAC CGTCCCATCA GCCTGGACCG GCCGGGAACC 1680
GCGCTGCTGC TCGCCACCGA CGACGCCGTC CGGATGGACG GAGTCCAGGT GGAGCTGCCG 1740
CCGCTGAGCG CCGCGGTTCT GCGCGAC 1767

【００９８】

配列番号：4

配列の長さ：1791

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

ACGCACACCT ACCCGCGGGA AGCCGCGAAA CCCGTCCTGG GCCCCGCACG CTACGACGTC 60
TGGGCGCCCA ACGCTGAATC CGTGACGCTG CTGGCCGGCG GGGAGCGCTA CGCCATGCAG 120
CGCCGGGCCG AGACCGGGCC GGAGGACGCC GGCTGGTGGA CCGCCGCCGG CGCGCCTACG 180
GATGGCAACG TGGACTACGG GTACCTTCTG GACGGCGACG AAACACCGCT TCCGGATCCA 240
CGGACCCGCC GCCAGCCCGA CGGCGTCCAC GCCCTGTCCC GCACGTTCGA CCCGTCCGCG 300
TACAGCTGGC AGGACGACGC CTGGCAGGGC AGGGAACTGC AGGGCGCCGT CATCTACGAG 360
CTCCACCTCG GAACATTCAC GCCCGAAGGG ACGCTGGAGG CGGCCGCCGG AAAGCTGGAC 420
TACCTCGCCG GCTTGGGCGT CGACTTCATC GAGCTGCTGC CGGTGAACGC TTTCAACGGC 480
ACGCACAACT GGGGTTACGA CGGTGTCCAG TGGTTCGCTG TGCACGAGGC ATACGGCGGG 540
CCGGAAGCGT ACCAGCGGTT CGTCGACGCC GCCCACGCCG CAGGCCTTGG CGTGATCCAG 600
GACGTGGTCT ACAACCACCT CGGCCCCAGC GGGAACTACC TGCCGCGGTT CGGGCCGTAC 660
CTCAAGCAGG GCGAGGGTAA CACGTGGGGC GACTCGGTGA ACCTGGACGG GCCCGGCTCC 720
GACCATGTGC GCCGGTACAT CCTGGACAAC CTGGCCATGT GGCTGCGTGA CTACCGGGTG 780
GACGGCCTGC GGCTGGACGC CGTCCACGCC CTGAAGGATG AGCGGGCGGT GCACATCCTG 840
GAGGACTTCG GGGCGCTGGC CGATCAGATC TCCGCCGAGG TGGGACGGCC GCTGACGCTC 900
ATCGCCGAGT CCGACCTCAA CAACCCGCGG CTGCTGTACC CGCGGGACGT CAACGGGTAC 960
GGGCTGGAAG GGCAGTGGAG CGACGACTTC CACCACGCCG TCCACGTCAA CGTCACCGGC 1020
GAAACCACCG GCTACTACAG TGACTTCGAC TCGCTGGCCG CCCTCGCCAA GGTGCTCCGG 1080
GACGGCTTCT TCCACGACGG CAGCTACTCC AGCTTCCGGG AACGCCACCA CGGACGGCCG 1140
ATTAATTTCA GCGCCGTACA CCCAGCCGCC CTGGTGGTCT GTTCGCAGAA CCACGACCAG 1200
ATCGGCAACC GTGCCACGGG GGACCGGCTC TCCCAGACCC TGCCGTACGG AAGCCTGGCC 1260
CTCGCTGCGG TGCTGACCCT GACGGGACCC TTCACGCCCA TGCTGCTCAT GGGCGAGGAG 1320
TACGGCGCCA GCACGCCGTG GCAGTTTTTC ACCTCGCACC CGGAGCCGGA GCTCGGCAAG 1380
GCCACCGCGG AGGGCCGGAT CAAGGAGTTC GAGCGCATGG GGTGGGATCC CGCCGTCGTG 1440

CCCGATCCCC AGGATCCTGA GACGTTCCGC CGGTCCAAGC TGGACTGGGC GGAAGCCGCC 1500
GAAGGCGACC ATGCCCGGCT GCTGGAGCTG TACCGTTCGC TCACCGCCCT GCGCCGCTCC 1560
ACGCCGGACC TCACCAAGCT GGGCTTCGAG GACACGCAGG TGGCGTTCGA CGAGGACGCC 1620
CGCTGGCTGC GGTTCCGCCG GGGTGGCGTG CAGGTGCTGC TCAACTTCTC GGAACAGCCC 1680
GTGAGCCTGG ACGGGGCGGG CACGGCCCTG CTGCTGGCCA CCGACGACGC CGTCCGGCTA 1740
GAAGGTGAGC GTGCGGAACT CGGTCCGCTG AGCGCCGCCG TCGTCAGCGA C 1791

【００９９】

配列番号：5
配列の長さ：2161
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴
起源
生物名：リゾビウム・スピーシーズ(Rhizobium sp.)
株名：M-11(FERM BP-4130)
配列の特徴
特徴を表わす記号：5´UTR
存在位置：1..206
特徴を決定した方法：E
特徴を表わす記号：mat peptide
存在位置：207..1994
特徴を決定した方法：S
特徴を表わす記号：3´UTR
存在位置：1995..2161
特徴を決定した方法：E
配列

```
GGCGCCGGGG GAGTGCTGGC GCTTGCCACC CGGCTCCCCT ACGGGCTGGA ACAGTCGGGC   60
GGCTGGCGGG ACACCGCCGT CGAGCTTGAA GCCGCCATGA CGGACGAACT GACCGGCTCC  120
ACTTTCGGGC CGGGACCGGC GGCGCTGTCA GAAGTCTTCC GGGCCTACCC GGTGGCCTTG  180
TTGGTCCCCG CGACAGGAGG CAAGTC                                       206
ATG ACG CAG CCC AAC GAT GCG GCC AAG CCG GTG CAG GGA GCG GGG CGC     254
Met Thr Gln Pro Asn Asp Ala Ala Lys Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg
1               5                  10                  15
TTC GAT ATC TGG GCG CCC GAG GCA GGC ACC GTA ACG CTG CTG GCC GGC     302
```

```
Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala Gly Thr Val Thr Leu Leu Ala Gly
            20                  25                  30
GGG GAG CGC TAC GAG ATG GGC CGC CGC CCC GGC AAC GGG CCG GCG GAC    350
Gly Glu Arg Tyr Glu Met Gly Arg Arg Pro Gly Asn Gly Pro Ala Asp
        35                  40                  45
GAA GGC TGG TGG ACG GCC GCG GAT GCA CCG ACA GGC GCG GAC GTG GAC    398
Glu Gly Trp Trp Thr Ala Ala Asp Ala Pro Thr Gly Ala Asp Val Asp
    50                  55                  60
TAC GGA TAC CTG CTC GAC GGC GAC GAA ATC CCG CTG CCG GAC CCC CGG    446
Tyr Gly Tyr Leu Leu Asp Gly Asp Glu Ile Pro Leu Pro Asp Pro Arg
65                  70                  75                  80
ACC CGC CGC CAG CCC GAA GGC GTC CAT GCC CTG TCC CGG ACC TTC GAC    494
Thr Arg Arg Gln Pro Glu Gly Val His Ala Leu Ser Arg Thr Phe Asp
                85                  90                  95
CCC GGC GCC CAC CGC TGG CAG GAC GCC GGG TGG CAG GGC AGG GAA CTC    542
Pro Gly Ala His Arg Trp Gln Asp Ala Gly Trp Gln Gly Arg Glu Leu
            100                 105                 110
CAG GGC TCC GTG ATT TAC GAA CTC CAC ATC GGA ACG TTC ACG CCG GAA    590
Gln Gly Ser Val Ile Tyr Glu Leu His Ile Gly Thr Phe Thr Pro Glu
        115                 120                 125
GGG ACG CTG GAC GCC GCC GCG GGC AAG CTG GAC TAC CTC GCC GGC CTG    638
Gly Thr Leu Asp Ala Ala Ala Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala Gly Leu
    130                 135                 140
GGC ATC GAC TTC ATT GAG CTG CTG CCC GTG AAT GCC TTC AAC GGC ACG    686
Gly Ile Asp Phe Ile Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn Gly Thr
145                 150                 155                 160
CAC AAC TGG GGC TAC GAC GGC GTC CAG TGG TTT GCC GTG CAT GAA GGC    734
His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln Trp Phe Ala Val His Glu Gly
                165                 170                 175
```

TAC GGC GGG CCT GCG GCG TAC CAG CGG TTC GTG GAT GCG GCC CAC GCG 782
Tyr Gly Gly Pro Ala Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Ala His Ala
180 185 190
GCC GGC CTC GGC GTC ATC CAG GAC GTG GTC TAC AAC CAC CTC GGG CCG 830
Ala Gly Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu Gly Pro
195 200 205
AGC GGG AAC TAC CTC CCC AGG TAC GGC CCG TAC CTC AAG CAC GGC GAA 878
Ser Gly Asn Tyr Leu Pro Arg Tyr Gly Pro Tyr Leu Lys His Gly Glu
210 215 220
GGC AAC ACC TGG GGC GAT TCG GTC AAC CTG GAC GGG CCG GGA TCC GAC 926
Gly Asn Thr Trp Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro Gly Ser Asp
225 230 235 240
CAC GTC CGC CAG TAC ATC CTG GAC AAC GTG GCC ATG TGG CTG CGC GAC 974
His Val Arg Gln Tyr Ile Leu Asp Asn Val Ala Met Trp Leu Arg Asp
245 250 255
TAC CGG GTG GAC GGC CTC CGC CTG GAC GCC GTC CAC GCC CTG AAG GAT 1022
Tyr Arg Val Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu Lys Asp
260 265 270
GAG CGG GCC GTC CAC ATC CTG GAG GAG TTC GGC GCG CTG GCG GAC GCC 1070
Glu Arg Ala Val His Ile Leu Glu Glu Phe Gly Ala Leu Ala Asp Ala
275 280 285
CTG TCG TCC GAA GGC GGC CGC CCG CTG ACC CTC ATC GCC GAG TCC GAC 1118
Leu Ser Ser Glu Gly Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu Ser Asp
290 295 300
CTC AAC AAT CCG CGG CTG CTG TAC CCC CGG GAT GTC AAC GGC TAC GGA 1166
Leu Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro Arg Asp Val Asn Gly Tyr Gly
305 310 315 320
CTG GCC GGC CAG TGG AGC GAC GAC TTC CAC CAC GCC GTG CAC GTC AAC 1214
Leu Ala Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His His Ala Val His Val Asn

```
                325                 330                 335
GTC AGC GGG GAA ACC ACC GGC TAC TAC AGC GAC TTC GAC TCG CTC GGA   1262
Val Ser Gly Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp Phe Asp Ser Leu Gly
            340                 345                 350
GCC CTC GCC AAG GTC CTG CGT GAC GGG TTC TTC CAC GAC GGC AGC TAC   1310
Ala Leu Ala Lys Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His Asp Gly Ser Tyr
        355                 360                 365
TCC AGC TTC CGC GGC CGC TGC CAC GGC CGG CCG ATC AAC TTC AGC GCC   1358
Ser Ser Phe Arg Gly Arg Cys His Gly Arg Pro Ile Asn Phe Ser Ala
    370                 375                 380
GTG CAT CCG GCC GCG CTG GTG GTC TGC TCA CAG AAC CAT GAC CAG ATC   1406
Val His Pro Ala Ala Leu Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp Gln Ile
385                 390                 395                 400
GGC AAC CGG GCC ACC GGG GAC CGG CTG TCC CAG TCA CTT CCG TAC GGC   1454
Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp Arg Leu Ser Gln Ser Leu Pro Tyr Gly
                405                 410                 415
AGC CTG GCC CTG GCC GCC GTG CTG ACC CTC ACC GGT CCG TTC ACG CCC   1502
Ser Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu Thr Leu Thr Gly Pro Phe Thr Pro
            420                 425                 430
ATG CTG TTC ATG GGA GAG GAA TAC GGG GCC ACC ACC CCG TGG CAG TTC   1550
Met Leu Phe Met Gly Glu Glu Tyr Gly Ala Thr Thr Pro Trp Gln Phe
        435                 440                 445
TTC ACC TCG CAC CCT GAA CCC GAG CTG GGC AAG GCC ACG GCC GAG GGC   1598
Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ala Glu Gly
    450                 455                 460
AGG ATC AGG GAG TTC GAG CGC ATG GGG TGG GAT CCC GCC GTC GTG CCC   1646
Arg Ile Arg Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro
465                 470                 475                 480
GAT CCG CAG GAT CCG GAG ACC TTC ACC CGC TCC AAA CTG GAC TGG GCG   1694
```

```
Asp Pro Gln Asp Pro Glu Thr Phe Thr Arg Ser Lys Leu Asp Trp Ala
                485                 490                 495
GAA GCG TCC GCC GGC GAT CAT GCC CGC CTC CTG GAG CTG TAC CGC TCG   1742
Glu Ala Ser Ala Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu Tyr Arg Ser
            500                 505                 510
CTT ATC ACG CTG CGG CGG TCA ACT CCG GAG CTC GCG CGC CTG GGC TTT   1790
Leu Ile Thr Leu Arg Arg Ser Thr Pro Glu Leu Ala Arg Leu Gly Phe
        515                 520                 525
GCG GAC ACC GCC GTC GAG TTC GAC GAC GAC GCC CGC TGG CTC CGT TAT   1838
Ala Asp Thr Ala Val Glu Phe Asp Asp Asp Ala Arg Trp Leu Arg Tyr
    530                 535                 540
TGG CGC GGA GGC GTG CAG GTG GTG CTG AAC TTC GCG GAC CGT CCC ATC   1886
Trp Arg Gly Gly Val Gln Val Val Leu Asn Phe Ala Asp Arg Pro Ile
545                 550                 555                 560
AGC CTG GAC CGG CCG GGA ACC GCG CTG CTG CTC GCC ACC GAC GAC GCC   1934
Ser Leu Asp Arg Pro Gly Thr Ala Leu Leu Leu Ala Thr Asp Asp Ala
                565                 570                 575
GTC CGG ATG GAC GGA GTC CAG GTG GAG CTG CCG CCG CTG AGC GCC GCG   1982
Val Arg Met Asp Gly Val Gln Val Glu Leu Pro Pro Leu Ser Ala Ala
            580                 585                 590
GTT CTG CGC GAC                                                  1994
Val Leu Arg Asp
        595
TGAGCGTGCG CGCCTTCGGG GCGGGCGTCC TTCCGGTGAC CGGATGCTGG ACGCCCGCCC 2054
CGCAGCTCCA CAGGCGCTGG CAGGATGGAA CGTATGACTT TTCTGGCAGC GGACAACCGC 2114
TACGAAACCA TGCCATACCG CCGCGTCGGA CGCAGCGGGC TGAAGCT               2161
```

【０１００】

配列番号：6
配列の長さ：2056
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
配列の特徴
起源
生物名：アルスロバクター・スピーシーズ(Arthrobacter sp.)
株名：Q36(FERM BP-4316)
配列の特徴
特徴を表わす記号：5´UTR
存在位置：1..89
特徴を決定した方法：E
特徴を表わす記号：mat peptide
存在位置：90..1883
特徴を決定した方法：S
特徴を表わす記号：3´UTR
存在位置：1884..2056
特徴を決定した方法：E
配列

```
GCCGGCTTCG GACCGGGGGC AGTGAAGATC GCCGACATCT TCCGGTCGTT CCCCGTTGCG   60
CTGCTGGTGC CGCAGACAGG AGGAGAGTC                                     89
ATG ACG CAC ACC TAC CCG CGG GAA GCC GCG AAA CCC GTC CTG GGC CCC     137
Met Thr His Thr Tyr Pro Arg Glu Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Pro
1               5                   10                  15
GCA CGC TAC GAC GTC TGG GCG CCC AAC GCT GAA TCC GTG ACG CTG CTG     185
Ala Arg Tyr Asp Val Trp Ala Pro Asn Ala Glu Ser Val Thr Leu Leu
            20                  25                  30
```

GCC GGC GGG GAG CGC TAC GCC ATG CAG CGC CGG GCC GAG ACC GGG CCG 233
Ala Gly Gly Glu Arg Tyr Ala Met Gln Arg Arg Ala Glu Thr Gly Pro
35 40 45
GAG GAC GCC GGC TGG TGG ACC GCC GCC GGC GCG CCT ACG GAT GGC AAC 281
Glu Asp Ala Gly Trp Trp Thr Ala Ala Gly Ala Pro Thr Asp Gly Asn
50 55 60
GTG GAC TAC GGG TAC CTT CTG GAC GGC GAC GAA ACA CCG CTT CCG GAT 329
Val Asp Tyr Gly Tyr Leu Leu Asp Gly Asp Glu Thr Pro Leu Pro Asp
65 70 75 80
CCA CGG ACC CGC CGC CAG CCC GAC GGC GTC CAC GCC CTG TCC CGC ACG 377
Pro Arg Thr Arg Arg Gln Pro Asp Gly Val His Ala Leu Ser Arg Thr
85 90 95
TTC GAC CCG TCC GCG TAC AGC TGG CAG GAC GAC GCC TGG CAG GGC AGG 425
Phe Asp Pro Ser Ala Tyr Ser Trp Gln Asp Asp Ala Trp Gln Gly Arg
100 105 110
GAA CTG CAG GGC GCC GTC ATC TAC GAG CTC CAC CTC GGA ACA TTC ACG 473
Glu Leu Gln Gly Ala Val Ile Tyr Glu Leu His Leu Gly Thr Phe Thr
115 120 125
CCC GAA GGG ACG CTG GAG GCG GCC GCC GGA AAG CTG GAC TAC CTC GCC 521
Pro Glu Gly Thr Leu Glu Ala Ala Ala Gly Lys Leu Asp Tyr Leu Ala
130 135 140
GGC TTG GGC GTC GAC TTC ATC GAG CTG CTG CCG GTG AAC GCT TTC AAC 569
Gly Leu Gly Val Asp Phe Ile Glu Leu Leu Pro Val Asn Ala Phe Asn
145 150 155 160
GGC ACG CAC AAC TGG GGT TAC GAC GGT GTC CAG TGG TTC GCT GTG CAC 617
Gly Thr His Asn Trp Gly Tyr Asp Gly Val Gln Trp Phe Ala Val His
165 170 175
GAG GCA TAC GGC GGG CCG GAA GCG TAC CAG CGG TTC GTC GAC GCC GCC 665
Glu Asp Tyr Gly Gly Pro Glu Ala Tyr Gln Arg Phe Val Asp Ala Ala

```
            180                 185                 190
CAC GCC GCA GGC CTT GGC GTG ATC CAG GAC GTG GTC TAC AAC CAC CTC    713
His Ala Ala Gly Leu Gly Val Ile Gln Asp Val Val Tyr Asn His Leu
        195                 200                 205
GGC CCC AGC GGG AAC TAC CTG CCG CGG TTC GGG CCG TAC CTC AAG CAG    761
Gly Pro Ser Gly Asn Tyr Leu Pro Arg Phe Gly Pro Tyr Leu Lys Gln
    210                 215                 220
GGC GAG GGT AAC ACG TGG GGC GAC TCG GTG AAC CTG GAC GGG CCC GGC    809
Gly Glu Gly Asn Thr Trp Gly Asp Ser Val Asn Leu Asp Gly Pro Gly
225                 230                 235                 240
TCC GAC CAT GTG CGC CGG TAC ATC CTG GAC AAC CTG GCC ATG TGG CTG    857
Ser Asp His Val Arg Arg Tyr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Met Trp Leu
                245                 250                 255
CGT GAC TAC CGG GTG GAC GGC CTG CGG CTG GAC GCC GTC CAC GCC CTG    905
Arg Asp Tyr Arg Val Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Leu
            260                 265                 270
AAG GAT GAG CGG GCG GTG CAC ATC CTG GAG GAC TTC GGG GCG CTG GCC    953
Lys Asp Glu Arg Ala Val His Ile Leu Glu Asp Phe Gly Ala Leu Ala
        275                 280                 285
GAT CAG ATC TCC GCC GAG GTG GGA CGG CCG CTG ACG CTC ATC GCC GAG   1001
Asp Gln Ile Ser Ala Glu Val Gly Arg Pro Leu Thr Leu Ile Ala Glu
    290                 295                 300
TCC GAC CTC AAC AAC CCG CGG CTG CTG TAC CCG CGG GAC GTC AAC GGG   1049
Ser Asp Leu Asn Asn Pro Arg Leu Leu Tyr Pro Arg Asp Val Asn Gly
305                 310                 315                 320
TAC GGG CTG GAA GGG CAG TGG AGC GAC GAC TTC CAC CAC GCC GTC CAC   1097
Tyr Gly Leu Glu Gly Gln Trp Ser Asp Asp Phe His His Ala Val His
                325                 330                 335
GTC AAC GTC ACC GGC GAA ACC ACC GGC TAC TAC AGT GAC TTC GAC TCG   1145
```

```
Val Asn Val Thr Gly Glu Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Asp Phe Asp Ser
            340                 345                 350
CTG GCC GCC CTC GCC AAG GTG CTC CGG GAC GGC TTC TTC CAC GAC GGC   1193
Leu Ala Ala Leu Ala Lys Val Leu Arg Asp Gly Phe Phe His Asp Gly
        355                 360                 365
AGC TAC TCC AGC TTC CGG GAA CGC CAC CAC GGA CGG CCG ATT AAT TTC   1241
Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Glu Arg His His Gly Arg Pro Ile Asn Phe
    370                 375                 380
AGC GCC GTA CAC CCA GCC GCC CTG GTG GTC TGT TCG CAG AAC CAC GAC   1289
Ser Ala Val His Pro Ala Ala Leu Val Val Cys Ser Gln Asn His Asp
385                 390                 395                 400
CAG ATC GGC AAC CGT GCC ACG GGG GAC CGG CTC TCC CAG ACC CTG CCG   1337
Gln Ile Gly Asn Arg Ala Thr Gly Asp Arg Leu Ser Gln Thr Leu Pro
                405                 410                 415
TAC GGA AGC CTG GCC CTC GCT GCG GTG CTG ACC CTG ACG GGA CCC TTC   1385
Tyr Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Val Leu Thr Leu Thr Gly Pro Phe
            420                 425                 430
ACG CCC ATG CTG CTC ATG GGC GAG GAG TAC GGC GCC AGC ACG CCG TGG   1433
Thr Pro Met Leu Leu Met Gly Glu Glu Tyr Gly Ala Ser Thr Pro Trp
        435                 440                 445
CAG TTT TTC ACC TCG CAC CCG GAG CCG GAG CTC GGC AAG GCC ACC GCG   1481
Gln Phe Phe Thr Ser His Pro Glu Pro Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ala
    450                 455                 460
GAG GGC CGG ATC AAG GAG TTC GAG CGC ATG GGG TGG GAT CCC GCC GTC   1529
Glu Gly Arg Ile Lys Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val
465                 470                 475                 480
GTG CCC GAT CCC CAG GAT CCT GAG ACG TTC CGC CGG TCC AAG CTG GAC   1577
Val Pro Asp Pro Gln Asp Pro Glu Thr Phe Arg Arg Ser Lys Leu Asp
                485                 490                 495
```

```
TGG GCG GAA GCC GCC GAA GGC GAC CAT GCC CGG CTG CTG GAG CTG TAC   1625
Trp Ala Glu Ala Ala Glu Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu Tyr
            500                 505                 510
CGT TCG CTC ACC GCC CTG CGC CGC TCC ACG CCG GAC CTC ACC AAG CTG   1673
Arg Ser Leu Thr Ala Leu Arg Arg Ser Thr Pro Asp Leu Thr Lys Leu
        515                 520                 525
GGC TTC GAG GAC ACG CAG GTG GCG TTC GAC GAG GAC GCC CGC TGG CTG   1721
Gly Phe Glu Asp Thr Gln Val Ala Phe Asp Glu Asp Ala Arg Trp Leu
    530                 535                 540
CGG TTC CGC CGG GGT GGC GTG CAG GTG CTG CTC AAC TTC TCG GAA CAG   1769
Arg Phe Arg Arg Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Asn Phe Ser Glu Gln
545                 550                 555                 560
CCC GTG AGC CTG GAC GGG GCG GGC ACG GCC CTG CTG CTG GCC ACC GAC   1817
Pro Val Ser Leu Asp Gly Ala Gly Thr Ala Leu Leu Leu Ala Thr Asp
                565                 570                 575
GAC GCC GTC CGG CTA GAA GGT GAG CGT GCG GAA CTC GGT CCG CTG AGC   1865
Asp Ala Val Arg Leu Glu Gly Glu Arg Ala Glu Leu Gly Pro Leu Ser
            580                 585                 590
GCC GCC GTC GTC AGC GAC                                          1883
Ala Ala Val Val Ser Asp
        595
TGACGTTTTC TTGGGGGCGG CGTCCACCGC CGGTGACCGG ATGGTGGACG TCCGCCCCGA 1943
AGCCTCGGCG CGGCTGGCAG GATGGAACGC ATGACTTATG TGGCCTCGGA CACCCGCTAC 2003
GACACCATGC CCTACCGCCG CGTCGGACGC AGCGGCCTCA AACTGCCGGC CAT         2056
```

【０１０１】

配列番号：7
配列の長さ：20
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：N末端フラグメント
配列

Ala Lys Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala
1 5 10 15
Gly Thr Val
20

【０１０２】
配列番号：８配列の長さ：２０配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：N末端フラグメント
配列

Thr His Thr Tyr Pro Arg Glu Ala Ala Lys Pro Val Leu Gly Pro Ala Arg
1 5 10 15
Tyr Asp Val
20

【０１０３】
配列番号：9
配列の長さ：21
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント
配列

Pro Val Gln Gly Ala Gly Arg Phe Asp Ile Trp Ala Pro Glu Ala Gly Thr
1 5 10 15
Val Thr Leu Leu
20

【０１０４】

配列番号：10
配列の長さ：17
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント
配列

Leu Asp Trp Ala Glu Ala Ser Ala Gly Asp His Ala Arg Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15

【０１０５】
配列番号：11
配列の長さ：20
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント
配列

Glu Phe Glu Arg Met Gly Trp Asp Pro Ala Val Val Pro Asp Pro Gln Asp
1 5 10 15
Pro Glu Thr
20

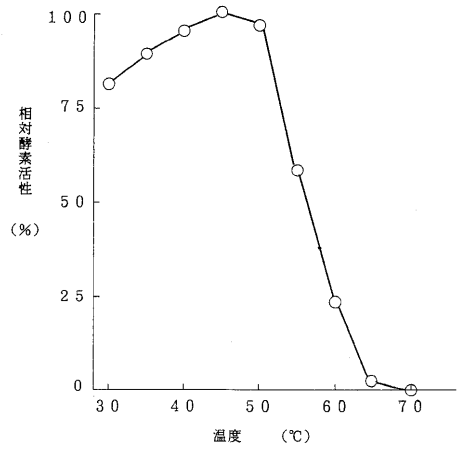
【０１０６】
配列番号：12
配列の長さ：20
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント
配列

Pro Val Leu Gly Pro Ala Arg Tyr Asp Val Trp Ala Pro Asn Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Thr Leu
20

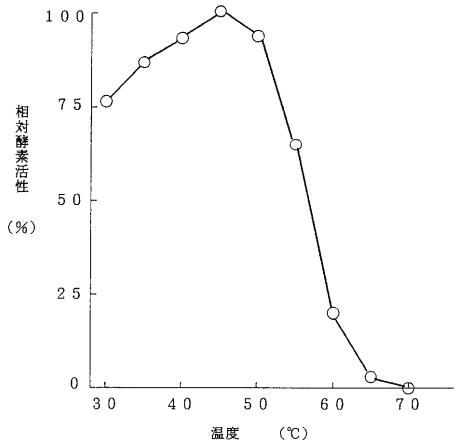
【図面の簡単な説明】

【図１】酵素Ｍ－１１の至適温度を示す図である。
【図２】酵素Ｑ３６の至適温度を示す図である。
【図３】酵素Ｍ－１１の至適ｐＨを示す図である。
【図４】酵素Ｑ３６の至適ｐＨを示す図である。
【図５】酵素Ｍ－１１の熱安定性を示す図である。
【図６】酵素Ｑ３６の熱安定性を示す図である。
【図７】酵素Ｍ－１１のｐＨ安定性を示す図である。
【図８】酵素Ｑ３６のｐＨ安定性を示す図である。
【図９】この発明による組換えＤＮＡ　ｐＢＭＵ２７の制限酵素地図を示す図である。図中、太線で表示した部分は酵素Ｍ－１１をコードするＤＮＡである。
【図１０】この発明による組換えＤＮＡ　ｐＢＲＴ３２の制限酵素地図を示す図である。図中、太線で表示した部分は酵素Ｑ３６をコードするＤＮＡである。

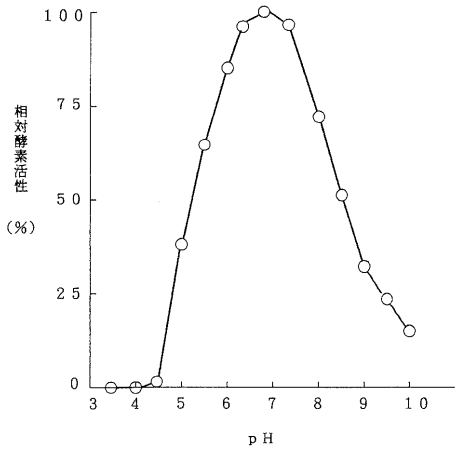
【図１】



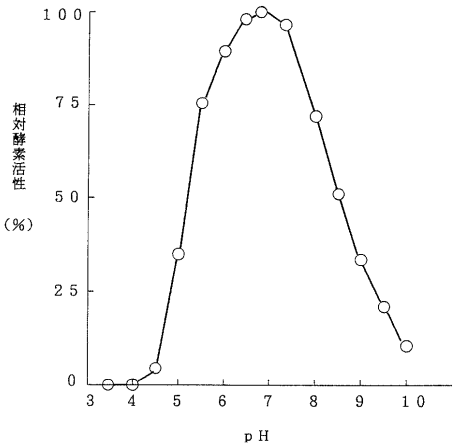
【図２】



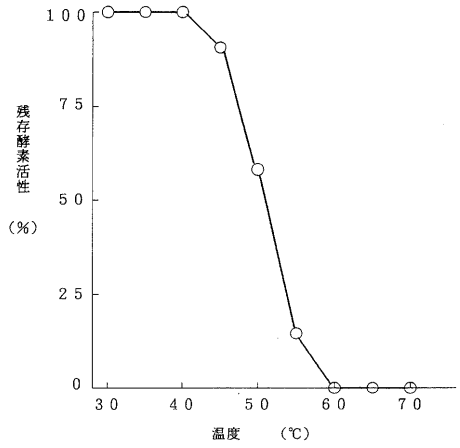
【図３】


100
75
50
25
0
相対酵素活性
（%）
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

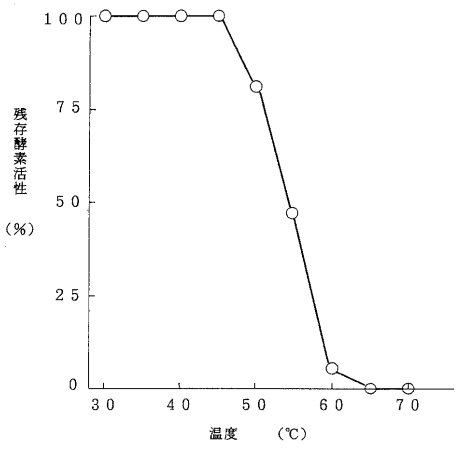
【図４】


100
75
50
25
0
相対酵素活性
（%）
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

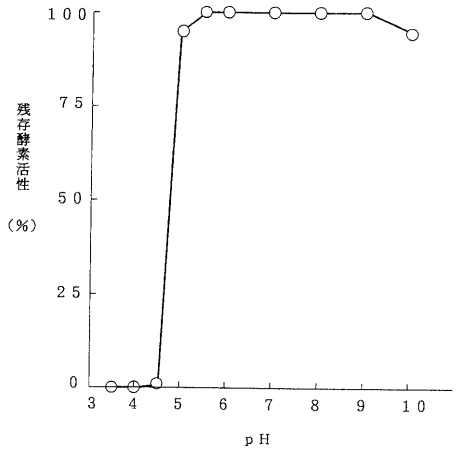
【図５】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
（%）
30
40
50
60
70
温度　（℃）

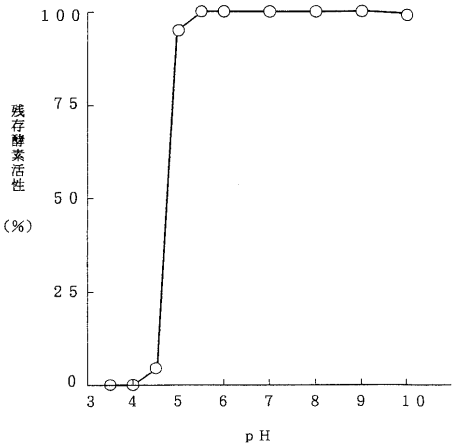
【図６】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
（%）
30
40
50
60
70
温度　（℃）

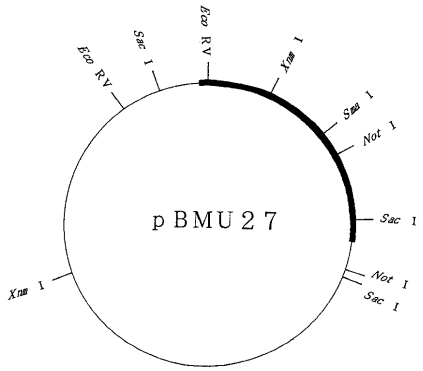
【図７】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
(%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

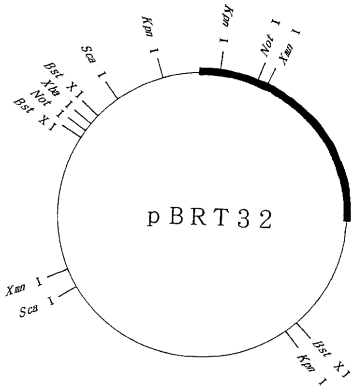
【図８】


100
75
50
25
0
残存酵素活性
(%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

【図９】


pBMU27
Eco RV
Sac I
Eco RV
Xba I
Sca I
Not I
Sac I
Not I
Sac I
Xba I

【図１０】


pBRT32
Kpn I
Sca I
Bst XI
Xba I
Not I
Bst XI
Kpn I
Not I
Xba I
Xba I
Sca I
Bst XI
Kpn I

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI		
Ｃ１２Ｒ 1:19)		Ｃ１２Ｒ 1:41		
(Ｃ１２Ｎ 9/24		Ｃ１２Ｎ 15/00	ＺＮＡＡ	
Ｃ１２Ｒ 1:19)		Ｃ１２Ｒ 1:06		
(Ｃ１２Ｎ 15/09		Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｒ 1:41)		Ｃ１２Ｒ 1:19		
(Ｃ１２Ｎ 15/09		Ｃ１２Ｎ 9/24		
Ｃ１２Ｒ 1:06)		Ｃ１２Ｒ 1:19		

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)

C12N 9/14-9/46

JSTPlus(JOIS)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq