(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4035855号
(P4035855)
(45)発行日　平成20年1月23日(2008.1.23)　(24)登録日　平成19年11月9日(2007.11.9)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12P 13/08	(2006.01)	C12P	13/08	A

請求項の数 6　(全 68 頁)

(21)出願番号　特願平8-142812
(22)出願日　平成8年6月5日(1996.6.5)
(65)公開番号　特開平9-322774
(43)公開日　平成9年12月16日(1997.12.16)
審査請求日　平成14年12月17日(2002.12.17)

(73)特許権者　000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋１丁目１５番１号
(74)代理人　100089244
弁理士　遠山　勉
(74)代理人　100090516
弁理士　松倉　秀実
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之
(72)発明者　平野　聖子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内
(72)発明者　杉本　雅一
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｌ－リジンの製造法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするＤＮＡ配列と、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ配列とを含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えＤＮＡ。
【請求項２】
ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするＤＮＡが、配列表配列番号５に示すアミノ酸配列を有するタンパク質又は配列表配列番号５に示すアミノ酸配列において１もしくは２以上のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列を有し、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする請求項１記載の組換えＤＮＡ。
【請求項３】
ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ配列が、配列表配列番号９に示すアミノ酸配列を有するタンパク質又は配列番号９に示すアミノ酸配列において１もしくは２以上のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を有するアミノ酸配列を有し、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする請求項１記載の組換えＤＮＡ。
【請求項４】
ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ及びジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼの細胞中の活性が増強されたコリネ型細菌。

【請求項５】
請求項１～３のいずれか１項に記載の組換えＤＮＡが導入されたことにより形質転換された請求項４記載のコリネ型細菌。
【請求項６】
請求項４又は５に記載のコリネ型細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にＬ－リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からＬ－リジンを採取することを特徴とするＬ－リジンの製造法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、アミノ酸などの発酵生産に用いられているコリネ型細菌に遺伝子操作の手法を用いて改変を加え、該微生物を培養することによるＬ－リジンの製法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
飼料添加物として用いられているＬ－リジンは通常、コリネ型細菌のＬ－リジン生産変異株を使って発酵法により生産されている。現在知られている種々のＬ－リジン生産菌はコリネ型細菌の野生株の人工変異により作られている。
【０００３】
一方、コリネ型細菌において、菌体内で自律増殖可能でかつ、薬剤耐性マーカー遺伝子を有するベクタープラスミド（米国特許第4514502号参照）、遺伝子の菌体への導入方法（特開平2-207791号等）が開示されており、これらの技術を用いたＬ－スレオニンまたはＬ－イソロイシン生産菌育成の可能性が開示されている（米国特許第4452890号、及び米国特許第4442208号参照）。また、Ｌ－リジン生産菌育成に関しても、ベクタープラスミドにＬ－リジン生合成に関与する遺伝子を組み込み、菌体内で増幅させる技術（特開昭56-160997号などがある）がある。
【０００４】
Ｌ－リジン生合成遺伝子として、例えば、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子（特開平7-75578）やジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（Ishino, S. et al., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)）のように、Ｌ－リジン生合成に関与する遺伝子をクローニングした例や、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-87788）、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子（特公平6-55149）、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-62994）のように、遺伝子の増幅がＬ－リジン生産性に影響を与える例が知られている。
【０００５】
上記のように、Ｌ－リジン生合成遺伝子の増幅によって、Ｌ－リジン生産性向上に一定の成果が得られている場合がある。しかし、遺伝子によっては、Ｌ－リジン生産性が向上するものの生育が低下し、結果としてＬ－リジン生産速度が低下することがある。
【０００６】
一方、Ｌ－リジン生合成遺伝子の増強により生育の改善が図られた例は報告されていない。また、コリネ型細菌においては、Ｌ－リジン生合成遺伝子を複数個組み合わせ、生育を抑制せずにＬ－リジン収率の大幅な改善に成功した例は知られていないのが現状である。
【０００７】
【発明が解決しようとする課題】
本発明は、上記観点からなされたものであり、コリネ型細菌においてＬ-リジン生合成遺伝子を複数個組み合わせて増強し、生育を抑制せずにＬ－リジン収率を改善することを課題とする。
【０００８】
微生物を用いた物質の発酵生産を行なう場合、投入した原料に対する目的物質の収率と並んで、生産速度は極めて重要な因子であり、設備当りの生産速度を上げることにより目的物質を大幅に安価に製造することが出来る。そのため、発酵収率と生産速度を両立させる

ことは工業的に極めて重要である。本発明は、コリネ型細菌を用いたＬ－リジンの発酵生産を行なうに当たり、以上の様な課題の解決方法を提示するものである。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

本発明の要旨は、コリネ型細菌において、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするＤＮＡ配列（以下、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを「ＤＤＣ」、ＤＤＣ蛋白をコードする遺伝子を「lysA」ともいう。）と、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ配列（以下、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼを「ＤＤＨ」、ＤＤＨ蛋白をコードする遺伝子を「ddh」ともいう。）とを併せて増強することにより、これらを単独で増強した場合と比べ、生育が改善され、Ｌ－リジン生産速度を向上させることができることにある。

【００１０】

すなわち本発明は、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ配列と、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするＤＮＡ配列とを含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えＤＮＡを提供する。

【００１１】

また本発明は、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ配列、及びジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするＤＮＡ配列が増強されたコリネ型細菌を提供する。

【００１２】

さらに本発明は、前記コリネ型細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にＬ－リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からＬ－リジンを採取することを特徴とするＬ－リジンの製造法を提供する。

【００１３】

尚、本発明においてコリネ型細菌とは、バージーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bacteriology）第8版599頁（1974）に定義されている一群の微生物であり、好気性，グラム陽性，非抗酸性，胞子形成能を有しない桿菌であり、コリネバクテリウム属細菌、及び従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属菌として統合されたブレビバクテリウム属細菌、さらにコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。

【００１４】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

＜１＞本発明に用いられるＬ－リジン生合成遺伝子の取得

本発明に用いるＬ－リジン生合成遺伝子は、ＤＮＡ供与体である細菌から染色体ＤＮＡを調製し、プラスミドベクター等を用いて染色体ＤＮＡライブラリーを作製し、このライブラリーから所望の遺伝子を保持する株を選択し、選択された株からその遺伝子が挿入された組換えＤＮＡを回収することによって得られる。本発明に用いるＬ－リジン生合成遺伝子のＤＮＡ供与体としては、所望のＬ－リジン生合成遺伝子がコリネ型細菌細胞中で機能する酵素タンパク質を発現するものであれば、特に制限されないが、コリネ型細菌が好ましい。

【００１５】

コリネ型細菌由来のlysA及びddh遺伝子は、いずれも配列が知られているので、ポリメラーゼチェインリアクション法（ＰＣＲ：polymerase chain reaction； White,T.J. et al ;Trends Genet. 5,185(1989)参照）によって増幅することにより取得することができる。

【００１６】

以下に、本発明に用いる各Ｌ－リジン生合成遺伝子を取得する方法を例示する。

【００１７】

（１）lysAの取得
コリネ型細菌染色体からlysAを単離するには、例えば、斎藤、三浦の方法（H.Saito and K.Miura Biochem.Biophys.Acta, 72,619,(1963)）等により染色体ＤＮＡを調製し、ポリメラーゼチェインリアクション法（ＰＣＲ：polymerase chain reaction； White,T.J. et al ;Trends Genet. 5,185(1989)参照）によりlysAを増幅することによって行なうことができる。染色体ＤＮＡ供与菌としては特に制限されないが、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株が挙げられる。
【００１８】
コリネ型細菌においては、lysAはargS（アルギニルｰtRNAシンターゼ遺伝子）とともにオペロンを形成しており、argSの下流にlysAが存在している。lysAの発現は、argSの上流にあるプロモーターによって調節を受ける（Journal of Bacteriology Nov., 7356-7362 (1993)参照）。これらの遺伝子の塩基配列は、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知であり（Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830 (1990)、Molecular and General Genetics 212, 112-119 (1988)参照）、これを基にしてPCR用DNAプライマーを調製することができる。このようなDNAプライマーとして具体的には、配列表の配列番号１（Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830 (1990)に記載されている塩基配列において塩基番号１１～３３に相当する）及び配列番号２（Molecular and General Genetics 212, 112-119 (1988)に記載の塩基配列において塩基番号１３７０～１３９２に相当する）に示す塩基配列を有する各々23merのＤＮＡが挙げられる。
【００１９】
後記実施例では、lysAを増強するために、プロモーター、argS及びlysAを含むＤＮＡ断片を用いたが、argSは本発明に必須ではなく、lysAがプロモーターの直下に連結されたＤＮＡ断片を用いてもよい。
【００２０】
argS及びlysAを含むＤＮＡ断片の塩基配列及びこの配列がコードすると予想されるアミノ酸配列の一例を配列番号３に示す。また、argSがコードするアミノ酸配列の一例を配列番号４に、lysAがコードするアミノ酸配列の一例を配列番号５に示す。本発明には、このアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片の他、配列番号５に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、すなわちＤＤＣ活性に実質的に影響がない限り、１又は２以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片も同様に使用できる。
【００２１】
ＤＮＡの合成はApplied Biosystems社製ＤＮＡ合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて（Tetrahedron Letters(1981),22,1859参照）常法に従って合成できる。PCR反応は、宝酒造（株）製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により 指定された方法に従って行うことができる。
【００２２】
ＰＣＲ法により増幅されたlysAは、E. coli及び／又はコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターＤＮＡに接続して組換えＤＮＡを調製し、これをE. coli細胞に導入しておくと、後の操作がしやすくなる。E. coli細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。
【００２３】
また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつＤＮＡ断片を挿入すると、E. coli及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。
【００２４】
このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をかっこ内に示した。

【００２５】

pHC4　エシェリヒア・コリAJ12617(FERM BP-3532)

pAJ655　エシェリヒア・コリAJ11882(FERM BP-136)

コリネバクテリウム・グルタミカムSR8201(ATCC39135)

pAJ1844　エシェリヒア・コリAJ11883(FERM BP-137)

コリネバクテリウム・グルタミカムSR8202(ATCC39136)

pAJ611　エシェリヒア・コリAJ11884(FERM BP-138)

pAJ3148　コリネバクテリウム・グルタミカムSR8203(ATCC39137)

pAJ440　バチルス・ズブチリスAJ11901(FERM BP-140)

【００２６】

これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びＳＤＳを用いて溶菌し、３００００×ｇで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド－エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【００２７】

E. coliにプラスミドを導入して形質転換するには D.M.Morrisonの方法（Methods in Enzymology, 68, 326, 1979）あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してＤＮＡの透過性を増す方法（Mandel,M. and Higa,A.,J.Mol.,Biol.,53,159(1970)）等により行うことができる。

【００２８】

（２）ddhの取得

ddhを含むＤＮＡ断片は、コリネ型細菌染色体からPCRにより調製することができる。ＤＮＡ供与菌としては特に制限されないが、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株が挙げられる。

【００２９】

DDH遺伝子は、コリネバクテリウム　グルタミカムにおいて既知であり（Ishino, S. et al., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)）、これを基にしてPCR用プライマーを調製することができる。このようなDNAプライマーとして具体的には、配列表の配列番号６及び７に記載の塩基配列を有する各々20merのＤＮＡが挙げられる。ＤＮＡの合成、PCR反応、得られたddhを含むプラスミドの調製等は、前記のlysAの場合と同様にして行うことができる。

【００３０】

ddhを含むＤＮＡ断片の塩基配列及びこの配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号８に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号９に示す。本発明には、このアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片の他、配列番号９に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、すなわちＤＤＨ活性に実質的に影響がない限り、１又は２以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片も同様に使用できる。

【００３１】

＜２＞本発明の組換えＤＮＡ及びコリネ型細菌

本発明のコリネ型細菌は、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするＤＮＡ（lysA）及びジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ（ddh）が増強されたものである。ここでＤＮＡ配列の「増強」とは、遺伝子のコピー数を高くする、プロモーターを強力なものを使用する、比活性の高い酵素をコードする遺伝子を使用する、あるいはこれらを組み合わせるなどして、そのＤＮＡによりコードされる酵素の細胞中の活性を高くすることをいう。

【００３２】
上記ＤＮＡを導入するコリネ型細菌は、Ｌ－リジン生産性を有するコリネ型細菌であり、Ｌ－リジン生産性の野生株又は人工変異株、遺伝子工学的にＬ－リジン生産性を増強されたコリネ型細菌等が挙げられる。Ｌ－リジン生産性の低い菌株であってもlysA及びddhを増強すれば、Ｌ－リジン生産性を向上させることができる。また、Ｌ－リジン生産性の高い菌株においても、lysA及びddhを増強することによって、一層Ｌ－リジン生産効率を高めることができる。
【００３３】
（１）コリネ型細菌のＬ－リジン生産性菌株
lysA及びddhを導入するＬ－リジン生産性のコリネ型細菌の例としては、例えば次のような菌株が挙げられる。
【００３４】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
（ブレビバクテリウム・ディバリカタム）	ATCC14020
（ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）	ATCC13869
（コリネバクテリウム・リリウム）	ATCC15990
（ブレビバクテリウム・フラバム）	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
ブレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC14068
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス	AJ12340(FERM BP-1539)

【００３５】
また、上記菌株以外にも、これらの菌株から誘導されたＬ－リジン生産能を有する変異株等も、lysA及びddhを増強する宿主として利用できる。この様な人工変異株としては次の様なものがある。Ｓ－（２－アミノエチル）－システイン（以下、「AEC」と略記する）耐性変異株（例えば、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ11082（NRRL B-11470）、特公昭56-1914号、特公昭56-1915号、特公昭57-14157号、特公昭57-14158号、特公昭57-30474号、特公昭58-10075号、特公昭59-4993号、特公昭61-35840号、特公昭62-24074号、特公昭62-36673号、特公平5-11958号、特公平7-112437号、特公平7-112438号参照））、その成長にＬ－ホモセリン等のアミ ノ酸を必要とする変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、AECに耐性を示し、更にＬ－ロイシン、Ｌ－ホモセリン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アラニン、Ｌ－バリン等のアミノ酸を要求する変異株（米国特許第3708395号及び第3825472号）、ＤＬ－α－アミノ－ε－カプロラクタム、α－アミノ－ラウリルラクタム、アスパラギン酸－アナログ、スルファ剤、キノイド、Ｎ－ラウロイルロイシンに耐性を示すＬ－リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素（デカルボキシラーゼ）または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すＬ－リジン生産変異株（特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特 開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号）、イノシトールまたは酢酸を要求するＬ－リジン生産変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、フルオロピルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すＬ－リジン生産変異株（特開昭55-9783号、特開昭53-86090号）、エチレングリコールに耐性を示し、Ｌ－リジンを生産するブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株（米国特許第4411997号）。
【００３６】

（２）遺伝子組換え技術によりＬ－リジン生産性が増強されたＬ－リジン生産性コリネ型細菌

Ｌ－リジン生合成に関与する酵素のうち、野生型ではフィードバック阻害を受ける酵素について、フィードバック阻害が解除された変異を有する酵素遺伝子を導入したり、lysA、ddh以外のＬ－リジン生合成遺伝子を増強することによって、遺伝子工学的にＬ－リジン生産性を増強されたコリネ型細菌であっても、lysA及びddhを増強することによって、一層Ｌ－リジン生産速度を向上させることができる。

【００３７】

上記のようなＬ－リジン生産性が増強されたコリネ型細菌としては、Ｌ－リジン及びＬ－スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ（以下、アスパルトキナーゼを「ＡＫ」ともいう。ＡＫ蛋白をコードする遺伝子を「lysC」、Ｌ－リジン及びＬ－スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたＡＫ蛋白をコードする遺伝子を「変異型lysC」ともいう。）を保持し、さらにジヒドロジピコリン酸レダクターゼ（以下「ＤＤＰＲ」ともいう。ＤＤＰＲ蛋白をコードする遺伝子を以下「dapB」ともいう。）をコードするＤＮＡ配列が増強されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌において、さらにジヒドロジピコリン酸シンターゼ（以下「ＤＤＰＳ」と略す。ＤＤＰＳ蛋白をコードする遺伝子を以下「dapA」ともいう。）をコードするＤＮＡ配列が増強されたものが挙げられる。以下に、上記の各Ｌ－リジン生合成遺伝子を取得する方法を例示する。

【００３８】

（ｉ）変異型lysCの取得

変異型lysCを含むＤＮＡ断片は、ＡＫ活性に対するＬ－リジン及びＬ－スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株から調製することができる（WO94/25605国際公開パンフレット）。このような変異株は、例えば、コリネ型細菌野生株に、通常の変異処理法、紫外線照射またはＮ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）等の変異剤処理を施し、変異処理した細胞群の中から取得することができる。ＡＫ活性の測定は、Miyajima,R et al;The Journal of Biochemistry(1968),63(2),139-148に記載される方法を用いることができる。このような変異株として、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（Brevibacterium lactofermentum）野生株ATCC13869株（現在の名称は、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)に変更されている）より変異処理により誘導されたＬ－リジン生産菌AJ3445（FERM P-1944）が最も好ましいものとして挙げられる。

【００３９】

また、変異型lysCは、野生型lysCを含むプラスミドＤＮＡをインビトロ変異処理することによっても得られる。さらに、ＡＫのＬ－リジン及びＬ－スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害を解除する変異が具体的に知られている（WO094/25605国際公開パンフレット）ので、この情報に基づいて部位特異的変異法等により、野生型lysCから調製することもできる。

【００４０】

コリネ型細菌の染色体DNAからのlysCの単離は、例えば、ＰＣＲ法によってlysCを増幅することによって行うことができる。ＤＮＡプライマーとしては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列（Molecular Microbiology(1991),5(5),1197-1204, Mol.Gen.Genet.(1990)224,317-324参照）を基にして、lysCをコードする約1643bpの領域を増幅すべく、配列表配列番号１０及び配列番号１１に示す塩基配列を有する23mer及び21merの一本鎖ＤＮＡが挙げられる。ＤＮＡの合成、PCR反応、得られたlysCを含むプラスミドの調製等は、前記のlysAの場合と同様にして行うことができる。

【００４１】

上記のようにしてＡＫ野生株からlysCを単離すれば野生型lysCが得られ、ＡＫ変異株からlysCを単離すれば変異型lysCが得られる。

野生型lysCを含むＤＮＡ断片の塩基配列の一例を、配列表配列番号１２に示す。この塩基

配列より推定される野生型ＡＫタンパク質のαサブユニットのアミノ酸配列をＤＮＡ配列と同時に配列表の配列番号１３に、アミノ酸配列のみを配列番号１４に示す。また、ＤＮＡ塩基配列より推定される野生型ＡＫタンパク質のβサブユニットのアミノ酸配列をＤＮＡと同時に配列表の配列番号１５に、アミノ酸配列のみを配列番号１６に示す。尚、各サブユニットとも、開始コドンにＧＴＧが用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニンを表すものである。

【００４２】

本発明に用いる変異型lysCとしては、Ｌ－リジン及びＬ－スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が解除されたＡＫをコードするものであれば特に制限されないが、野生型ＡＫのアミノ酸配列において、αサブユニットではＮ末端から２７９番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に、βサブユニットでは３０番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化する変異が挙げられる。ここで、野生型ＡＫのアミノ酸配列としては、具体的にはαサブユニットでは配列表配列番号１４に示すアミノ酸配列が、βサブユニットでは配列表配列番号１６に示すアミノ酸配列が挙げられる。

【００４３】

また、上記のアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基として好ましいものは、スレオニン残基、アルギニン残基、システイン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、チロシン残基及びバリン残基が挙げられる。

【００４４】

尚、置換されるアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する野生型ＡＫのアミノ酸配列がわずかに相異するものがあると予想される。このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するＡＫも本発明に使用することができる。さらに、ＡＫ活性、及びＬ－リジン及びＬ－スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害の解除に実質的に影響のない限り、他の１又は２以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するＡＫも使用できる。

【００４５】

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生型株であるAJ12036株（FERM BP-734）に変異型lysCプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、１９９２年４月１０日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM-P12918として寄託され、１９９５年２月１０日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4999の受託番号で寄託されている。

【００４６】

dapAを含むＤＮＡ断片は、コリネ型細菌染色体からPCRにより調製することができる。ＤＮＡ供与菌としては特に制限されないが、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株が挙げられる。

【００４７】

（ii）dapBの単離

dapBを含むＤＮＡ断片は、コリネ型細菌染色体からPCRにより調製することができる。ＤＮＡ供与菌としては特に制限されないが、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株が挙げられる。

【００４８】

ＤＤＰＲをコードするＤＮＡ配列は、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムにおいて既知であり（Journal of Bacteriology 175(9), 2743-2749 (1993)）、これを基にしてPCR用DNAプライマーを調製することができる。このようなDNAプライマーとして具体的には、配列表の配列番号２１及び２２に記載の塩基配列を有する各々23merのＤＮＡが挙げられる。ＤＮＡの合成、PCR反応、得られたdapBを含むプラスミドの調製等は、前記のlysCの場合と同様にして行うことができる。

【００４９】
dapBを含むＤＮＡ断片の塩基配列及びこの配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号２３に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号２４に示す。本発明には、このアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片の他、配列番号２４に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、すなわちＤＤＰＲ活性に実質的に影響がない限り、１又は２以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片も同様に使用できる。
【００５０】
E. coliJM109株に後記実施例で得られたdapBを含むプラスミドpCRDAPBを導入して得られた形質転換株AJ13107株は、１９９５年５月２６日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM BP-5114の受託番号で、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。
【００５１】
（iii）dapAの単離
ＤＤＰＳをコードするＤＮＡ配列は、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知であり（Nucleic Acids Research 18(21), 6421 (1990)、EMBL accession No.X53993参照）、これを基にしてPCR用DNAプライマーを調製することができる。このようなDNAプライマーとして具体的には、配列表の配列番号１７及び１８に記載の塩基配列を有する各々23merのＤＮＡが挙げられる。ＤＮＡの合成、PCR反応、得られたdapAを含むプラスミドの調製等は、前記のlysCの場合と同様にして行うことができる。
【００５２】
dapAを含むＤＮＡ断片の塩基配列及びこの配列から予想されるアミノ酸配列の一例を配列番号１９に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号２０に示す。本発明には、このアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片の他、配列番号２０に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、すなわちＤＤＰＳ活性に実質的に影響がない限り、１又は２以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入等による変異を有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片も同様に使用できる。
【００５３】
E. coliJM109株に後記実施例で得られたdapAを含むプラスミドpCRDAPAを導入して得られた形質転換株AJ13106株は、１９９５年５月２６日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM BP-5113の受託番号で、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。
【００５４】
以上示したようなＬ－リジン生産性のコリネ型細菌においてlysA及びddhを増強するには、具体的な例としては、これらの遺伝子をプラスミドベクター、トランスポゾン、ファージベクター等を用いて宿主に導入する。その際、低コピー型のベクターを用いてもある程度の増強は期待できるが、マルチコピー型のベクターを用いることが好ましい。そのようなベクターとして、上記pAJ655、pAJ1844、pAJ611、pAJ3148及びpAJ440等のプラスミドベクターが挙げられる。また、コリネ型細菌由来のトランスポゾンは、WO92/02627国際公開パンフレット、WO93/18151国際公開パンフレット、欧州特許公開0445385号、特開平6-46867号、Vertes, A. A. et al., Mol. Microbiol., 11, 739-746 (1994)、Bonamy, C., et al., Mol. Microbiol., 14, 571-581 (1994)、Vertes, A. A. et al., Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994)、Jagar, W. et al., FEMS Microbiology Letters, 126, 1-6 (1995)、特開平7-107976号、特開平7-327680号等に記載されている。
【００５５】
本発明のlysA及びddhが増強されたコリネ型細菌は、具体的には、例えばlysA及びddhを含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えＤＮＡを宿主コリネ型細菌に導入することによって、得られる。このような組換えＤＮＡは、例えば、前述のプラスミドベクター、トランスポゾン又はファージベクター等のベクターに、lysA及びddhを挿入することによって得られる。

【００５６】
lysA及びddhの各遺伝子の導入は、それぞれ別個のベクターを用いて宿主に順次導入してもよく、単一のベクターを用いて２種類の遺伝子を共に導入してもよい。別個のベクターを用いる場合には、遺伝子の導入の順序は問わないが、宿主での安定な分配保持機構を有し、互いに共存可能なベクターを用いることが好ましい。
【００５７】
宿主への組換えＤＮＡの導入の方法は、プラスミドの場合、電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によって行うことができる。トランスポゾンを用いた遺伝子の増幅は、プラスミドにトランスポゾンを搭載させて細胞内に導入し、トランスポゾンの転位を誘導することにより行なうことができる。
【００５８】
コリネ型細菌に変異型lysC、dapA及びdapBを導入する場合においても、これらの各遺伝子及びlysA及びddhの宿主細胞への導入は、それぞれ別個のベクターを用いて宿主に順次導入してもよく、単一のベクターを用いて２種類又は３種類以上の遺伝子を共に導入してもよい。
【００５９】
＜３＞Ｌ－リジンの製造法
上記のようにしてＬ－リジン生合成遺伝子が増強されたコリネ型細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にＬ－リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からＬ－リジンを採取することにより、Ｌ－リジンを効率よく製造することができる。
【００６０】
使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地が挙げられる。
炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜やでんぷんの加水分解物などの糖類、フマール酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。
【００６１】
窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。
【００６２】
有機微量栄養源としては、ビタミンＢ１、Ｌ－ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。
【００６３】
培養は好気的条件下で30～90時間実施するのがよく、培養温度は２５℃～３７℃に、培養中ｐＨは５～８に制御することが好ましい。尚、ｐＨ調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。培養物からのＬ－リジンの採取は通常のイオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。
【００６４】
【実施例】
以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。
【００６５】
【実施例１】
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムlysAの取得
＜１＞lysAの取得及びそれを含有するプラスミドの作製
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC13869株を染色体ＤＮＡの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRにより、argS、lysA及びこれらを含むオペロンのプロモーターを含むＤＮＡ断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーとしては、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既

知となっている配列（Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830 (1990)、Molecular and General Genetics 212, 112-119 (1988)参照）を基にしてアルギニル－tRNAシンターゼ及びＤＤＣをコードする約3.6kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号１及び２に記載の塩基配列を有する各々23merの合成ＤＮＡを用いた。
ＤＮＡの合成はApplied Biosystems社製ＤＮＡ合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて（Tetrahedron Letters(1981),22,1859参照）常法に従って合成した。
【００６６】
PCR反応は、宝酒造（株）製ＤＮＡサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅を行なった。増幅された３５７９ｂｐの遺伝子断片のクローン化用のベクターにはpHSG399を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI（宝酒造(株)製）にて切断し、増幅されたlysAを含むＤＮＡ断片と接続した。この様にして取得したATCC13869由来のlysAを有するプラスミドをp399LYSAと命名した。
【００６７】
更に、p399LYSAをKpnI（宝酒造(株)製）とBamHI（宝酒造(株)製）で切断することにより、lysAを含むＤＮＡ断片を抽出した。このＤＮＡ断片を、pHSG299をKpnIとBamHIで切断したものと連結した。得られたプラスミドをp299LYSAと命名した。p299LYSAB構築の過程を図１に示す。
得られたp299LYSAに、コリネバクテリウム属細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつＤＮＡ断片（以下「Brevi.-ori」と記す）を導入し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能なlysAを搭載したプラスミドを作製した。Brevi.-oriは、これを含み、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌の双方の菌体中で自律複製可能なプラスミドベクターpHK4から調製した。pHK4は、pHC4をKpnI（宝酒造（株）製）及びBamHI（宝酒造（株）製）で切断し、Brevi.-ori断片を抽出し、同じくKpnI及びBamHIにて切断したpHSG298に接続することによって構築される（特開平5-7491号公報参照）。pHK4は、宿主にカナマイシン耐性を付与する。尚、pHK4を保持するエシェリヒア・コリHB101は、エシェリヒア・コリ AJ13136と命名され、１９９５年８月１日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM BP-5186として寄託されている。
【００６８】
pHK4を制限酵素KpnI及びBamHIで切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みKpnIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をKpnIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをKpnIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくKpnIにて切断したp299LYSAに接続し、コリネ型細菌中で自律複製可能でかつlysAを含むプラスミドを作製した。作製したプラスミドをpLYSABと命名した。pLYSAB構築の過程を図２に示す。
【００６９】
＜２＞ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムlysAの塩基配列の決定
p299LYSAのプラスミドDNAを調製し、サンガーらの方法（F.Sanger et al :Proc.Natl.Acad.Sci.74,5463(1977)などがある）により塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列及びこの配列がコードすると予想されるアミノ酸配列を配列番号３に示す。また、この塩基配列のうち、argSがコードするアミノ酸配列及びlysAがコードするアミノ酸配列を、各々配列番号４及び５に示す。
【００７０】
【実施例２】
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムddhの取得
ddh遺伝子は、コリネバクテリウム　グルタミカム（Corynebacterium glutamicum）のddh遺伝子の既知のヌクレオチド配列（Ishino, S. et al., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)）をもとに作成した２種のオリゴヌクレオチドプライマー（配列番号６、７）を用いたＰＣＲ法により、ブレビバクテリウム　ラクトファーメンタム ATCC13869 の染色体

ＤＮＡからddh遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅ＤＮＡ断片をEcoT22IとAvaIで切断し、末端を平滑化した後、pMW119のSmaI部位に挿入し、プラスミドpDDHを得た。

【００７１】

次に、pDDHをSalIとEcoRIにて切断し、平滑末端化した後、得られた断片をSmaIで切断したpUC18と連結した。こうして得られたプラスミドをpUC18DDHと命名した。

【００７２】

pUC18DDHにBrevi.-oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なddhを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI及びBamHIで切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みPstIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHSG299のPstI部位に挿入した。このようにして作製したプラスミドをpPK4と命名した。次に、pUC18DDHをXbaIとKpnIで切断し、生じたddh断片をKpnIとXbaIで切断したpPK4に接続した。このようにして、コリネ型細菌中で自律複製可能で、かつ、ddhを含むプラスミドを作製し、このプラスミドをpPK4Dと命名した。pPK4D構築の過程を図３に示す。

【００７３】

【実施例３】

ddh及びlysAを併せ持つプラスミドの作製

ddhを有するプラスミドpUC18DDHをEcoRIおよびXbaIにて切断し、ddhを含むＤＮＡ断片を抽出した。このddh断片を、lysAを有するプラスミドp399LYSAをBamHIおよびXbaIにて切断した後、切断面を平滑末端化したものと連結した。得られたプラスミドをp399DLと命名した。p399DL構築の過程を図４に示す。

【００７４】

次に、p399DLにBrevi.-oriを導入した。pHK4をXbaIおよびBamHIにて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化後、リン酸化済みXbaIリンカーを接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をXbaIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをXbaIにて切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくXbaIで切断したp399DLに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつddhおよびlysAを含むプラスミドを作製し、pDLと命名した。pDLの構築の過程を図５に示す。

【００７５】

【実施例４】

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム変異型lysC、dapA及びdapBの取得

＜１＞ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生型lysC遺伝子及び変異型lysC遺伝子の取得

（１）野生型及び変異型lysCの取得、及びそれらを含有するプラスミドの作製

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株、及びATCC13869株より変異処理により得られたＬ－リジン生産性変異株AJ3445（FERM P-1944）を染色体ＤＮＡの供与体として用いた。AJ3445株は、変異によりlysCがリジン及びスレオニンによる競争阻害が実質的に解除されている（Journal of Biochemistry 68, 701-710 (1970)）。

【００７６】

染色体DNAよりPCR法（polymerase chain reaction；White,T.J. et al ;Trends Genet. 5,185(1989)参照）によりlysCを含むＤＮＡ断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列（Molecular Microbiology(1991)5(5),1197-1204, Mol.Gen.Genet.(1990)224,317-324参照）を基にしてlysCをコードする約1643bpの領域を増幅すべく、配列番号１０及び配列番号１１に示す塩基配列を有する23mer及び21merの一本鎖ＤＮＡを合成した。

【００７７】

増幅された1643kbの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素NruI（宝酒造（株）製）及びEcoRI（宝酒造（株）製）にて切断した。

【００７８】
遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpHSG399（Takeshita, S et al;Gene(1987),61,63-74参照）を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI（宝酒造（株）製）及び制限酵素EcoRIにて切断し、増幅されたlysC断片と接続した。ＤＮＡの接続はＤＮＡライゲーションキット（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpHSG399にブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム染色体より増幅されたlysC断片が接続されたプラスミドを作製した。野生株であるATCC13869株由来のlysCを有するプラスミドをp399AKY、Ｌ－リジン生産菌であるAJ3463由来のlysCを有するプラスミドをp399AK9と命名した。
【００７９】
p399AKYおよびp399AK9に、それぞれBrevi.-oriを導入し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能なlysCを搭載したプラスミドを作製した。
pHK4を、制限酵素KpnI及びBamHIにて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたBrevi.-ori ＤＮＡ断片を同じくBamHIにて切断したp399AKY、p399AK9に接続し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能でかつlysC遺伝子を含むプラスミドを作製した。
【００８０】
p399AKY由来の野生型lysC遺伝子を含むプラスミドをp399AKYBと命名し、p399AK9由来の変異型lysC遺伝子を含むプラスミドをp399AK9Bと命名した。p399AK9B、p399AKYB構築の過程を図６に示す。ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株であるAJ12036株（FERM BP-734）に変異型lysCプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、１９９２年４月１０日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM P-12918として寄託され、１９９５年２月１０日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4999の受託番号で寄託されている。
【００８１】
（２）ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型lysC及び変異型lysCの塩基配列の決定
野生型lysCを含むプラスミドp399AKY及び変異型lysCを含むプラ スミドp399AK9を各々の形質転換体から調製し、野生型及び変異型lysCの塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はサンガーらの方法（F.Sanger et al :Proc.Natl.Acad.Sci.74,5463(1977)などがある）によった。
【００８２】
p399AKYにコードされている野生型lysCの塩基配列を配列表の配列番号１２に示す。一方、p399AK9にコードされている変異型lysCの塩基配列は野生型lysCと比べ、配列番号１２において１０５１番目のＧがＡに変化しているという１塩基の変異のみを有していた。コリネバクテリウム・グルタミカムのlysCは、同一のＤＮＡ鎖にα、βの２本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていることが知られているが（Kalinowski,J et al;Molecular Microbiology(1991)5(5),1197-1204参照）、相同性から判断して本遺伝子も同一のＤＮＡ鎖にα、βの２本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていると考えられる。
【００８３】
ＤＮＡ塩基配列より推定される野生型ＡＫタンパク質のαサブユニットのアミノ酸配列をＤＮＡ配列と同時に配列表の配列番号１３に、アミノ酸配列のみを配列番号１４に示す。また、ＤＮＡ塩基配列より推定される野生型ＡＫタンパク質のβサブユニットのアミノ酸配列をＤＮＡと同時に配列表の配列番号１５に、アミノ酸配列のみを配列番号１６に示す。尚、各サブユニットとも、開始コドンにＧＴＧが用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニ

ンを表すものである。
【００８４】
一方、変異型lysC配列上の変異は、野生型ＡＫタンパク質のアミノ酸配列（配列番号１４、１６）において、αサブユニットでは２７９番目のアラニン残基がスレオニン残基に、βサブユニットでは３０番目のアラニン残基がスレオニン残基にというアミノ酸残基置換を起こしていることを意味する。
【００８５】
＜２＞ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムdapBの取得
（１）dapBの取得及びそれを含有するプラスミドの作製
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC13869株を染色体ＤＮＡの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRによりdapBを含むＤＮＡ断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムにおいて既知となっている配列（Journal of Bacteriology 175(9), 2743-2749 (1993)参照）を基にしてＤＤＰＲをコードする約2.0kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号２１及び２２に記載の塩基配列を有する各々23merのＤＮＡ断片を合成した。ＤＮＡの合成及びPCR反応は、実施例１と同様にして行った。増幅された２００１ｂｐの遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpCR-Script（Invitrogen社製）を用い、増幅したdapB断片と接続した。この様にしてpCR-Scriptにブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム染色体より増幅されたdapB断片２００１ｂｐの接続されたプラスミドを作製した。この様にして取得したATCC13869由来のdapBを有するプラスミドをpCRDAPBと命名した。E. coliJM109株にpCRDAPBを導入して得られた形質転換株AJ13107株は、１９９５年５月２６日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM BP-5114の受託番号で、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。
【００８６】
更に、pCRDAPBをEcoRVとSphIで切断する事により、DDPRの構造遺伝子を含む１１０１ｂｐの断片を抽出した。この断片を、pHSG399をHincIIおよびSphIにて切断したものと連結したプラスミドを作成した。この作成したプラスミドをp399DPRと命名した。
【００８７】
作製したp399DPRにBrevi.-oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なdapBを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくBamHIにて切断したp399DPRに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつdapBを含むプラスミドを作製した。作製したプラスミドをpDPRBと命名した。pDPRB構築の過程を図７に示す。
【００８８】
（２）ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムdapBの塩基配列の決定
p399DPRを保持するAJ13107株からプラスミドDNAを調製し、実施例１と同様にして塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列及びこの配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号２３に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号２４に示す。
【００８９】
＜３＞ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムdapAの取得
（１）dapAの取得及びそれを含有するプラスミドの作製
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC13869株を染色体ＤＮＡの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRによりdapAを含むＤＮＡ断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列（Nucleic Acids Research 18(21), 642

1 (1990)、EMBL accession No.X53993参照）を基にしてＤＤＰＳをコードする約1.5kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号１７及び１８に記載の塩基配列を有する各々23merのＤＮＡを合成した。ＤＮＡの合成及びPCR反応は、実施例１と同様にして行った。増幅された１４１１ｂｐの遺伝子断片のクローン化用のベクターにはpCR1000（invitrogen社製；Bio/Technology 9, 657-663 (1991)参照）を用い、増幅したdapA断片と接続した。DNAの接続はDNAライゲーションキット（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpCR1000にブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム染色体より増幅されたdapA断片１４１１ｂｐの接続されたプラスミドを作製した。この様にして取得したATCC13869由来のdapAを有するプラスミドをpCRDAPAと命名した。

【００９０】

E. coliJM109株にpCRDAPAを導入して得られた形質転換株AJ13106株は、１９９５年５月２６日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号３０５ 日本国茨城県つくば市東一丁目１番３号）に受託番号FERM BP-5113の受託番号で、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【００９１】

作製したpCRDAPAにBrevi.-oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なdapAを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI及びBamHI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みSmaIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をSmaIIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをSmaIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくSmaIにて切断したpCRDAPAに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつdapAを含むプラスミドを作製した。このプラスミドをpDPSBと命名した。pDPSB（Km^r）の構築過程を図８に示す。

【００９２】

（２）ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムdapAの塩基配列の決定

pCRDAPAを保持するAJ13106株からプラスミドDNAを調製し、実施例１と同様にして塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列及びこの配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号１９に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号２０に示す。

【００９３】

＜４＞変異型lysC及びdapAを併せ持つプラスミドの作製

dapAを有するプラスミドpCRDAPAと変異型lysC及びBrevi.-oriを有するプラスミドp399AK9Bより、変異型lysC、dapAおよびコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドを作製した。p399AK9BをSalIにて完全分解した後、平滑末端化し、EcoRIリンカーを接続する事によりSalI部位をEcoRI部位に改変したプラスミドを作製した。得られたプラスミドをp399AK9BSEと命名した。p399AK9BSEをEcoRIにて部分分解することよって変異型lysCとBrevi.－oriを一つのフラグメントとして切り出した。このフラグメントをpCRDAPAをEcoRIにて切断したものと連結した。得られたプラスミドをpCRCABと命名した。このプラスミドはE. coliとコリネ型細菌中で自律増殖可能で、かつ宿主にカナマイシン耐性を付与し、変異型lysCとdapAを併せ保持しているプラスミドである。pCRCABの作製過程を図９に示す。

【００９４】

＜５＞変異型lysC及びdapBを併せ持つプラスミドの作製

変異型lysCを有するプラスミドp399AK9とdapBを有するプラスミドp399DPRより、変異型lysC、dapBを含むプラスミドを作製した。p399DPRをEcoRVとSphIで切断することにより、DDPRの構造遺伝子を含む１１０１ｂｐの断片を抽出した。この断片を、p399AK9をSalIで切断した後平滑末端化し、更にSphIにて切断したものと結合し、変異型lysCとdapBを併せ持つプラスミドを作製した。このプラスミドをp399AKDDPRと命名した。

【００９５】

次に、得られたp399AKDPRにBrevi.-oriを導入した。Brevi.-oriを含むプラスミドpHK4を制限酵素KpnI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDN

A Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくBamHIにて切断したp399AKDDPRに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysCおよびdapBを含むプラスミドを作製し、pCBと命名した。pCBの構築の過程を図１０に示す。

【００９６】

＜６＞dapA及びdapBを併せ持つプラスミドの作製

dapAを有するプラスミドpCRDAPAをKpnIおよびEcoRIにて切断し、dapAを含むＤＮＡ断片を抽出し、ベクタープラスミドpHSG399をKpnIおよびEcoRIにて切断したものと接続した。得られたプラスミドをp399DPSと命名した。

【００９７】

一方、dapBを有するプラスミドpCRDAPBをSacIIおよびEcoRIにて切断し、ＤＤＰＲをコードする領域を含む２．０ｋｂのＤＮＡ断片を抽出し、SacIIおよびEcoRIにて切断したp399DPSと接続し、dapAとdapBを併せ持つプラスミドを作製した。得られたプラスミドをp399ABと命名した。

【００９８】

次に、p399ABにBrevi.-oriを導入した。Brevi.-oriを含むpHK4を制限酵素BamHI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みKpnIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をKpnIIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをKpnIIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくKpnIにて切断したp399ABに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつdapAおよびdapBを含むプラスミドを作製し、pABと命名した。pABの構築の過程を図１１に示す。

【００９９】

＜７＞変異型lysC、dapA及びdapBを併せ持つプラスミドの作製

p399DPSをEcoRI、SphIにて分解し、平滑末端化した後、dapA遺伝子断片を抽出した。この断片を、p399AK9をSalIにて切断し平滑末端化したものとライゲーションし、変異型lysCとdapAが共存したプラスミドp399CAを構築した。

【０１００】

dapBを有するプラスミドpCRDAPBをEcoRIにて切断、平滑末端化した後、SacIにて切断し、dapBを含む2.0kbのＤＮＡ断片を抽出した。dapA及び変異型lysCを有するプラスミドp399CAをSpeIにて切断、平滑末端化した後、SacIにて切断し、抽出したdapB断片と接続し、変異型lysC、dapA及びdapBを含むプラスミドを得た。このプラスミドをp399CABと命名した。

【０１０１】

次に、p399CABにBrevi.-oriを導入した。Brevi.-oriを有するプラスミドpHK4を制限酵素BamHI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みKpnIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をKpnIIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをKpnIIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくKpnIにて切断したp399CABに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysC、dapAおよびdapBを併せ持つプラスミドを作製し、pCABと命名した。pCABの構築の過程を図１２に示す。

【０１０２】

＜８＞変異型lysC、dapA、dapB及びlysAを併せ持つプラスミドの作製

lysAを有するプラスミドp299LYSAをKpnI及びBamHIにて切断し、平滑末端化した後、lysA遺伝子断片を抽出した。この断片を、pCABをHpaI（宝酒造（株）製）にて切断し平滑末端化したものとライゲーションし、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysC、dapA

、dapB、及びlysAを併せ持つプラスミドを作製し、pCABLと命名した。pCABL構築の過程を図１３に示す。尚、pCABL中で、lysA遺伝子断片はdapB遺伝子を含むＤＮＡ断片内のHpaI部位に挿入されているが、このHpaI部位は、dapB遺伝子のプロモーターよりも上流（配列番号２３中塩基番号６１２～６１７）に位置しており、dapB遺伝子は分断されていない。

【０１０３】

＜９＞変異型lysC、dapA、dapB、ddh及びlysAを併せ持つプラスミドの作製

pHSG299をXbaI及びKpnIにて切断し、ddh及びlysAを有するプラスミドp399DLをXbaI及びKpnIで切断したものと連結した。作製されたプラスミドをp299DLと命名した。このp299DLをXbaI及びKpnIで切断し、平滑末端化した。平滑末端化後、ddh及びlysAを含むDNA断片を抽出した。このDNA断片を、変異型lysC、dapAおよびdapBを併せ持つプラスミドpCABをHpaIにて切断し平滑末端化したものと連結し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysC、dapA、dapB、lysA及びddhを併せ持つプラスミドを作製し、pCABDLと命名した。pCABDL構築の過程を図１４に示す。

【０１０４】

【実施例５】

Ｌ－リジン生合成遺伝子を含むプラスミドのブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムＬ－リジン生産菌への導入

上記のようにして作製されたＬ－リジン生合成遺伝子を有するプラスミドpLYSAB（Cm^r）、pPK4D（Cm^r）、p399AK9B（Cm^r）、pDPSB（Km^r）、pDPRB（Cm^r）、pCRCAB（Km^r）、pAB（Cm^r）、pDL（Cm^r）、pCB（Cm^r）、pCAB（Cm^r）、pCABL（Cm^r）、pCABDL（Cm^r）をブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムＬ－リジン生産菌であるＡＪ１１０８２（ＮＲＲＬ　Ｂ－１１４７０）に導入した。ＡＪ１１０８２株は、ＡＥＣ耐性の性質を有する。プラスミドの導入の方法は、電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によった。形質転換体の選択は各々のプラスミドが持つ薬剤耐性マーカーによった。クロラムフェニコール耐性遺伝子を有するプラスミドを導入した場合は５μg/mlのクロラムフェニコールを含む完全培地にて、また、カナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドを導入した場合には２５μg/mlのカナマイシンを含む完全培地にて形質転換体の選択を行なった。

【０１０５】

【実施例６】

Ｌ－リジンの製造

実施例５で取得した各形質転換体をＬ－リジン生産培地にて培養し、そのＬ－リジン生産能を評価した。Ｌ－リジン生産培地の組成は以下に示す通りである。

【０１０６】

〔Ｌ－リジン生産培地〕

炭酸カルシウム以外の下記成分（１Ｌ中）を溶解し、ＫＯＨでｐＨ８．０に調製し、１１５℃で１５分殺菌した後、別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを５０ｇ加える。

【０１０７】

グルコース	100 g
$(NH_4)_2SO_4$	55 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
ビオチン	500 μg
チアミン	2000 μg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g
ニコチンアミド	5 mg
蛋白質加水分解物（豆濃）	30 ml
炭酸カルシウム	50 g

【０１０８】

上記組成の培地に各種形質転換体及び親株を植菌し、31.5℃にて往復振盪培養を行った。

培養４０時間、７２時間後のＬ－リジン生成量、及び７２時間後の生育（OD_{562}）を表１に示す。表中、lysC*は変異型lysCを表す。生育は１０１倍希釈した後、560nmにてＯＤを測定することにより定量した。

【０１０９】

【表１】

表１　培養時間４０、７２時間後のＬ－リジン蓄積

菌株／プラスミド	導入遺伝子	L-ﾘｼﾞﾝ生産量(g/L) 40時間後	72時間後	生育 (OD_{562}/101)
AJ11082		22.0	29.8	0.450
AJ11082／pLYSAB	lysA	19.8	32.5	0.356
AJ11082／pPK4D	ddh	19.0	33.4	0.330
AJ11082／p399AK9B	lysC*	16.8	34.5	0.398
AJ11082／pDPSB	dapA	18.7	33.8	0.410
AJ11082／pDPRB	dapB	19.9	29.9	0.445
AJ11082／pCRCAB	lysC*,dapA	19.7	36.5	0.360
AJ11082／pAB	dapA,dapB	19.0	34.8	0.390
AJ11082／pDL	lysA,ddh	23.3	31.6	0.440
AJ11082／pCB	lysC*,dapB	23.3	35.0	0.440
AJ11082／pCAB	lysC*,dapA,dapB	23.0	45.0	0.425
AJ11082／pCABL	lysC*,dapA,dapB,lysA	26.2	46.5	0.379
AJ11082／pCABDL	lysC*,dapA,dapB,lysA,ddh	26.5	47.0	0.409

【０１１０】

以上に示すように、lysA、ddh、変異型lysC、dapA、又はdapBの単独の増強では、培養７２時間後にはＬ－リジン生産量は親株よりも多いか同等であるが、４０時間後では親株よりも生産量が少なく、すなわち短期間培養におけるＬ－リジン生産速度は低下した。同様に、変異型lysC及びdapA、又はdapA及びdapBを組み合わせて増強した場合には、培養７２時間後にはＬ－リジン生産量は親株よりも多いが、４０時間後では親株よりも生産量が少なく、Ｌ－リジン生産速度は低下した。

【０１１１】

これらに対し、lysA及びddhのみを組み合わせて増強した場合には、生育が改善され、短期間培養におけるＬ－リジン生産速度を回復させることができた上、長期間培養でのＬ－リジン蓄積量も向上した。

【０１１２】

また、変異型lysCとともにdapBが増強された株、あるいはこれらの遺伝子に加えてdapAが同時に増強された株は、親株に比べて生育が改善され、Ｌ－リジン生産速度も向上したが、これら３種の遺伝子を増強された株は、さらにlysA、ddhを増強することによって、より一層Ｌ－リジンの生産速度及び蓄積量が向上した

【０１１３】

。

【発明の効果】

本発明により、コリネ型細菌のＬ－リジン生産能を向上させることができ、生育速度も改善される。本発明は、通常のＬ－リジン生産菌に適用できる他、Ｌ－リジン高生産株にも適用することができる。

【０１１４】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　合成DNA

アンチセンス:NO

配列

GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGG **23**

【０１１５】

配列番号：2

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　合成DNA

アンチセンス:YES

配列

CCAAAACCGC CCTCCACGGC GAA **23**

【０１１６】

配列番号：3
配列の長さ：3579
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：GenomicDNA
起源
生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)
株名： ATCC 13869
配列の特徴
特徴を表わす記号：CDS
存在位置：533..2182
配列の特徴
特徴を表わす記号：CDS
存在位置：2188..3522
配列

```
GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGGCTGCACT GCAACGAGGT CGTAGTTTTG GTACATGGCT     60
TCTGGCCAGT TCATGGATTG GCTGCCGAAG AAGCTATAGG CATCGCACCA GGGCCACCGA    120
GTTACCGAAG ATGGTGCCGT GCTTTTCGCC TTGGGCAGGG ACCTTGACAA AGCCCACGCT    180
GATATCGCCA AGTGAGGGAT CAGAATAGTG CATGGGCACG TCGATGCTGC CACATTGAGC    240
GGAGGCAATA TCTACCTGAG GTGGGCATTC TTCCCAGCGG ATGTTTTCTT GCGCTGCTGC    300
AGTGGGCATT GATACCAAAA AGGGGCTAAG CGCAGTCGAG GCGGCAAGAA CTGCTACTAC    360
CCTTTTTATT GTCGAACGGG GCATTACGGC TCCAAGGACG TTTGTTTTCT GGGTCAGTTA    420
CCCCAAAAAG CATATACAGA GACCAATGAT TTTTCATTAA AAAGGCAGGG ATTTGTTATA    480
AGTATGGGTC GTATTCTGTG CGACGGGTGT ACCTCGGCTA GAATTTCTCC CC ATG        535
                                                          Met
                                                           1
ACA CCA GCT GAT CTC GCA ACA TTG ATT AAA GAG ACC GCG GTA GAG GTT       583
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu Val
```

```
                5                  10                  15
TTG ACC TCC CGC GAG CTC GAT ACT TCT GTT CTT CCG GAG CAG GTA GTT      631
Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val Val
        20                  25                  30
GTG GAG CGT CCG CGT AAC CCA GAG CAC GGC GAT TAC GCC ACC AAC ATT      679
Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn Ile
    35                  40                  45
GCA TTG CAG GTG GCT AAA AAG GTC GGT CAG AAC CCT CGG GAT TTG GCT      727
Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu Ala
50                  55                  60                  65
ACC TGG CTG GCA GAG GCA TTG GCT GCA GAT GAC GCC ATT GAT TCT GCT      775
Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser Ala
                70                  75                  80
GAA ATT GCT GGC CCA GGC TTT TTG AAC ATT CGC CTT GCT GCA GCA GCA      823
Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala Ala
            85                  90                  95
CAG GGT GAA ATT GTG GCC AAG ATT CTG GCA CAG GGC GAG ACT TTC GGA      871
Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe Gly
        100                 105                 110
AAC TCC GAT CAC CTT TCC CAC TTG GAC GTG AAC CTC GAG TTC GTT TCT      919
Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val Ser
    115                 120                 125
GCA AAC CCA ACC GGA CCT ATT CAC CTT GGC GGA ACC CGC TGG GCT GCC      967
Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala Ala
130                 135                 140                 145
GTG GGT GAC TCT TTG GGT CGT GTG CTG GAG GCT TCC GGC GCG AAA GTG     1015
Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys Val
                150                 155                 160
ACC CGC GAA TAC TAC TTC AAC GAT CAC GGT CGC CAG ATC GAT CGT TTC     1063
```

```
Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg Phe
            165                 170                 175
GCT TTG TCC CTT CTT GCA GCG GCG AAG GGC GAG CCA ACG CCA GAA GAC     1111
Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu Asp
        180                 185                 190
GGT TAT GGC GGC GAA TAC ATT AAG GAA ATT GCG GAG GCA ATC GTC GAA     1159
Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val Glu
    195                 200                 205
AAG CAT CCT GAA GCG TTG GCT TTG GAG CCT GCC GCA ACC CAG GAG CTT     1207
Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu Leu
210                 215                 220                 225
TTC CGC GCT GAA GGC GTG GAG ATG ATG TTC GAG CAC ATC AAA TCT TCC     1255
Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser Ser
                230                 235                 240
CTG CAT GAG TTC GGC ACC GAT TTC GAT GTC TAC TAC CAC GAG AAC TCC     1303
Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn Ser
            245                 250                 255
CTG TTC GAG TCC GGT GCG GTG GAC AAG GCC GTG CAG GTG CTG AAG GAC     1351
Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys Asp
        260                 265                 270
AAC GGC AAC CTG TAC GAA AAC GAG GGC GCT TGG TGG CTG CGT TCC ACC     1399
Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser Thr
    275                 280                 285
GAA TTC GGC GAT GAC AAA GAC CGC GTG GTG ATC AAG TCT GAC GGC GAC     1447
Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly Asp
290                 295                 300                 305
GCA GCC TAC ATC GCT GGC GAT ATC GCG TAC GTG GCT GAT AAG TTC TCC     1495
Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe Ser
                310                 315                 320
```

```
CGC GGA CAC AAC CTA AAC ATC TAC ATG TTG GGT GCT GAC CAC CAT GGT     1543
Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His Gly
            325                 330                 335
TAC ATC GCG CGC CTG AAG GCA GCG GCG GCG GCA CTT GGC TAC AAG CCA     1591
Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Pro
        340                 345                 350
GAA GGC GTT GAA GTC CTG ATT GGC CAG ATG GTG AAC CTG CTT CGC GAC     1639
Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg Asp
    355                 360                 365
GGC AAG GCA GTG CGT ATG TCC AAG CGT GCA GGC ACC GTG GTC ACC CTA     1687
Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr Leu
370                 375                 380                 385
GAT GAC CTC GTT GAA GCA ATC GGC ATC GAT GCG GCG CGT TAC TCC CTG     1735
Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser Leu
                390                 395                 400
ATC CGT TCC TCC GTG GAT TCT TCC CTG GAT ATC GAT CTC GGC CTG TGG     1783
Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu Trp
            405                 410                 415
GAA TCC CAG TCC TCC GAC AAC CCT GTG TAC TAC GTG CAG TAC GGA CAC     1831
Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly His
        420                 425                 430
GCT CGT CTG TGC TCC ATC GCG CGC AAG GCA GAG ACC TTG GGT GTC ACC     1879
Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val Thr
    435                 440                 445
GAG GAA GGC GCA GAC CTA TCT CTA CTG ACC CAC GAC CGC GAA GGC GAT     1927
Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly Asp
450                 455                 460                 465
CTC ATC CGC ACA CTC GGA GAG TTC CCA GCA GTG GTG AAG GCT GCC GCT     1975
Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala Ala
```

```
                470                 475                 480
GAC CTA CGT GAA CCA CAC CGC ATT GCC CGC TAT GCT GAG GAA TTA GCT     2023
Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu Ala
            485                 490                 495
GGA ACT TTC CAC CGC TTC TAC GAT TCC TGC CAC ATC CTT CCA AAG GTT     2071
Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys Val
        500                 505                 510
GAT GAG GAT ACG GCA CCA ATC CAC ACA GCA CGT CTG GCA CTT GCA GCA     2119
Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala Ala
    515                 520                 525
GCA ACC CGC CAG ACC CTC GCT AAC GCC CTG CAC CTG GTT GGC GTT TCC     2167
Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val Ser
530                 535                 540                 545
GCA CCG GAG AAG ATG TAACA ATG GCT ACA GTT GAA AAT TTC AAT GAA       2214
Ala Pro Glu Lys Met       Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu
                550         1                   5
CTT CCC GCA CAC GTA TGG CCA CGC AAT GCC GTG CGC CAA GAA GAC GGC     2262
Leu Pro Ala His Val Trp Pro Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly
 10                  15                  20                  25
GTT GTC ACC GTC GCT GGT GTG CCT CTG CCT GAC CTC GCT GAA GAA TAC     2310
Val Val Thr Val Ala Gly Val Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr
                30                  35                  40
GGA ACC CCA CTG TTC GTA GTC GAC GAG GAC GAT TTC CGT TCC CGC TGT     2358
Gly Thr Pro Leu Phe Val Val Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys
            45                  50                  55
CGC GAC ATG GCT ACC GCA TTC GGT GGA CCA GGC AAT GTG CAC TAC GCA     2406
Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala
        60                  65                  70
TCT AAA GCG TTC CTG ACC AAG ACC ATT GCA CGT TGG GTT GAT GAA GAG     2454
```

```
Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu
 75                  80                  85
GGG CTG GCA CTG GAC ATT GCA TCC ATC AAC GAA CTG GGC ATT GCC CTG     2502
Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu
 90                  95                 100                 105
GCC GCT GGT TTC CCC GCC AGC CGT ATC ACC GCG CAC GGC AAC AAC AAA     2550
Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys
                110                 115                 120
GGC GTA GAG TTC CTG CGC GCG TTG GTT CAA AAC GGT GTG GGA CAC GTG     2598
Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val
            125                 130                 135
GTG CTG GAC TCC GCA CAG GAA CTA GAA CTG TTG GAT TAC GTT GCC GCT     2646
Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala
        140                 145                 150
GGT GAA GGC AAG ATT CAG GAC GTG TTG ATC CGC GTA AAG CCA GGC ATC     2694
Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile
    155                 160                 165
GAA GCA CAC ACC CAC GAG TTC ATC GCC ACT AGC CAC GAA GAC CAG AAG     2742
Glu Ala His Thr His Glu Phe Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys
170                 175                 180                 185
TTC GGA TTC TCC CTG GCA TCC GGT TCC GCA TTC GAA GCA GCA AAA GCC     2790
Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala
                190                 195                 200
GCC AAC AAC GCA GAA AAC CTG AAC CTG GTT GGC CTG CAC TGC CAC GTT     2838
Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val
            205                 210                 215
GGT TCC CAG GTG TTC GAC GCC GAA GGC TTC AAG CTG GCA GCA GAA CGC     2886
Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg
        220                 225                 230
```

GTG TTG GGC CTG TAC TCA CAG ATC CAC AGC GAA CTG GGC GTT GCC CTT 2934
Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu
235 240 245
CCT GAA CTG GAT CTC GGT GGC GGA TAC GGC ATT GCC TAT ACC GCA GCT 2982
Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala
250 255 260 265
GAA GAA CCA CTC AAC GTC GCA GAA GTT GCC TCC GAC CTG CTC ACC GCA 3030
Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala
270 275 280
GTC GGA AAA ATG GCA GCG GAA CTA GGC ATC GAC GCA CCA ACC GTG CTT 3078
Val Gly Lys Met Ala Ala Glu Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu
285 290 295
GTT GAG CCC GGC CGC GCT ATC GCA GGC CCC TCC ACC GTG ACC ATC TAC 3126
Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr
300 305 310
GAA GTC GGC ACC ACC AAA GAC GTC CAC GTA GAC GAC GAC AAA ACC CGC 3174
Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg
315 320 325
CGT TAC ATC GCC GTG GAC GGA GGC ATG TCC GAC AAC ATC CGC CCA GCA 3222
Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala
330 335 340 345
CTC TAC GGC TCC GAA TAC GAC GCC CGC GTA GTA TCC CGC TTC GCC GAA 3270
Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu
350 355 360
GGA GAC CCA GTA AGC ACC CGC ATC GTG GGC TCC CAC TGC GAA TCC GGC 3318
Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly
365 370 375
GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC 3366
Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly

```
        380                 385                 390
GAC TTC CTT GCA CTC GCA GCC ACC GGC GCA TAC TGC TAC GCC ATG AGC     3414
Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser
    395                 400                 405
TCC CGC TAC AAC GCC TTC ACA CGG CCC GCC GTC GTG TCC GTC CGC GCT     3462
Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala
410                 415                 420                 425
GGC AGC TCC CGC CTC ATG CTG CGC CGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC     3510
Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu
                430                 435                 440
TCA CTA GAG GCA TAACGCTTTT CGACGCCTGA CCCCGCCCTT CACCTTCGCC         3562
Ser Leu Glu Ala
            445
GTGGAGGGCG GTTTTGG                                                 3579
```

【０１１７】

配列番号：4
配列の長さ：550
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

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

180 185 190
Asp Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val
195 200 205
Glu Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu
210 215 220
Leu Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser
225 230 235 240
Ser Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn
245 250 255
Ser Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys
260 265 270
Asp Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser
275 280 285
Thr Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly
290 295 300
Asp Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe
305 310 315 320
Ser Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His
325 330 335
Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys
340 345 350
Pro Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg
355 360 365
Asp Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr
370 375 380
Leu Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser
385 390 395 400
Leu Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu
405 410 415

Trp Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly
420 425 430
His Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val
435 440 445
Thr Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly
450 455 460
Asp Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala
465 470 475 480
Ala Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu
485 490 495
Ala Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys
500 505 510
Val Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala
515 520 525
Ala Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val
530 535 540
Ser Ala Pro Glu Lys Met
545 550

【０１１８】

配列番号：5
配列の長さ：445
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

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

180 185 190

Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu

195 200 205

Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala

210 215 220

Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln

225 230 235 240

Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly

245 250 255

Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala

260 265 270

Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu

275 280 285

Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile

290 295 300

Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp

305 310 315 320

Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly

325 330 335

Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp

340 345 350

Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg

355 360 365

Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu

370 375 380

Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala

385 390 395 400

Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr

405 410 415

Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu

420 425 430

Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala

435 440 445

【０１１９】

配列番号：6
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
アンチセンス:NO
CATCTAAGTA TGCATCTCGG 20

【０１２０】
配列番号：7
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
アンチセンス:YES
配列
TGCCCCTCGA GCTAAATTAG 20

【０１２１】

配列番号：8
配列の長さ：1034
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：GenomicDNA
起源
生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)
株名： ATCC 13869
配列の特徴
特徴を表わす記号：CDS
存在位置：61..1020
配列

```
ATGCATCTCG GTAAGCTCGA CCAGGACAGT GCCACCACAA TTTTGGAGGA TTACAAGAAC     60
ATG ACC AAC ATC CGC GTA GCT ATC GTG GGC TAC GGA AAC CTG GGA CGC      108
Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg
  1               5                  10                  15
AGC GTC GAA AAG CTT ATT GCC AAG CAG CCC GAC ATG GAC CTT GTA GGA      156
Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly
             20                  25                  30
ATC TTC TCG CGC CGG GCC ACC CTC GAC ACA AAG ACG CCA GTC TTT GAT      204
Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp
         35                  40                  45
GTC GCC GAC GTG GAC AAG CAC GCC GAC GAC GTG GAC GTG CTG TTC CTG      252
Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu
     50                  55                  60
TGC ATG GGC TCC GCC ACC GAC ATC CCT GAG CAG GCA CCA AAG TTC GCG      300
Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala
 65                  70                  75                  80
```

```
CAG TTC GCC TGC ACC GTA GAC ACC TAC GAC AAC CAC CGC GAC ATC CCA      348
Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro
                85                  90                  95
CGC CAC CGC CAG GTC ATG AAC GAA GCC GCC ACC GCA GCC GGC AAC GTT      396
Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val
            100                 105                 110
GCA CTG GTC TCT ACC GGC TGG GAT CCA GGA ATG TTC TCC ATC AAC CGC      444
Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg
        115                 120                 125
GTC TAC GCA GCG GCA GTC TTA GCC GAG CAC CAG CAG CAC ACC TTC TGG      492
Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp
    130                 135                 140
GGC CCA GGT TTG TCA CAG GGC CAC TCC GAT GCT TTG CGA CGC ATC CCT      540
Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro
145                 150                 155                 160
GGC GTT CAA AAG GCA GTC CAG TAC ACC CTC CCA TCC GAA GAC GCC CTG      588
Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu
                165                 170                 175
GAA AAG GCC CGC CGC GGC GAA GCC GGC GAC CTT ACC GGA AAG CAA ACC      636
Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr
            180                 185                 190
CAC AAG CGC CAA TGC TTC GTG GTT GCC GAC GCG GCC GAT CAC GAG CGC      684
His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
        195                 200                 205
ATC GAA AAC GAC ATC CGC ACC ATG CCT GAT TAC TTC GTT GGC TAC GAA      732
Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
    210                 215                 220
GTC GAA GTC AAC TTC ATC GAC GAA GCA ACC TTC GAC TCC GAG CAC ACC      780
Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr
```

```
225                 230                 235                 240
GGC ATG CCA CAC GGT GGC CAC GTG ATT ACC ACC GGC GAC ACC GGT GGC      828
Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
                245                 250                 255
TTC AAC CAC ACC GTG GAA TAC ATC CTC AAG CTG GAC CGA AAC CCA GAT      876
Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
            260                 265                 270
TTC ACC GCT TCC TCA CAG ATC GCT TTC GGT CGC GCA GCT CAC CGC ATG      924
Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
        275                 280                 285
AAG CAG CAG GGC CAA AGC GGA GCT TTC ACC GTC CTC GAA GTT GCT CCA      972
Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
    290                 295                 300
TAC CTG CTC TCC CCA GAG AAC TTG GAC GAT CTG ATC GCA CGC GAC GTC     1020
Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
305                 310                 315                 320
TAATTTAGCT CGAG                                                     1034
```

【０１２２】

配列番号：9

配列の長さ：320

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

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

```
            180                 185                 190
His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
        195                 200                 205
Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
    210                 215                 220
Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr
225                 230                 235                 240
Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
                245                 250                 255
Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
            260                 265                 270
Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
        275                 280                 285
Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
    290                 295                 300
Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
305                 310                 315                 320
```

【０１２３】

配列番号：10

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　合成DNA

アンチセンス:NO

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT　23

【０１２４】

配列番号：11
配列の長さ：21
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
アンチセンス:YES
ACGGAATTCA ATCTTACGGC C 21

【０１２５】

配列番号：12

配列の長さ：1643

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：GenomicDNA

起源

生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)

株名： ATCC 13869

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC 60

TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT 120

GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180

GTAACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT 240

GGCGGTTCCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC 300

ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360

GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG 420

CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT 480

GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC 540

GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600

AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG 660

TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT 720

GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT 780

AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC 840

TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC 900

GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT 960

CCTGTGGAAG AAGCAGTCCT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC 1020

GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT 1080

GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTTCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC 1140

GACATCACGT TCACCTGCCC TCGCGCTGAC GGACGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG 1200
CTTCAGGTTC AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC 1260
CTCGTGGGTG CTGGCATGAA GTCTCACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG 1320
CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG 1380
ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCATTGC ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC 1440
GGCGAAGACG AAGCCGTCGT TTATGCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTTAA AGGAGTAGTT 1500
TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG GTTATGCGCA 1560
CCCTTTTGGA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG ACACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCCGCGTT 1620
CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

【０１２６】

配列番号：13
配列の長さ：1643
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：GenomicDNA
起源
生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)
株名： ATCC 13869
配列の特徴
特徴を表わす記号：CDS
存在位置：217..1482
配列

```
TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC     60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT    120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG    180
GTAACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG      234
                                         Met Ala Leu Val Val Gln
                                           1               5
AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC      282
Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val
             10                  15                  20
GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT      330
Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val
         25                  30                  35
GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA      378
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala
     40                  45                  50
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG      426
```

```
Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu
 55                  60                  65                  70
ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG      474
Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu
                 75                  80                  85
TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG      522
Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val
             90                  95                 100
CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG      570
Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro
        105                 110                 115
GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT      618
Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala
    120                 125                 130
GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT      666
Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly
135                 140                 145                 150
CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC      714
Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn
                155                 160                 165
GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT      762
Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala
            170                 175                 180
GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC AGC TTC      810
Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe
        185                 190                 195
GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG      858
Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu
    200                 205                 210
```

```
CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTA CGC      906
Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg
215                 220                 225                 230
TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG      954
Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu
                235                 240                 245
GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG     1002
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys
            250                 255                 260
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG     1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu
        265                 270                 275
GCT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC     1098
Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp
    280                 285                 290
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC     1146
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile
295                 300                 305                 310
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG     1194
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu
                315                 320                 325
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC     1242
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp
            330                 335                 340
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA     1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro
        345                 350                 355
GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC     1338
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn
```

```
    360                 365                 370
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT     1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg
375                 380                 385                 390
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG     1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln
                395                 400                 405
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA     1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
            410                 415                 420
AGTTTTAAAG GAGTAGTTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG   1542
TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTTGGAAG AGCGCAATTT CCCAGCTGAC ACTGTTCGTT   1602
TCTTTGCTTC CCCGCGTTCC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C                       1643
```

【０１２７】

配列番号：14

配列の長さ：421

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

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

180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly

195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg

305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr

325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

355 360 365

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

370 375 380

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

385 390 395 400

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405 410 415

Ala Gly Thr Gly Arg

420

【０１２８】

配列番号：15

配列の長さ：1643

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：GenomicDNA

起源

生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)

株名： ATCC 13869

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：964..1482

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC 60

TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT 120

GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180

GTAACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT 240

GGCGGTTCCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC 300

ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360

GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG 420

CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT 480

GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC 540

GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600

AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG 660

TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT 720

GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT 780

AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC 840

TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC 900

GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT 960

```
CCT  GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA    1008
     Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu
       1               5                  10                  15
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC    1056
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala
                  20                  25                  30
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT    1104
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val
              35                  40                  45
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC    1152
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe
          50                  55                  60
ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG    1200
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys
      65                  70                  75
CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC    1248
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val
80                  85                  90                  95
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT    1296
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val
                 100                 105                 110
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA    1344
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu
             115                 120                 125
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT    1392
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp
         130                 135                 140
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC    1440
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly
```

```
    145                 150                 155
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTTAA     1490
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
160                 165                 170
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG   1550
GTTATGCGCA CCCTTTTGGA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG ACACTGTTCG TTTCTTTGCT   1610
TCCCCGCGTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC                                1643
```

【０１２９】

配列番号：16
配列の長さ：172
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

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

【０１３０】

配列番号：17
配列の長さ：23
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
アンチセンス:NO
配列
GTCGACGGAT CGCAAATGGC AAC 23

【０１３１】
配列番号：18
配列の長さ：23
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
アンチセンス:YES
配列
GGATCCTTGA GCACCTTGCG CAG 23

【０１３２】

配列番号：19
配列の長さ：1411
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：GenomicDNA
起源
生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)
株名： ATCC 13869
配列の特徴
特徴を表わす記号：CDS
存在位置：311..1213
配列

```
CTCTCGATAT CGAGAGAGAA GCAGCGCCAC GGTTTTTCGG TGATTTTGAG ATTGAAACTT     60
TGGCAGACGG ATCGCAAATG GCAACAAGCC CGTATGTCAT GGACTTTTAA CGCAAAGCTC    120
ACACCCACGA GCTAAAAATT CATATAGTTA AGACAACATT TTTGGCTGTA AAAGACAGCC    180
GTAAAAACCT CTTGCTCATG TCAATTGTTC TTATCGGAAT GTGGCTTGGG CGATTGTTAT    240
GCAAAAGTTG TTAGGTTTTT TGCGGGGTTG TTTAACCCCC AAATGAGGGA AGAAGGTAAC    300
CTTGAACTCT ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC        349
           Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His
             1               5                  10
TTC GGC ACC GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA      397
Phe Gly Thr Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly
    15                  20                  25
GAC ATC GAT ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT GAT      445
Asp Ile Asp Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp
 30                  35                  40                  45
AAG GGC TTG GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA      493
Lys Gly Leu Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro
```

```
                    50                  55                  60
ACG ACA ACC GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG      541
Thr Thr Thr Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu
                65                  70                  75
GAA GTT GGG GAT CGG GCG AAC GTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC      589
Glu Val Gly Asp Arg Ala Asn Val Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn
            80                  85                  90
ACG CGG ACA TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA      637
Thr Arg Thr Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala
        95                  100                 105
GAC GGC CTT TTA GTT GTA ACT CCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG      685
Asp Gly Leu Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu
    110                 115                 120                 125
GGA TTG CTG GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA      733
Gly Leu Leu Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro
                130                 135                 140
ATT TGT CTC TAT GAC ATT CCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT      781
Ile Cys Leu Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser
            145                 150                 155
GAT ACC ATG AGA CGC CTG AGT GAA TTA CCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG      829
Asp Thr Met Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys
        160                 165                 170
GAC GCC AAG GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG      877
Asp Ala Lys Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr
    175                 180                 185
GGA CTT GCC TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT      925
Gly Leu Ala Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu
190                 195                 200                 205
GCT TTG GGC GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC      973
```

```
Ala Leu Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro
                210                 215                 220
ACA GCA TTA CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC    1021
Thr Ala Leu Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val
            225                 230                 235
CGT GCG CGG GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA    1069
Arg Ala Arg Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln
        240                 245                 250
GGT CGC TTG GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT CTG CGT CTG CAG    1117
Gly Arg Leu Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln
    255                 260                 265
GGC ATC AAC GTA GGA GAT CCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG    1165
Gly Ile Asn Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu
270                 275                 280                 285
CAG GAA CTT GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA    1213
Gln Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu
                290                 295                 300
TAAATATGAA TGATTCCCGA AATCGCGGCC GGAAGGTTAC CCGCAAGGCG GCCCACCAGA  1273
AGCTGGTCAG GAAAACCATC TGGATACCCC TGTCTTTCAG GCACCAGATG CTTCCTCTAA  1333
CCAGAGCGCT GTAAAAGCTG AGACCGCCGG AAACGACAAT CGGGATGCTG CGCAAGGTGC  1393
TCAAGGATCC CAACATTC                                              1411
```

【０１３３】

配列番号：20
配列の長さ：301
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

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

180 185 190

Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly

195 200 205

Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu

210 215 220

Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg

225 230 235 240

Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu

245 250 255

Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln Gly Ile Asn

260 265 270

Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu Leu

275 280 285

Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu

290 295 300

【０１３４】

配列番号：21

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　合成DNA

アンチセンス:NO

配列

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA 23

【０１３５】

配列番号：22
配列の長さ：23
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
アンチセンス:YES
配列
CGGTTCATCG CCAAGTTTTT CTT　23

【０１３６】

配列番号：23

配列の長さ：2001

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：GenomicDNA

起源

生物名： ﾌﾞﾚﾋﾞﾊﾞｸﾃﾘｳﾑ・ﾗｸﾄﾌｧｰﾒﾝﾀﾑ(Brevibacterium lactofermentum)

株名： ATCC 13869

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：730..1473

配列

```
GGATCCCCAA TCGATACCTG GAACGACAAC CTGATCAGGA TATCCAATGC CTTGAATATT     60
GACGTTGAGG AAGGAATCAC CAGCCATCTC AACTGGAAGA CCTGACGCCT GCTGAATTGG    120
ATCAGTGGCC CAATCGACCC ACCAACCAGG TTGGCTATTA CCGGCGATAT CAAAAACAAC    180
TCGCGTGAAC GTTTCGTGCT CGGCAACGCG GATGCCAGCG ATCGACATAT CGGAGTCACC    240
AACTTGAGCC TGCTGCTTCT GATCCATCGA CGGGGAACCC AACGGCGGCA AAGCAGTGGG    300
GGAAGGGGAG TTGGTGGACT CTGAATCAGT GGGCTCTGAA GTGGTAGGCG ACGGGGCAGC    360
ATCTGAAGGC GTGCGAGTTG TGGTGACCGG GTTAGCGGTT TCAGTTTCTG TCACAACTGG    420
AGCAGGACTA GCAGAGGTTG TAGGCGTTGA GCCGCTTCCA TCACAAGCAC TTAAAAGTAA    480
AGAGGCGGAA ACCACAAGCG CCAAGGAACT ACCTGCGGAA CGGGCGGTGA AGGGCAACTT    540
AAGTCTCATA TTTCAAACAT AGTTCCACCT GTGTGATTAA TCTCCAGAAC GGAACAAACT    600
GATGAACAAT CGTTAACAAC ACAGACCAAA ACGGTCAGTT AGGTATGGAT ATCAGCACCT    660
TCTGAATGGG TACGTCTAGA CTGGTGGGCG TTTGAAAAAC TCTTCGCCCC ACGAAAATGA    720
AGGAGCATA ATG GGA ATC AAG GTT GGC GTT CTC GGA GCC AAA GGC CGT          768
          Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg
            1               5                  10
GTT GGT CAA ACT ATT GTG GCA GCA GTC AAT GAG TCC GAC GAT CTG GAG       816
```

```
Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu
     15                  20                  25
CTT GTT GCA GAG ATC GGC GTC GAC GAT GAT TTG AGC CTT CTG GTA GAC      864
Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp
 30                  35                  40                  45
AAC GGC GCT GAA GTT GTC GTT GAC TTC ACC ACT CCT AAC GCT GTG ATG      912
Asn Gly Ala Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met
                 50                  55                  60
GGC AAC CTG GAG TTC TGC ATC AAC AAC GGC ATT TCT GCG GTT GTT GGA      960
Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly
             65                  70                  75
ACC ACG GGC TTC GAT GAT GCT CGT TTG GAG CAG GTT CGC GCC TGG CTT     1008
Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu
         80                  85                  90
GAA GGA AAA GAC AAT GTC GGT GTT CTG ATC GCA CCT AAC TTT GCT ATC     1056
Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile
     95                 100                 105
TCT GCG GTG TTG ACC ATG GTC TTT TCC AAG CAG GCT GCC CGC TTC TTC     1104
Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe
110                 115                 120                 125
GAA TCA GCT GAA GTT ATT GAG CTG CAC CAC CCC AAC AAG CTG GAT GCA     1152
Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala
                130                 135                 140
CCT TCA GGC ACC GCG ATC CAC ACT GCT CAG GGC ATT GCT GCG GCA CGC     1200
Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg
            145                 150                 155
AAA GAA GCA GGC ATG GAC GCA CAG CCA GAT GCG ACC GAG CAG GCA CTT     1248
Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu
        160                 165                 170
```

```
GAG GGT TCC CGT GGC GCA AGC GTA GAT GGA ATC CCA GTT CAC GCA GTC     1296
Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val
    175                 180                 185
CGC ATG TCC GGC ATG GTT GCT CAC GAG CAA GTT ATC TTT GGC ACC CAG     1344
Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln
190                 195                 200                 205
GGT CAG ACC TTG ACC ATC AAG CAG GAC TCC TAT GAT CGC AAC TCA TTT     1392
Gly Gln Thr Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe
                210                 215                 220
GCA CCA GGT GTC TTG GTG GGT GTG CGC AAC ATT GCA CAG CAC CCA GGC     1440
Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly
            225                 230                 235
CTA GTC GTA GGA CTT GAG CAT TAC CTA GGC CTG TAAAGGCTCA TTTCAGCAGC   1493
Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu
        240                 245
GGGTGGAATT TTTTAAAAGG AGCGTTTAAA GGCTGTGGCC GAACAAGTTA AATTGAGCGT   1553
GGAGTTGATA GCGTGCAGTT CTTTTACTCC ACCCGCTGAT GTTGAGTGGT CAACTGATGT   1613
TGAGGGCGCG GAAGCACTCG TCGAGTTTGC GGGTCGTGCC TGCTACGAAA CTTTTGATAA   1673
GCCGAACCCT CGAACTGCTT CCAATGCTGC GTATCTGCGC CACATCATGG AAGTGGGGCA   1733
CACTGCTTTG CTTGAGCATG CCAATGCCAC GATGTATATC CGAGGCATTT CTCGGTCCGC   1793
GACCCATGAA TTGGTCCGAC ACCGCCATTT TTCCTTCTCT CAACTGTCTC AGCGTTTCGT   1853
GCACAGCGGA GAATCGGAAG TAGTGGTGCC CACTCTCATC GATGAAGATC CGCAGTTGCG   1913
TGAACTTTTC ATGCACGCCA TGGATGAGTC TCGGTTCGCT TTCAATGAGC TGCTTAATGC   1973
GCTGGAAGAA AAACTTGGCG ATGAACCG                                      2001
```

【０１３７】

配列番号：24
配列の長さ：248
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：タンパク質
配列

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

180 185 190

Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln Gly Gln Thr

195 200 205

Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe Ala Pro Gly

210 215 220

Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly Leu Val Val

225 230 235 240

Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu

245

【図面の簡単な説明】

【図１】 lysAを有するプラスミドp299LYSAの構築の過程を示す図。

【図２】 lysA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpLYSABの構築の過程を示す図。

【図３】 ddh及びBrevi.ori-を有するプラスミドpPK4Dの構築の過程を示す図。

【図４】 ddh及びlysAを有するプラスミドp399DLの構築の過程を示す図。

【図５】 ddh、lysA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpDLの構築の過程を示す図。

【図６】 変異型lysCを有するプラスミドp399AK9B及びp399AKYB構築の過程を示す図。

【図７】 dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpDPRBの構築の過程を示す図。

【図８】 dapA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpDPSBの構築の過程を示す図。

【図９】 lysC、dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCRCABの構築の過程を示す図。

【図１０】 変異型lysC、dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCBの構築の過程を示す図。

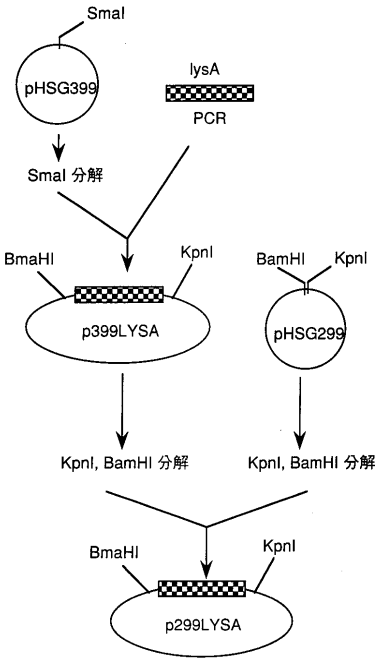
【図１１】 dapA、dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpABの構築の過程を示す図。

【図１２】 変異型lysC、dapA、dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCABの構築の過程を示す図。

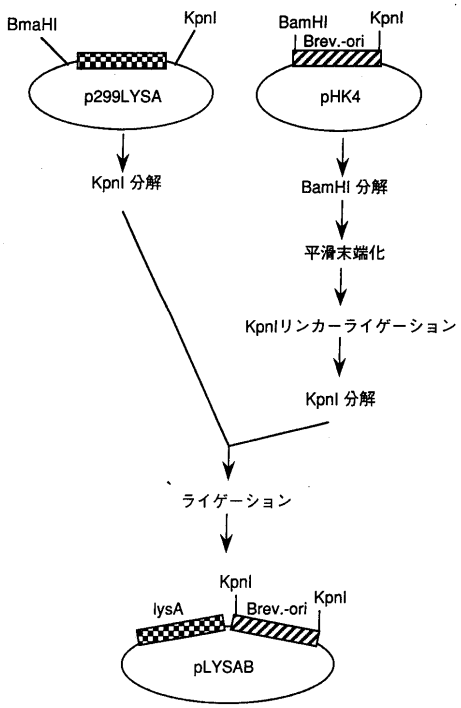
【図１３】 変異型lysC、dapA、dapB、lysA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCABLの構築の過程を示す図。

【図１４】 変異型lysC、dapA、dapB、ddh、lysA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCABDLの構築の過程を示す図。

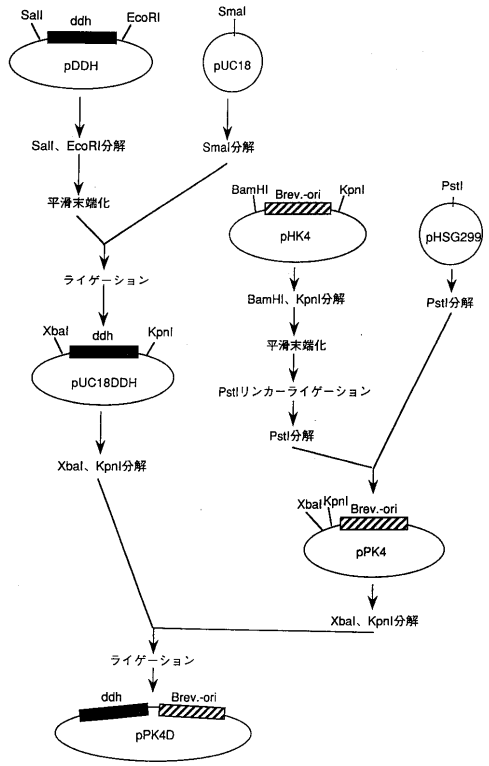
【図１】


SmaI
pHSG399
lysA
PCR
SmaI 分解
BmaHI
KpnI
p399LYSA
BamHI
KpnI
pHSG299
KpnI, BamHI 分解
KpnI, BamHI 分解
BmaHI
KpnI
p299LYSA

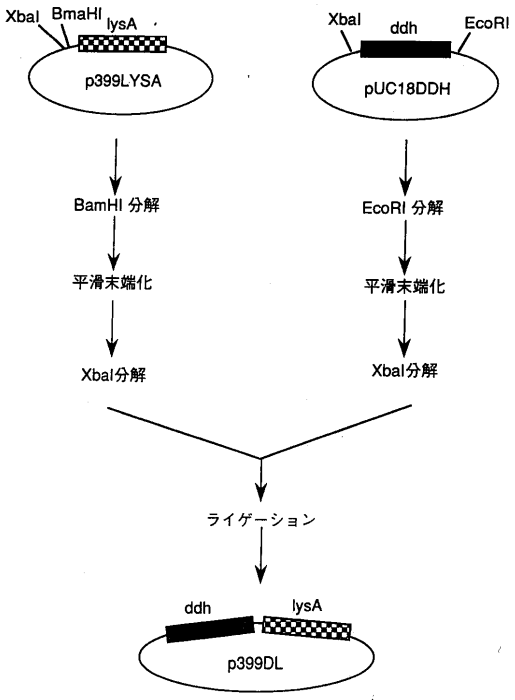
【図２】


BmaHI
KpnI
p299LYSA
BamHI
KpnI
Brev.-ori
pHK4
KpnI 分解
BamHI 分解
平滑末端化
KpnIリンカーライゲーション
KpnI 分解
ライゲーション
KpnI
lysA
Brev.-ori
KpnI
pLYSAB

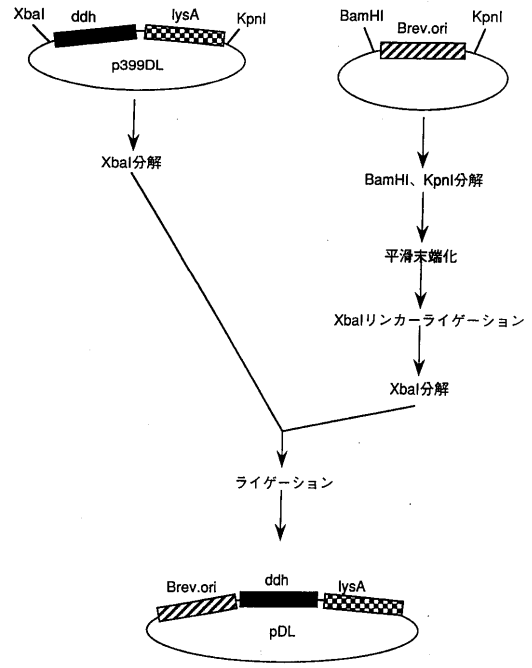
【図３】


SalI
ddh
EcoRI
pDDH
SmaI
pUC18
SalI、EcoRI分解
SmaI分解
平滑末端化
ライゲーション
XbaI
ddh
KpnI
pUC18DDH
XbaI、KpnI分解
BamHI
Brev.-ori
KpnI
pHK4
BamHI、KpnI分解
平滑末端化
PstIリンカーライゲーション
PstI分解
PstI
pHSG299
PstI分解
XbaI
KpnI
Brev.-ori
pPK4
XbaI、KpnI分解
ライゲーション
ddh
Brev.-ori
pPK4D

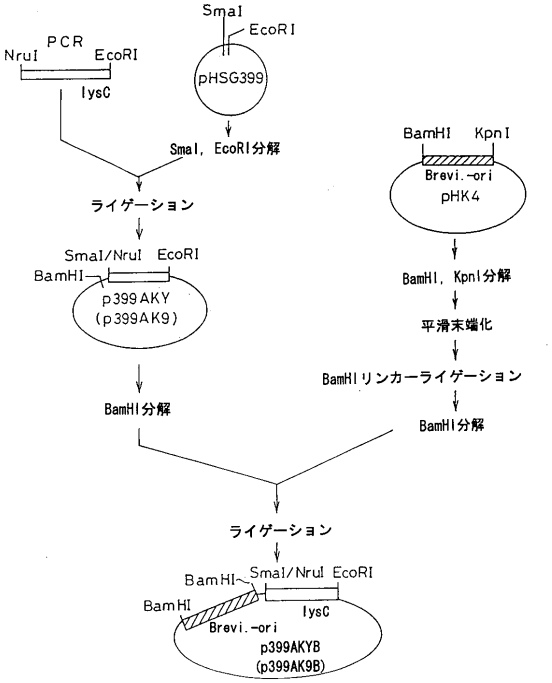
【図４】


XbaI
BmaHI
lysA
p399LYSA
XbaI
ddh
EcoRI
pUC18DDH
BamHI 分解
平滑末端化
XbaI分解
EcoRI 分解
平滑末端化
XbaI分解
ライゲーション
ddh
lysA
p399DL

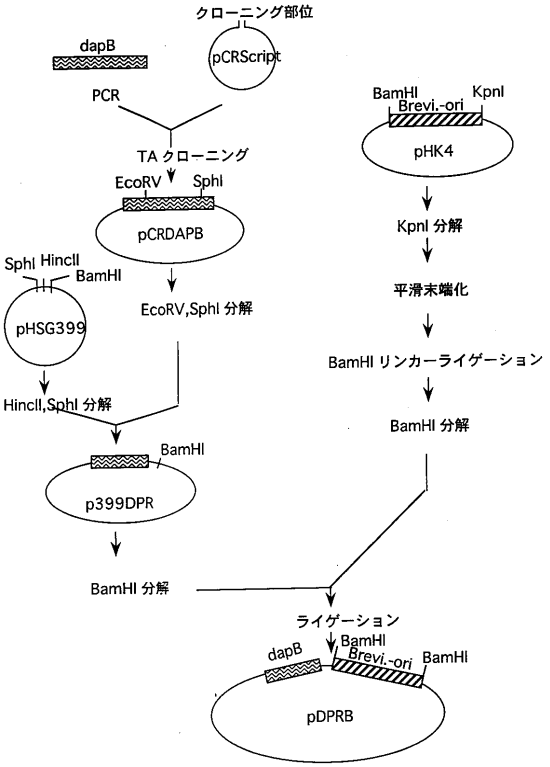
【図５】


XbaI
ddh
lysA
KpnI
p399DL
XbaI分解
BamHI
Brev.ori
KpnI
BamHI、KpnI分解
平滑末端化
XbaIリンカーライゲーション
XbaI分解
ライゲーション
Brev.ori
ddh
lysA
pDL

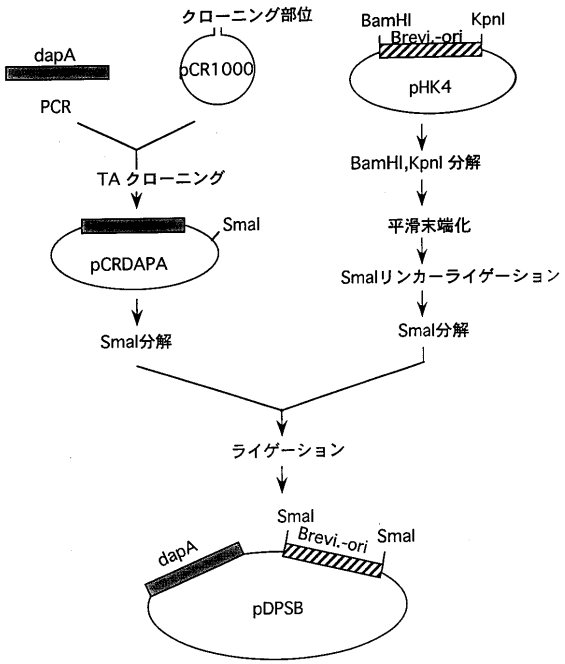
【図６】


SmaI
EcoRI
NruI
PCR
EcoRI
lysC
pHSG399
SmaI, EcoRI分解
ライゲーション
SmaI/NruI EcoRI
BamHI
p399AKY
(p399AK9)
BamHI分解
BamHI KpnI
Brevi.-ori
pHK4
BamHI, KpnI分解
平滑末端化
BamHIリンカーライゲーション
BamHI分解
ライゲーション
BamHI
SmaI/NruI EcoRI
BamHI
lysC
Brevi.-ori
p399AKYB
(p399AK9B)

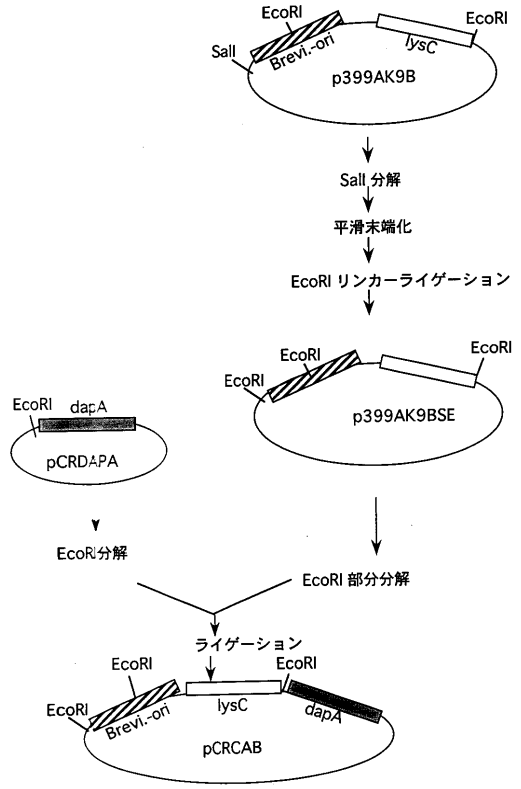
【図７】


クローニング部位
dapB
pCRScript
PCR
TA クローニング
EcoRV
SphI
pCRDAPB
SphI HincII
BamHI
pHSG399
EcoRV,SphI 分解
HincII,SphI 分解
BamHI
p399DPR
BamHI 分解
BamHI
Brevi.-ori
KpnI
pHK4
KpnI 分解
平滑末端化
BamHI リンカーライゲーション
BamHI 分解
ライゲーション
BamHI
dapB
Brevi.-ori
BamHI
pDPRB

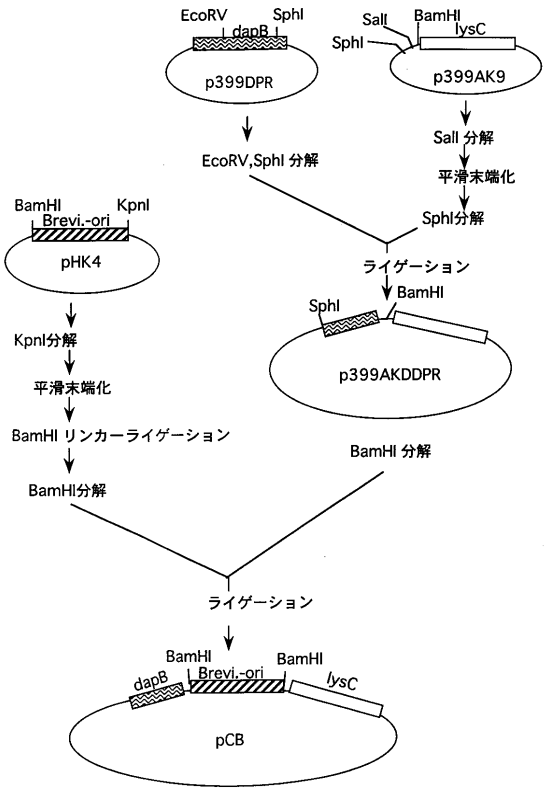
【図８】


クローニング部位
dapA
pCR1000
PCR
TA クローニング
SmaI
pCRDAPA
SmaI分解
BamHI
Brevi.-ori
KpnI
pHK4
BamHI,KpnI 分解
平滑末端化
SmaIリンカーライゲーション
SmaI分解
ライゲーション
SmaI
Brevi.-ori
SmaI
dapA
pDPSB

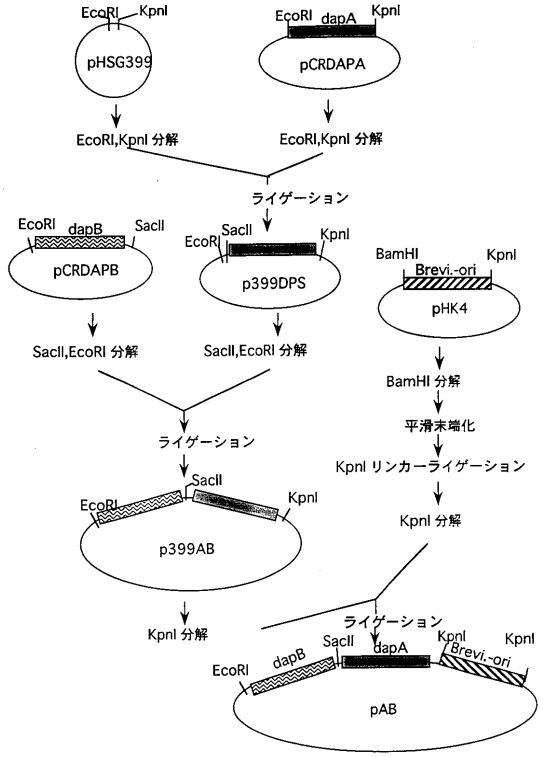
【図９】



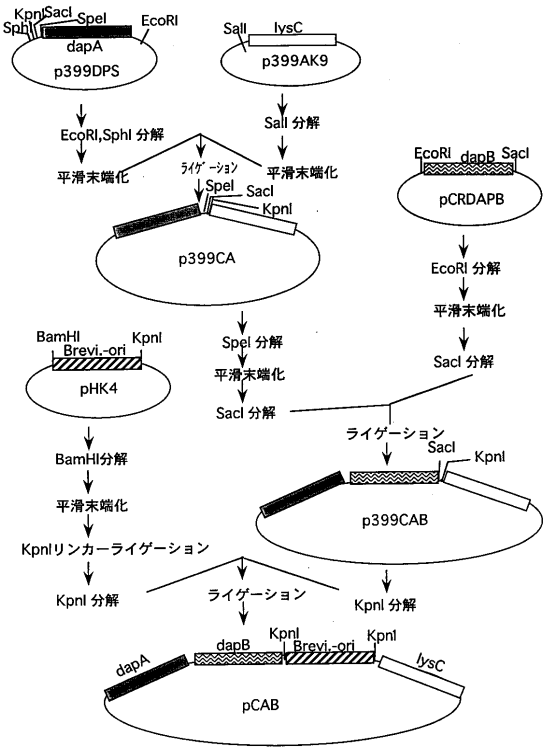
【図１０】



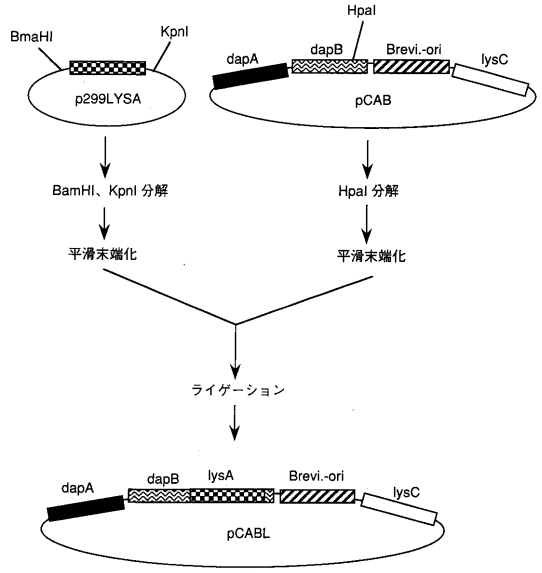
【図１１】



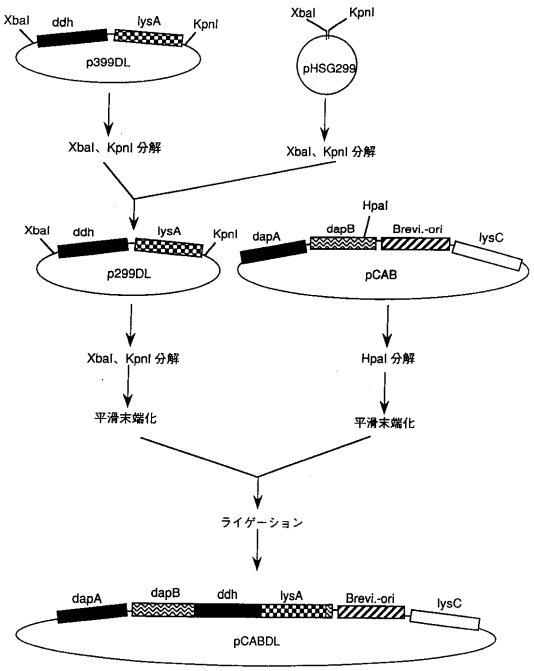
【図１２】



【図１３】


BmaHI
KpnI
p299LYSA
HpaI
dapA
dapB
Brevi.-ori
lysC
pCAB
BamHI、KpnI 分解
HpaI 分解
平滑末端化
平滑末端化
ライゲーション
dapA
dapB
lysA
Brevi.-ori
lysC
pCABL

【図１４】


XbaI
ddh
lysA
KpnI
p399DL
XbaI
KpnI
pHSG299
XbaI、KpnI 分解
XbaI、KpnI 分解
HpaI
XbaI
ddh
lysA
KpnI
dapA
dapB
Brevi.-ori
lysC
p299DL
pCAB
XbaI、KpnI 分解
HpaI 分解
平滑末端化
平滑末端化
ライゲーション
dapA
dapB
ddh
lysA
Brevi.-ori
lysC
pCABDL

フロントページの続き

(72)発明者 中野 英一
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内
(72)発明者 泉井 正子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内
(72)発明者 早川 敦
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内
(72)発明者 吉原 康彦
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内
(72)発明者 中松 亘
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社生産技術研究所内

審査官 渡邉 潤也

(56)参考文献 特開平０５－２８４９７０（ＪＰ，Ａ）
特開昭６０－０６２９９４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９６／０４０９３４（WO，Ａ１）
国際公開第９５／０１６０４２（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDream2)