

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-254544
(P2004-254544A)

(43) 公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/88
C12P 13/08
//(C12P 13/08

F 1

C12N 15/00 Z N A A
C12N 1/21
C12N 9/88
C12P 13/08 A
C12P 13/08 A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 5 0
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号
(22) 出願日

特願2003-47185 (P2003-47185)
平成15年2月25日 (2003. 2. 25)

(71) 出願人 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 100100549
弁理士 川口 嘉之
(74) 代理人 100090516
弁理士 松倉 秀実
(74) 代理人 100089244
弁理士 遠山 勉
(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
素株式会社内
(72) 発明者 安枝 寿
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子及びL-リジンの製造法

(57) 【要約】

【課題】メタノール資化菌、特にメチロフィラス属細菌のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子とそれを用いたL-リジン製造法を提供する。

【解決手段】下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAと同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同DNAと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失したメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養し、培養物中にL-リジンを生成蓄積させ、該培養物からL-リジンを採取する。

(A) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

10

(B) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 2】

下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 3】

下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 2 に記載の DNA。

(a) 配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 684 ~ 2930 からなる塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 684 ~ 2930 からなる塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、リジン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 DNA。

【請求項 4】

メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の DNA。

【請求項 5】

L-リジン生産能を有し、かつ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失するように改変されたメチロフィラス属細菌。

【請求項 6】

染色体上の遺伝子であって、かつ、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失した請求項 5 に記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養し、培養物中に L-リジンを生成蓄積させ、該培養物から L-リジンを採取することを特徴とする L-リジンの製造方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、L-リジンの分解に関するメチロフィラス属細菌の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子、当該遺伝子の発現が抑えられたメチロフィラス属細菌及び当該細菌を用いた L-リジンの製造法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

L-リジンの分解酵素として、L-リジンの脱炭酸によりカダベリンを生成する反応を触媒するリジンデカルボキシラーゼ(リジン脱炭酸酵素)が知られている。例えば、エシェリヒア・コリ(E. coli)では、CadAとLdcと名づけられた2つの酵素がある(特許文献1)。更には、バチラス・ハロジュランス(Bacillus halodulans)、バチラス・サチラス(Bacillus subtilis)、ビブリオ・コレラ(Vibrio cholerae)、サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)、セレノモナス・ルミナンチウム(Sele 50

nomonas ruminantium)、ニコチアナ・グルチノーサ (Nicotiana glutinosa) などの細菌において、ゲノム上の遺伝子配列情報からや、あるいは実験的結果に基づき、その酵素があることが示唆されている (非特許文献 1 ~ 3)。しかしながら、メタノール資化性菌において、そのような酵素の存在は定かではない。

【0003】

一方、メチロフィラス属細菌を用いた L - リジンの製造方法として、リジンアナログ、例えば、AEC (S - (2 - アミノエチル) - L - システィン) に耐性な変異株、または L - リジンの生合成に関する遺伝情報を担うデオキシリボ核酸を組み込んだベクターを保有する組換え体を培養する方法が知られている (特許文献 2)。しかしながら、メチロフィラス属細菌ではリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子は知られておらず、同遺伝子の発現が抑えられた、あるいは欠損させたメチロフィラス属細菌を用いた L - リジン生産についての報告もない。

【0004】

【特許文献 1】

国際公開第 96 / 17930 号パンフレット

【特許文献 2】

国際公開第 00 / 61723 号パンフレット

【非特許文献 1】

KEGG データベース (Release 25.0, January 2003) 20

【非特許文献 2】

Y. Takatsuka, et al., "Journal of Bacteriology", (2000) vol. 182, p. 6732 - 6741 30

【非特許文献 3】

Y. - S. Lee and Y. - D. Cho, "The Biochemical Journal", (2001) vol. 360, p. 657 - 665

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、メタノール資化性細菌であるメチロフィラス・メチロトロファスのリジンデカルボキシラーゼ遺伝子を取得し、この遺伝子を利用して、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現が抑えられたメチロフィラス属に属する L - リジン生産菌を造成し、また、これらメチロフィラス属細菌を培養することによる L - リジン製造法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、メチロフィラス属細菌にリジンデカルボキシラーゼが存在しているか否かにつき鋭意研究を行った結果、メチロフィラス・メチロトロファスのゲノム上の DNA 配列から、他の微生物由来である既知のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子とやや相同性のあるオープンリーディングフレーム (以下、「orf」と略する) を発見した。そのアミノ酸配列の相同性としては、例えば、エシェリヒア・コリの cadA 産物 (E. coli K12 NCB1 : ACC77092) との相同性 (同一アミノ酸となる割合) は 38.18%、また ldcC 産物 (E. coli K12 NCB1 : ACC73297) との相同性は 37.85% であった。また、この orf のアミノ酸配列は、エシェリヒア・コリの adiA の遺伝子産物 (E. coli K12 NCB1 : ACC77078) であるアルギニンデカルボキシラーゼにも約 38.11% の相同性を有しており、その実体は不明であった。

【0007】

そこで、メチロフィラス・メチロトロファスの当該 orf を破壊したところ、通常、メチロフィラス・メチロトロファスの野生株が生育する S E I I 培地には生育しなくなつた。これは意外なことで、エシェリヒア・コリなどでは、cadA 及び ldcC を欠損させて

10

20

30

40

50

も、特別な栄養要求性を示さない。

【0008】

メチロフィラス・メチロトロファスの場合は、当該 *orf* の欠損により、SEII 培地成分では不足している栄養分があると考えられたため、培地へ L-リジンの分解産物であるカダベリン又は L-アルギニンの分解産物であるアグマチンを適量添加したところ、その欠損株は生育可能となつた。

【0009】

従つて、メチロフィラス・メチロトロファスでは当該 *orf* にコードされるタンパク質は、通常の最少培地に生育するためには必須であること、そして、その *orf* の欠損株の生育にはカダベリン又はアグマチンが必要であることが判明した。このことから、この *orf* 10 を含む遺伝子を、*ldc* 遺伝子と命名した。

【0010】

そして、メチロフィラス・メチロトロファスから育種した L-リジン生産菌において、*ldc* 遺伝子の発現を抑えたところ、生成される L-リジンの生産量が向上することを見出し、本発明を完成するに至つた。

即ち、本発明は、以下のとおりである。

【0011】

(1) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。 20

(2) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。 30

(3) 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である (2) の DNA。

(a) 配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 684 ~ 2930 からなる塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 684 ~ 2930 からなる塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、リジン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 DNA。 40

(4) メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする (2) 又は (3) に記載の DNA。

(5) L-リジン生産能を有し、かつ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失するように改変されたメチロフィラス属細菌。

(6) 染色体上の遺伝子であつて、かつ、(2) ~ (4) のいずれかに記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失した (5) に記載のメチロフィラス属細菌。 40

(7) (6) に記載のメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養し、培養物中に L-リジンを生成蓄積させ、該培養物から L-リジンを採取することを特徴とする L-リジンの製造方法。

【0012】

【発明の実施の形態】

<1> 本発明のリジンデカルボキシラーゼ及びそれをコードする DNA

本発明のリジンデカルボキシラーゼは、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質である。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

【0013】

(B) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【0014】

また、本発明のDNAは、上記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAである。

【0015】

本発明のDNA(以下、「1dc遺伝子」ということがある)は、メチロフィラス属細菌、例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの染色体DNAから単離、取得することができる。メチロフィラス・メチロトロファスの野生株AS1株(NCIMB No. 10515)は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア(National Collection of Industrial and Marine Bacteria、住所NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom)から入手可能である。そしてこの株の一般的な培養方法は、NCIMBのカタログに記載されているが、また実施例に記載したSEII培地でも生育させることができる。

【0016】

そしてこの株の一般的な培養方法は、NCIMBのカタログに記載されているが、また実施例に記載したSEII培地でも生育させることができる。

AS1株のゲノムDNAは公知の方法により調製できるが、市販のゲノム調製用キットを使用してもよい。

【0017】

本発明のDNAは、本発明によってこれらの塩基配列が明らかになったので、これらの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、メチロフィラス属細菌等の細菌の染色体DNAを鑄型とするPCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)により増幅することによって、取得することができる。また、前記塩基配列に基づいて調製したプローブ、又はPCRにより増幅した部分断片をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーションによっても、本発明のDNAは取得され得る。

【0018】

本発明のDNAのクローニングに用いるゲノムDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断および連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001)に記載されている。

【0019】

上記PCRに用いるプライマーとしては、配列番号1と及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

上記のようにして取得されたメチロフィラス・メチロトロファスのゲノムから単離された1dc遺伝子の塩基配列を配列番号3に示す。また、それによってコードされるリジンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0020】

上記アミノ酸配列を、既知のアミノ酸配列のデータベースを用いて、相同性のある配列を検索したところ、エシェリヒア・コリの2種のリジンデカルボキシラーゼ(遺伝子はそれぞれ、cadAと1dcC)およびアルギニンデカルボキシラーゼ(遺伝子はadiA)と、それぞれ38.18%、37.85%、及び38.11%の相同性が認められた。相同性は、比較に用いた領域の全アミノ酸残基数に対する同一アミノ酸残基の個数の割合として算出した。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明のDNAは、コードされるリジンデカルボキシラーゼの活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を含んでいてもよい。ここで、数個とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、例えば、リジンデカルボキシラーゼを構成するアミノ酸配列全体に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同意を有し、リジンデカルボキシラーゼの活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「数個」は、好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個である。前記リジンデカルボキシラーゼの活性とは、L-リジンを脱炭酸してカダベリンを生成する反応を触媒する活性をいう。

【0022】

10

上記のようなリジンデカルボキシラーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば、部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号3に示す塩基配列を改変することによって取得することができる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、1dc遺伝子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および1dc遺伝子を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NNTG)もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0023】

20

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、1dc遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)も含まれる。

【0024】

30

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現されたリジンデカルボキシラーゼの活性を調べることにより、リジンデカルボキシラーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有する1dc遺伝子を保持する細胞から、配列番号3の塩基番号684~2930からなる塩基配列を有するDNA、または同塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつリジン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DNAを単離することによっても、リジンデカルボキシラーゼと実質的に同一のタンパク質を、それぞれコードするDNAが得られる。

【0025】

40

ここでいう「ストリンジエントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同意が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましく90%以上の相同意を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同意が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60°、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0026】

プローブとしては、1dc遺伝子の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、当業者によく知られた方法により、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鑄型とするPCR反応により作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は50°、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0027】

なお、リジンデカルボキシラーゼ活性は、例えばY.-S. Lee and Y.-D. Cho, "The Biochemical Journal", (2001) 50

v o l . 3 6 0 , p . 6 5 7 - 6 6 5 の方法により測定することができる。

本発明の *l d c* 遺伝子は、後述するように *l d c* 遺伝子破壊株の構築に利用することができることに加えて、例えば、本発明のリジンデカルボキシラーゼの製造に利用することができる。すなわち、*l d c* 遺伝子を適当な宿主微生物に導入し、同遺伝子を発現させることにより、リジンデカルボキシラーゼを製造することができる。これは、遺伝子組換え技術を利用した有用タンパク質の製造に用いられる通常の方法と同様にして行うことができる。すなわち、リジンデカルボキシラーゼをコードする DNA を、適当なプロモーターを含むベクターに挿入し、得られる組換えベクターで大腸菌等の宿主を形質転換し、形質転換体を培養して前記遺伝子を発現させればよい。宿主としては、例えば大腸菌、枯草菌、酵母等が挙げられる。また、プロモーターは、用いる宿主で機能するものであればよく、一例としは *l a c* 、 *t r p* 、 *t a c* 、 *t r c* 、 *r e c A* 、 *T 7* (新生化学実験講座 1、タンパク質、V I 合成及び発現、日本生化学会編、p 166、安枝、松井、1992年、東京化学同人刊)、 *P G K* 、 *A D H 1* 、 *G P D* 、 *M F 1* 、 *S U C 2* 、 *P H O 5* 、 *G A L 1* 、 *G A L 4* (新生化学実験講座 1、タンパク質、V I 合成及び発現、日本生化学会編、p 215、酒井ら、1992年、東京化学同人刊)等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

宿主微生物からのリジンデカルボキシラーゼの採取は、通常の組換えタンパク質の製造と同様にして行うことができる。

【 0 0 2 9 】

< 2 > 本発明のメチロフィラス属細菌

本発明の細菌は、L - リジン生産能を有し、かつ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失するように改変されたメチロフィラス属細菌である。

【 0 0 3 0 】

メチロフィラス属細菌としては、メチロフィラス・メチロトロファスが挙げられる。また、本発明において「L - リジン生産能」とは、本発明の細菌を培地で培養したときに、培地中に有意な量のL - リジンを蓄積する能力をいう。

【 0 0 3 1 】

細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性の低下又は消失は、例えば、*l d c* 遺伝子の発現を抑えることによって行われる。また、この遺伝子によりコードされるリジンデカルボキシラーゼ酵素の構造を改変して、比活性を低下又は消失させることによっても、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性を低下又は消失させることができる。上記のような細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失したメチロフィラス属細菌は、例えば、メチロフィラス属細菌を紫外線照射またはN - メチル - N ' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (NTG) もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、リジンデカルボキシラーゼ活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

また、本発明の細菌の好ましい態様として、染色体上の*l d c* 遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失したメチロフィラス属細菌が挙げられる。ここでいう*l d c* 遺伝子とは、配列番号4に示すアミノ酸配列を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子、又は同遺伝子と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子を含む。前記相同組換えが起こり得る程度の相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。

【 0 0 3 3 】

染色体上の*l d c* 遺伝子の破壊は、実施例に示したように、相同性組換えを利用した遺伝子置換による方法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)) によって、行うことができる。相同性組換えは、細菌が一般的に持つ能力であり、メチロフィラス属細菌も、相同組換えによる

遺伝子置換が可能なことを、本発明者らは見出している。具体的には、正常な機能を有するリジンデカルボキシラーゼを産生しないように改変した *l d c* 遺伝子（欠失型 *l d c* 遺伝子）を含む DNA でメチロフィラス属細菌を形質転換し、欠失型 *l d c* 遺伝子と染色体上の *l d c* 遺伝子との間で組換えを起こさせる。この後、染色体上のプラスミドが組み込まれた部位で再び組換えが起こると、プラスミドが染色体上から抜け落ちる。その際、組換えが起きる位置によって、欠失型遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合と、正常な遺伝子が染色体上に固定され、欠失型遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合がある。前者のような菌株を選択することにより、染色体上の正常な遺伝子が欠失型遺伝子で置換された菌株を取得することができる。

10

【0034】

また、メチロフィラス・メチロトロファスにおいては、染色体上の目的遺伝子と相同な遺伝子を、直鎖状 DNA 断片の形態で導入することにより、細胞内で染色体上の目的遺伝子と導入した直鎖状 DNA 断片上の相同な遺伝子との間で相同組換えが起こり、遺伝子置換ができるることを本発明者らは見い出しており、このような手法も適用可能である。なお、この手法により遺伝子の置換を行った例を、後記実施例に記載している。

20

【0035】

前記欠失型 *l d c* 遺伝子としては、同遺伝子のコーディング領域の中の塩基配列中に 1 つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによってコードされるタンパク質の比活性が低下又は消失した遺伝子が挙げられる。また、コーディング領域の内部又は末端を欠失させた遺伝子、あるいは、コード領域に、他の配列を挿入した遺伝子等が挙げられる。他の配列としては、カナマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子が挙げられる。

20

【0036】

染色体上の *l d c* 遺伝子の発現を低下又は消失させることは、同遺伝子のプロモーター配列中に、1 つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって、転写レベルで遺伝子の発現を抑えること (M. Rosenberg and D. Court, Ann. Rev. Genetics 13 (1979) p. 319, P. Youderian, S. Bouvier and M. Susskind, Cell 30 (1982) P. 843-853 参照) によっても行うことができる。

30

【0037】

また、*l d c* 遺伝子の発現は、同遺伝子の SD 配列と開始コドンとの間の領域中に 1 つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによって、翻訳レベルで抑えることができる (J. J. Dunn, E. Buzash-Poller and F. W. Studier, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75 (1978) p. 2743 参照)。

40

【0038】

上記のようなプロモーター や SD 配列と開始コドンとの間の領域の改変は、前記の遺伝子置換と同様にして行うことができる。

遺伝子中に塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせるには、具体的には、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)) や、次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤により処理する方法 (Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75, 270 (1978)) が挙げられる。

40

【0039】

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA 塩基配列が決定されている目的遺伝子

50

を持つプラスミドを変性させて 1 本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。この後 1 本鎖 DNA と任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらに DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントと T 4 リガーゼを用いて完全な 2 本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子に変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リコンビナント PCR 法 (PCR Technology, Stockton press (1989)) 10 がある。

【0040】

以上のようにして取得した変異が導入されて改変または破壊された遺伝子を、メチロフィラス属細菌の染色体上の正常な遺伝子と置換することにより、細胞中の ldc 遺伝子の発現を抑えることができる。

【0041】

リジンデカルボキシラーゼ活性を低下または消失させるメチロフィラス属細菌は、L-リジン生産能を有する細菌である。L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジン生産能を有しない株に変異処理を施し、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(以下、AECと記す)等のリジンアナログに対する耐性を付与することにより取得することができる。変異処理の方法としては、エシェリヒア・コリの菌体にNTG や EMS 等の化学薬剤による処理、あるいは紫外線、放射線照射等の処理を施す方法がある。このような菌株の具体例としては、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608 が挙げられる。本菌株は、メチロフィラス・メチロトロファス AS1 株に AEC 耐性を付与することによって育種されたものである。尚、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608 は、1999年6月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター: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-17416として寄託され、2000年3月31日付にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7112が付与されている。30

【0042】

また、L-リジン生産能を有するメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジンの生合成に関する遺伝情報を担うDNAを遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても育種することができる。導入される遺伝子は、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ等、L-リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子であり、ジヒドロジピコリン酸合成酵素のように L-リジンによるフィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。

【0043】

また、L-リジンの菌体外への排出に関するタンパク質の活性を強化することによっても、L-リジン生産能を向上させることができる。L-リジンの細胞外への排出に関するタンパク質としては、lysE 遺伝子によってコードされる LysE タンパク質が知られている。尚、本発明者らは、ブレビバクテリウム属細菌に由来する野生型 lysE 遺伝子は、メチロフィラス属細菌中では全く機能しないが、同細菌で機能するような改変が可能であることを確認している。このような lysE タンパク質の改変体としては、後記実施例に示す lysE24 が挙げられる。40

【0044】

lysE 遺伝子がコードする LysE タンパク質は、6 個の疎水性ヘリックス領域を有している。それらの疎水性ヘリックス領域のいくつかは膜貫通領域であると推定される。また、N 末端から 3 番目と 4 番目の疎水性ヘリックス領域の間の領域は親水性であり、ルー

ブ構造をとると推定される。この親水性領域を本願発明においてはループ領域と呼ぶ。ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型 *lysE* の塩基配列及び *lysE* タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号 21 及び 22 に示す。同アミノ酸配列において、疎水性ヘリックス領域は、5~20、37~58、67~93、146~168、181~203、211~232 に相当する。また、ループ領域は 94~145 に相当する。

【0045】

本発明者らは、*lysE* 遺伝子はメチロフィラス属細菌においては致死的に働くが、ループ領域を持たない、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなる *lysE* タンパク質の改変体をコードする DNA は、メタノール資化性菌の L-リジンの細胞外への排出を促進することを見い出した。*lysE* 24 は、このような野生型 *lysE* タンパク質が持つループ領域を持たない変異型 *lysE* タンパク質、又は実質的に疎水性ヘリックスのみからなる変異型 *lysE* タンパク質をコードする。

【0046】

上記のような変異型 *lysE* としては、少なくとも一つ又は二つ以上の疎水性ヘリックスを有し、メチロフィラス属細菌に導入したときに L-リジンもしくは L-アルギニン又はこれらの両方の L-アミノ酸の細胞外への排出を促進するものであれば特に制限されないが、具体的には N 末端から 1 番目~6 番目の疎水性ヘリックスのすべてを有する変異型 *lysE* をコードする DNA が挙げられる。より具体的には、N 末端から 1 番目~3 番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4 番目~6 番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする DNA が挙げられる。前記 *lysE* 24 は、このような 1 番目~3 番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4 番目~6 番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする変異型 *lysE* の一例である。*lysE* 24 遺伝子には、3 番目の疎水性ヘリックスをコードする領域の下流に終止コドンが変異により導入されているが、この終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、*lysE* 24 遺伝子を導入したメチロフィラス・メチロトロファス AS1 株は L-リジンを培地中に蓄積しないことを、発明者らは確認している。このことから、1 番目~3 番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4 番目~6 番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドがそれぞれ別個に翻訳され、メチロフィラス属細菌中で機能しているものと推定される。いずれにしても、*lysE* 24 遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入すれば、L-リジンの生産量が向上する。

【0047】

前記のような L-リジンの細胞外への排出に関するタンパク質をコードする DNA、すなわち *lysE* 遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性菌中で L-リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

【0048】

メチロフィラス属細菌菌において L-リジンの排出遺伝子を増強する場合は、その遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換え DNA を作製し、これをメタノール資化性細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、トランスポゾンに搭載し、染色体への組み込みにより、また、メタノール資化性細菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子の上流に連結させることも可能である。

【0049】

上記のような L-リジン生合成系遺伝子又は L-リジン排出遺伝子等の目的遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入、増強するには、メチロフィラス属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに遺伝子を連結して組換え DNA を作製し、それでメチロフィラス・メチロトロファスを、例えばエレクトロポレーション法などにより形質転換する方法があり、その他

10

20

30

40

50

にトランスタクション、トランスポゾン (Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol. 1, 417, (1983))、Mu ファージ、(特開平2-109985号) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主染色体に組み込むことができる。

【0050】

前記メチロフィラス属細菌細胞内で自律複製可能なベクターとして具体的には、例えば、広宿主ベクターである RSF1010 及びその誘導体、例えば、pAYC32 (Chistoserdov, A. Y., Tsygankov, Y. D., Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいは pMFY42 (Gene, 44, 53 (1990)) や、pBBR1 及びその誘導体に由来するもの (Kovach, M. E., et al., Gene, 166, 175-176 (1995))、さらには pRK310 及びその誘導体に由来のもの (Edts. Murrell, J. C., and Dalton, H., Methane and methanol utilizers, Plenum Press, 183-206 (1992)) 等が利用できる。

【0051】

リジン生産能を有し、かつ、リジンデカルボキシラーゼが低下又は消失したメチロフィラス属細菌は、リジンデカルボキシラーゼが低下又は消失したメチロフィラス属細菌に L-リジン生産能を付与することによって取得することができる。また、上記細菌は、L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌のリジンデカルボキシラーゼが低下又は消失するように改変することによっても、取得することができる。

【0052】

<3> 本発明の L-リジンの製造法

上記のようにして取得したリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失したメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養することにより、培養物中に L-リジンを生成蓄積させることができる。L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌のリジンデカルボキシラーゼ活性を低下又は消失させることにより、L-リジン生産能を向上させることができる。

【0053】

L-リジン生産のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地である。主要炭素源としては、メタノールであるが、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、でんぶん加水分解物などの糖類、グリセロール、ソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸、ビルビン酸等の有機酸類を併用して用いることができる。「メタノールを主要炭素源とする」とは、全炭素源のうち、メタノールを 50% (w/w) 以上、好ましくは 80% (w/w) 以上であることをいう。メタノールを炭素源として用いる場合の濃度は、通常は 0.001% から 4% (w/v)、好ましくは 0.1% から 2% (w/v) である。また、グルコース等を添加する場合の濃度は、通常、0.1% から 3% (w/v)、好ましくは 0.1% から 1% (w/v) である。

【0054】

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源、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0055】

無機イオンとしては、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。これらの他に、有機微量栄養源として、ビタミン B₁、または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい場合もある。

【0056】

培養は、好気的条件下で 16 ~ 72 時間程度実施するのがよく、培養温度は 25 ~ 45

30

40

50

に、培養中 pH は 5 ~ 8 に制御する。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、あるいはアンモニアガス等を使用することができる。

【0057】

培養終了後、発酵液からの 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適宜実施できる。

【0058】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

【0059】

【実施例 1】メチロフィラス・メチロトロファスのリジンデカルボキシラーゼ遺伝子 (1 10 d c) のクローニング

メチロフィラス・メチロトロファスの野生株 AS1 株から染色体 DNA を取得することを目的に、AS1 株を 50 mL の S E I I 培地 (組成: (NH₄)₂SO₄ 5 g / L, K₂HPO₄ 1.9 g / L, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.56 g / L, MgSO₄ · 7H₂O 200 mg / L, CaCl₂ · 2H₂O 72 mg / L, CuSO₄ · 5H₂O 5 μg / L, MnSO₄ · 5H₂O 25 μg / L, ZnSO₄ · 7H₂O 23 μg / L, FeCl₃ · 6H₂O 9.7 mg / L, メタノール 0.5% (W / V)) に植菌し、培養温度 37 度で一晩振とう培養した。その後、培養液を遠心し、菌体を回収後、市販のキット (Edge Biosystems 社製 Genomic DNA purification kit) を用いて、添付の操作マニュアルに従い染色体 DNA を調製した。 20

【0060】

この染色体 DNA を鋳型にして、配列番号 1 及び 2 に記載の DNA プライマーを用いて、PCR (反応条件: 宝酒造社製 Pyrobest polymerase を用い、変性工程 98 - 10 秒間、アニーリング 55 - 30 秒間、DNA 鎖の伸長反応 72 - 3 分間の反応を 25 サイクル) を行い、約 3.0 キロベースペア (以下、「kbp」と記載) の大きさの DNA 断片を得た。

【0061】

そして、この取得した断片の DNA 塩基配列を、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001) に記載の方法に従って決定した。その DNA 断片上の制限酵素 EcoRV 部位から制限酵素 DdeI 部位までの領域の塩基配列は、配列番号 3 に示す塩基配列であることが明らかになった。この DNA 配列中には、配列番号 4 に示すアミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレーム (以下、「orf」と略する場合がある) が含まれていた。また、この orf を orf # 3098 と命名した。また、前記配列番号 4 に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を 1dc 遺伝子と命名した。 30

【0062】

【実施例 2】1dc 遺伝子を破壊したメチロフィラス・メチロトロファス株の作製 (1) 1dc 遺伝子破壊用断片の作製

実施例 1 で調製した染色体 DNA を鋳型にして、配列番号 5 及び 6 に記載の DNA プライマーを用いて、PCR (反応条件: 宝酒造社製 Takara Ex Taq を用い、変性工程 94 - 30 秒間、アニーリング 60 - 30 秒間、DNA 鎖の伸長反応 72 - 2 分間の反応を 25 サイクル) を行い、約 1.3 kb の大きさの DNA 断片を得た。また同様の条件で、配列番号 7 及び 8 に記載のプライマーを用いた PCR を行い、約 2.0 kb の大きさの DNA 断片を得た。 40

【0063】

一方、プラスミド pKD4 (GenBank accession No. AY048743, Datsenko, K. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97 (12), 6640 - 6645, 2 50

000)を鋳型にして、配列番号9及び10に記載のプライマーを用いて、上記と同じ条件でPCRを行い、カナマイシン耐性(Km^R)遺伝子を含むDNA断片(約1.5kb)を調製した。

【0064】

以上の3種のDNA断片を混ぜ合わせ、これを鋳型にして、配列番号11及び12に記載したプライマーを用いてPCR(反応条件:Takara Ex Taqを用い、変性工程94-30秒間、アニーリング60-30秒間、DNA鎖の伸長反応72-4分30秒間の反応を25サイクル)を行い、約4.7kbの断片を取得した。この断片は、カナマイシン耐性遺伝子で分断された1dc遺伝子を含んでいる。この断片を市販のキット(Promega社製Wizard PCR Preps DNA Purification System)を用いて精製後、エタノール沈殿操作を行い、TE溶液(10mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTA溶液)に溶解した。このDNA溶液を遺伝子破壊用断片として以下の操作に用いた。

【0065】

(2)メチロフィラス・メチロトロファスの1dc遺伝子欠損株の取得

次に、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株へ、上述した遺伝子破壊用断片を導入した。形質転換は、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997))を用いた。具体的には、以下のようにして行った。

【0066】

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株をSEII液体培地(但しメタノール濃度は0.5%(v/v))で、37で16時間振とう培養し、その培養液20mlを10,000rpm×10分間の遠心にかけ、菌体を集菌した。これに1mM HEPES(pH7.2)緩衝液(20ml)を加えて懸濁した後、遠心するという操作を2回行い、最後に菌体に1mlの同溶液を加え、菌体懸濁液を調製し、エレクトロポレーション用のエレクトロセルとした。そして、上記のカナマイシン耐性遺伝子で分断された1dc遺伝子(1dc: : Km^R)を含むDNA断片の約1μg分を、エレクトロセル100μlに加え、18.5kV/cm, 25μF, 200の条件で電気パルスを与え、エレクトロポレーション処理を行い、DNA断片を細胞内へ導入した。この菌懸濁液に直ちにSEII液体培地を加え、37で3時間培養した。

【0067】

前記培養液を、カナマイシン20μg/mlを含むSEII寒天培地に塗布後、37で培養した。培養を48時間行ったところ、プレート上に数十個のコロニーが出現した。そのうち20株を無作為に選択し、それらの株では目的どおりの遺伝子が破壊されているか否かを、PCR法による検出方法により確認した。即ち、出現したコロニーを滅菌水20μlに懸濁し、1mg/mlの濃度のProteinase K溶液を5μl、更に25μLのP溶液(40mM Tris、0.5% Tween20、1% Nonidet P-40、1mM EDTA(HClにてpH8.0に調整)からなる溶液)を添加した後、攪拌し、60で20分、次いで95で5分間、保温した。そして、この反応液を鋳型とし、配列番号11及び12に示すプライマーを用いたPCR(反応条件:Takara Ex Taqを用い、変性過程94-30秒間、アニーリング過程60-30秒間、DNA鎖の伸長反応72-4分30秒間の反応を25サイクル)を行うことによって、目的遺伝子の破壊を確認したところ、10株が目的通りの破壊株であった。そこで、このうちの一株をDLC10株(MLDC株)と命名し、以後の実験に使用した。

【0068】

(3)1dc遺伝子欠損株の表現型

上記(2)で作製したDLC10株は、カナマイシンを含むSEII寒天培地で生育する株として選択された株であるが、同様の寒天培地で植え継ぐと、生育しなくなることが判明した。そこで、リジンデカルボキシラーゼ(LDC)及びアルギニンデカルボキシラーゼ(ADC)の、それぞれの反応生成物である、カダベリン(CAD)及びアグマチン(

10

20

30

40

50

AGM)を、培地へ添加することで、それらの生育阻害を相補出来るかどうか検討した。

【0069】

カナマイシン20μg/ml(μg/ml)を含む液体SEII培地4mlに、カダベリン又はアグマチンを1g/lの濃度で添加した培地を作製した。そして、そこへ上記DLC10株を植菌し、37、116rpmで振とう培養し、その生育を調べた。その結果、DLC10株は、カダベリンあるいはアグマチンの無添加培地では生育出来ないが、どちらか一方の物質の培地への添加によって生育可能となることが判明した。また、カダベリン添加の方が、アグマチン添加時と比べ、より良い生育回復効果が認められた。

【0070】

(4) orf#3098導入によるldc欠損株の相補性確認

10

上記のldc欠損株の生育のためのカダベリン要求性が、実施例1で取得したorf#3098の導入で相補できるのかどうかを検証した。まず、orf#3098のみを含むDNAを、ldc欠損株へ導入するためのプラスミドを作製した。実施例1に記載した染色体DNAを鋳型にし、配列番号13及び14に記載した配列をもつDNAプライマー(5'末端側にSse8387Iサイトを連結)を用いてPCRを行った(増幅反応条件は、宝酒造社製Pyrobest DNA polymeraseを用い、変性工程98-10秒間、アニーリング55-30秒間、DNA鎖の伸長反応72-3分間の反応を25サイクル)。得られた約3kbの大きさのDNA断片を、制限酵素Sse8387I(宝酒造)で消化した。一方、同じくSse8387Iで分解後、脱リン酸化処理を行ったベクタ-pRS tacと、このDNA断片を連結した(宝酒造社製、Ligation Kit ver.2を使用)。このようにして作製したorf#3098の搭載プラスミド(tacプロモーターに対して順向き)をpRS-orf#3098と命名した。

20

【0071】

なお、pRS tacは公知のプラスミドpRS(特表平3-501682号公報参照)を用いて、そこへtacプロモーターを導入することにより構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32(Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)に由来するpVIC40プラスミド(WO90/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報)より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

30

【0072】

まず、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRS tacを構築した。pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8キロベースペアのDNA断片をEASY TRAP Ver.2(DNA回収キット、宝酒造社製)を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pRK223-3プラスミド(発現用ベクター、Pharmacia社製)を鋳型とし、配列番号17および18に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した(変性94-20秒、アニーリング55-30秒、伸長反応72-60秒のサイクルを30サイクル行った)。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCR prep(Promega社製)を用いて精製した後、あらかじプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルで分離し、約0.15kbのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

40

【0073】

上記のようにして調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、D 50

NA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法で各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRSstacを得た。pRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRSstacとして選択した。

【0074】

10

以上のようにして作製したプラスミドpRS-orf#3098、又は対照プラスミドであるpRSstacを用いて、エレクトロポレーション法でDLC10株をそれぞれ形質転換し、SEII寒天培地(但し、カナマイシン20μg/ml、ストレプトマイシン50μg/ml、カダベリン1g/lを含む)で選択した。

【0075】

選択されたDLC10/pRS-orf#3098株を、カダベリン無添加のSEII寒天培地(カナマイシン20μg/ml、ストレプトマイシン50μg/mlを含む)に接種したところ、対照株のDLC10/pRSstac株が生育出来なかったのに対し、pRSstac-orf#3098導入株では生育が可能となった。また、DLC10/pRS-orf#3098株から、Promega社製Wizard Miniprepsを用いてプラスミドを抽出し、電気泳動によって確認したところ、目的通りのプラスミドを保持していることが確認されたため、この相補性は、プラスミド上のorf#3098がコードするタンパク質がトランスに作用して、発揮されたことが判明した。このことは、このorf#3098自身の欠損が、本菌の生育にカダベリン要求性を付与したといえる。

20

【0076】

【実施例3】E. coli由来のldcc遺伝子導入による、メチロフィラス・メチロトロファスorf#3098欠損の相補

(1) E. coli由来のldcc遺伝子を搭載したプラスミドの作製

E. coliに由来するldcc遺伝子が、DLC10株の生育へのカダベリン要求性を相補出来るのかを調べるために、まずE. coli由来のldcc搭載プラスミドを作製した。E. coli W3110株をLB培地(トリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、NaCl 10g/l)で37℃で一晩培養し、得られた菌体からEden Biosystems社製 Genomic DNA Purif. Kitを用いて染色体DNAを調製した。この染色体DNAを鋳型にし、配列番号15及び16(J. Bacteriol., 1997, 179(14), 4486-4492)に記載した配列をもつDNAプライマー(5'末端側にPstIサイトを連結)を用いてPCRを行った(增幅反応条件は、宝酒造社製 Probebest DNA polymeraseを用い、変性工程98℃-10秒間、アニーリング60℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-2分間の反応を25サイクル)。得られた約2.3kbのDNA断片を、PstI(宝酒造)で分解した。一方、ベクターpRSstacを制限酵素Sse8387Iで分解後、脱リン酸化処理を行い、上記のPCR断片と連結した(宝酒造社製、Ligation Kit ver. 2を使用)。このようにして作製したE. coliのldccを搭載したプラスミドをpRS-ldcc-F(tacプロモーターに対して順向き)及びpRS-ldcc-R(tacプロモーターに対して逆向き)と命名した。

30

【0077】

(2) E. coli由来LDCによるDLC10株のorf#3098欠損の相補性確認

上記のようにして作製した両プラスミドで、エレクトロポレーション法によりDLC10株を形質転換し、SEII寒天培地(カナマイシン20μg/ml、ストレプトマイシン50μg/ml、カダベリン1g/lを含む)で形質転換体を選択したところ、pRSst

40

50

a c - 1 d c C - F では形質転換体は取得できず、 p R S t a c - 1 d c C - R による形質転換体のみが得られた。

【 0 0 7 8 】

この D L C 1 0 / p R S t a c - 1 d c C - R 株を、カダベリンを含まない寒天培地 S E I I (カナマイシン 2 0 μ g / ml とストレプトマイシン 5 0 μ g / ml を含む) に塗布したところ、対照株である D L C 1 0 / p R S - t a c 株は生育出来ないのに対し、 D L C 1 0 / p R S t a c - 1 d c C - R 株では生育可能となることを確認した。このことは、 E . c o l i の L D C (リジンデカルボキシラーゼ) が、メチロフィラス・メチロトロファスの o r f # 3 0 9 8 欠損株のカダベリン要求性を相補できたことを示すものである。

10

【 0 0 7 9 】

【実施例 4】 o r f # 3 0 9 8 (1 d c 遺伝子) を破壊したメチロフィラス・メチロトロファス株による L - リジンの生産

(1) L - リジン生産プラスミド p R S 1 y s E 2 4 の構築

まず、メチロフィラス属細菌に、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいてリジンの排出活性を発揮する蛋白質をコードする l y s E 遺伝子を導入するために、前記 p R S t a c を用いて、 l y s E 発現用プラスミド p R S 1 y s E を構築した。

実施例 2 の (4) のようにして作製した p R S t a c を、 S s e 8 3 8 7 I (宝酒造製) および S a p I (ニューイングランドバイオラボ社製) で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿により D N A を回収後、 0 . 8 % アガロースゲルで分離し、約 9 . 0 k b p の D A N 断片を回収した。

20

【 0 0 8 0 】

また、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 2 2 5 6 株 (A T C C 1 3 8 6 9) より抽出した染色体を鑄型として、配列番号 1 9 および 2 0 に示すプライマーを用いた P C R 法 (変性 9 4 - 2 0 秒、アニーリング 5 5 - 3 0 秒、伸長反応 7 2 - 9 0 秒) により l y s E 遺伝子断片を増幅した。 P C R 反応には、 P y r o b e s t D N A p o l y m e r a s e (宝酒造社製) を使用した。得られた断片を P C R p r e p (P r o m e g a 社製) を用いて精製した後、制限酵素 S s e 8 3 8 7 I および S a p I で消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿により D N A を回収し、 0 . 8 % アガロースゲルで精製し、回収した。

30

【 0 0 8 1 】

上記のようにして調製した p R S t a c ベクター消化物と、 l y s E 遺伝子領域断片を、 D N A L i g a t i o n K i t V e r . 2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E . c o l i J M 1 0 9 c o m p e t e n t c e l l s 、宝酒造製) を形質転換し、 2 0 m g / L のストレプトマイシンを含む L B 寒天培地に塗布し、 3 7 で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを 2 0 m g / L のストレプトマイシンを含む L B 液体培地に接種し、 3 7 で 8 時間振盪培養した。アルカリ - S D S 法にて各培養液からプラスミド D N A を抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、 p R S 1 y s E を得た。 p R S 1 y s E は、 t a c プロモーターの転写方向に対して、 l y s E 遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

40

【 0 0 8 2 】

上記のようにして得られた p R S 1 y s E を、エレクトロポレーション法 (C a n a d i a n J o u r n a l o f M i c r o b i o l o g y , 4 3 . 1 9 7 (1 9 9 7)) によりメチロフィラス・メチロトロファス A S 1 株 (N C I M B 1 0 5 1 5) に導入した。その結果、ほとんど形質転換体が取得できなかった。また、コロニー形成ができた数個の株から、導入したプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、 l y s E 遺伝子に変異が導入されており、それらのコロニーを培養しても、それらの培養上清中に L -

50

リジンが蓄積することもなかった。しかしながら、更に多数のコロニーを調べたところ、変異が導入された p R S 1 y s E の解析を行ううちに、メチロフィラス属細菌に L - リジン生産能を付与し得る、即ち、機能する変異型 1 y s E 遺伝子を取得することができた。

【 0 0 8 3 】

この変異型 1 y s E 遺伝子を 1 y s E 2 4 遺伝子と命名した。1 y s E 2 4 遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異はアミノ酸置換が起こる変異ではなく、1 y s E の翻訳領域内のほぼ中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかった。野生型 1 y s E 遺伝子の塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 に示す。1 y s E 2 4 では、配列番号 2 1 の 3 5 5 位の G (グアニン) のあとに T (チミン) が挿入されていた。1 y s E 2 4 の塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に示す。この 1 y s E 2 4 を持つプラスミドを p R S 1 y s E 2 4 と命名した。

【 0 0 8 4 】

(2) d a p A * 遺伝子を持つプラスミド p R S d a p A の作製
L - リジン生合成系酵素遺伝子として、L - リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子 (d a p A *) を持つプラスミドを作製した。

【 0 0 8 5 】

実施例 2 の (4) で作製した p R S t a c を S s e 8 3 8 7 I および X b a I で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にて DNA を回収後、0 . 8 % アガロースゲルで分離し、約 9 k b p の DNA 断片を回収した。

【 0 0 8 6 】

d a p A * 遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミド R S F D 8 0 (W O 9 0 / 1 6 0 4 2 号参照) を鋳型として、配列番号 2 5 および 2 6 に示すプライマーを用いた P C R 法 (变性 9 4 - 2 0 秒、アニーリング 5 5 - 3 0 秒、伸長反応 7 2 - 6 0 秒) により増幅した。P C R 反応には、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を使用した。得られた d a p A 遺伝子断片を P C R p r e p (Promega 社製) にて精製した後、制限酵素 S s e 8 3 8 7 I および X b a I で消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にて DNA を回収し、0 . 8 % アガロースゲルで分離後、約 0 . 1 k b p の DNA 断片を回収した。

【 0 0 8 7 】

上記のように調製した p R S t a c ベクター消化物と、d a p A * 遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E . c o l i J M 1 0 9 c o m p e t e n t c e l l s 、宝酒造社) を形質転換し、2 0 m g / L のストレプトマイシンを含む L B 寒天培地に塗布し、3 7 で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、2 0 m g / L のストレプトマイシンを含む L B 液体培地に接種し、3 7 で 8 時間振盪培養した。アルカリ - S D S 法にて各培養液からプラスミド DNA を抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、p R S d a p A プラスミドを得た。p R S d a p A プラスミドは、t a c プロモーターの転写方向に対して、d a p A 遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【 0 0 8 8 】

(3) 1 y s E 2 4 遺伝子及び d a p A * 遺伝子を持つプラスミド p R S 1 y s E d a p A の構築

p R S 1 y s E プラスミドに d a p A * 遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。実施例 4 の (1) で作製した p R S 1 y s E 2 4 を制限酵素 S a p I で消化し、DNA B l u n t i n g Kit (宝酒造社製) を用いて末端を平滑化した。また、実施例 4 の (2) で作製した p R S d a p A を制限酵素 E c o R I および S a p I で消化し、0 . 8 % アガ

10

20

30

40

50

ロースゲルにより約1kbpの tac プロモーターおよび dapA* 領域を含む断片を分離し、同断片を EASY TRAP Ver2 (宝酒造製) を用いて回収した。この断片を前記と同様にして平滑化し、前記の pRSlysE24 の消化物と、DNA Ligation Kit Ver2 (宝酒造製) を用いて連結した。

【0089】

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cell s、宝酒造社製) を形質転換し、20mg/L のストレプトマイシンを含む LB 寒天培地に塗布し、37℃ で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを 20mg/L のストレプトマイシンを含む LB 液体培地に接種し 37℃ で 8 時間振盪培養した。各培養液から、アルカリ-SDS 法によりプラスミド DNA を抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEdapA プラスミドを得た。このプラスミドは、lysE24 遺伝子と dapA* 遺伝子の各遺伝子の転写の向きが同一になるように配置されている。

【0090】

pRSlysEdapA プラスミドで形質転換された E. coli JM109 株は AJ13832 と命名され、同株は 2001 年 6 月 4 日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-18371 として寄託され、平成 14 年 5 月 13 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8042 の受託番号のもとで寄託されている。

【0091】

(4) メチロフィラス・メチロトロファスの orf # 3098 (ldc) 欠損株への L-リジン生産プラスミドの導入と L-リジン生産

メチロフィラス・メチロトロファスの L-リジン生産に及ぼす、 ldc 遺伝子欠損の影響を調べた。まず、実施例 2 で作製した DLC10 株は、野生株から作製していることから、L-リジンを生産する性質は改変されていない。そこで、 ldc 欠損による L-リジン生産への影響を効果的に検証するために、メチロフィラス・メチロトロファス AS1 株に pRSlysEdapA が導入された株から、実施例 2 (2) と同様の操作によって、 ldc 破壊株を作製した。ここで得られた株を DLC12 / pRSlysEdapA 株と命名した。

【0092】

対照株である AS1 / pRSlysEdapA 株を SEII (ストレプトマイシン 50 μg/ml を含む) 寒天培地に、DLC12 / pRSlysEdapA 株を SEII (ストレプトマイシン 50 μg/ml およびカダベリン 1g/l を含む) 寒天培地に塗り広げ、37℃ で 1 晚培養した後、培地表面の約 3cm² (平方センチメートル) の菌体をかきとて、カダベリン 1g/L を含む SEII 生産培地 (ストレプトマイシン 50 μg/ml を含む) 20ml に植菌し、37℃ で 67 時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれる L-リジン濃度をアミノ酸分析計 (日本分光製、高速液体クロマトグラフィー) で定量した。その結果、AS1 / pRSlysEdapA 株は培地中への L-リジン蓄積が 1.26g/L であったが、DLC12 / pRSlysEdapA 株は培地中に L-リジンを 1.79g/L 蓄積しており、 ldc を欠損させることにより、L-リジンの生産性を向上し得ることが確認できた。

【0093】

【発明の効果】

本発明により、新規なリジンデカルボキシラーゼ及び同酵素をコードする遺伝子が提供可能となる。一方、L-リジン生産能を有し、当該遺伝子の発現が抑えられているメチロフィラス属細菌を培養することにより、効率的に L-リジンを製造することができる。

【0094】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Ajinomoto Co., Inc.

〈120〉 Novel lysine decarboxylase gene and method for
producing L-lysine

10
〈130〉 P-B0650

〈140〉

〈141〉 2003-02-25

〈160〉 26

20
〈170〉 PatentIn Ver. 2.0

〈210〉 1

〈211〉 31

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

30
〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 1

gcgagcttag cgcgagtgac tggatatcgg a

31

〈210〉 2

〈211〉 31

40

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 2

gcggtaaccac tgtataaata gcaaaggcaa c

31

10

〈210〉 3

〈211〉 2964

〈212〉 DNA

〈213〉 *Methylophilus methylotrophicus*

20

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (684)..(2930)

〈400〉 3

gataatcgaa tgagcattaa gtcgtacaaa tggatacgca gaatggctga acaacacggc 60
atgattgagc cggttgagcc caagcttgcgtatcgatatac cggtgtgtgcgtacgtatcc 120
tatggcacct ctttttacgg ttacgatatac cggtgtgtgcgtacgtatcc 180
aatatcaaca gcaccatagt tgaccccaag caatttgacc cgcagtcgtt tgtcgaggc 240
tccggcaag gctattgcgt gatccccctt aactcatttg cactggcgcc cacggtagag 300
tatcccgta ttccctcgctc tgtaactgact gtatgcctcg gcaagtcgac ttatgcgcgt 360
tgcggcatta tcgtcaacgt cacccctttt gaaccagagt gggaggcta tgtcacacta 420
gagttcagca acaccacacc gctacccgcc aaaattatg ctggcgaagg ctgtgcgcaa 480
gtgctgttct ttgagtcgtatcgatatac gaaacgagct acaaagaccg tggtgtaaa 540
taccagggtc aaattggcgt gaccctgcca aaaatataac ggcaacattt aacaataacc 600

30

40

tgacattcac caagggcacg gtgcaaagca aatgcttct ctgtgccctt gtgtcttgc 660
tttagcggtt aaggatttat tgc atg aaa ttt aga ttc cct atc gtc att att 713
Met Lys Phe Arg Phe Pro Ile Val Ile Ile
1 5 10
gac gag gac ttc cgc tcc gag aac tct tcc ggc ctg ggc atc cgt gtg 761
Asp Glu Asp Phe Arg Ser Glu Asn Ser Ser Gly Leu Gly Ile Arg Val
15 20 25
10
ctg gcg aaa gcc atc gaa gat gag ggc ctg gaa gtg ctt ggc gtc acc 809
Leu Ala Lys Ala Ile Glu Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr
30 35 40
agc tat ggc gac ctg acc tct ttc gcc cag cag caa agc cgt gca tca 857
Ser Tyr Gly Asp Leu Thr Ser Phe Ala Gln Gln Ser Arg Ala Ser
45 50 55
905 20
gcc ttt atc ctg tcg att gat gat gag gaa atc gtt gag gag aaa ccg
Ala Phe Ile Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro
60 65 70
gaa gcc att gag caa ctg cgt aac ttt gtg cag gaa atc cgt tac cgc 953
Glu Ala Ile Glu Gln Leu Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg
75 80 85 90
1001 30
aac gag gaa atc ccc att ttc ctg cat ggc gaa acc cgt acc agc cgt
Asn Glu Glu Ile Pro Ile Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg
95 100 105
1049
cac atc cct aac gat gtg ttg cgc gag ttg cac ggc ttt atc cat atg
His Ile Pro Asn Asp Val Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met
110 115 120
1097
aat gaa gac acg cct gag ttt gtg gcg cgc ctg att atc cgc gaa gcc
Asn Glu Asp Thr Pro Glu Phe Val Ala Arg Leu Ile Ile Arg Glu Ala
125 130 135
40
aaa gcc tac ctg gac agc ttg cca ccg ccc ttc ttc aag gca ctc act 1145

Lys Ala Tyr Leu Asp Ser Leu Pro Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr

140 145 150

cat tac gcg gct gat ggc tct tat tca tgg cac tgt cct ggt cac tcg 1193

His Tyr Ala Ala Asp Gly Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser

155 160 165 170

ggt ggc gta gcc ttt ctg aaa tcc cca gtc ggg cag atg ttc cac cag 1241

Gly Gly Val Ala Phe Leu Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln

175 180 185

ttt ttt ggc gag aac atg ctg cgt gca gac gtg tgt aat gcg gta gat 1289

Phe Phe Gly Glu Asn Met Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp

190 195 200

gaa tta ggc caa tta ctg gat cac acc ggc ccg gtg gcc gct tct gag 1337

Glu Leu Gly Gln Leu Leu Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu

205 210 215

10

cgc aac gct gcg cgc atc tac aac tgc gac cat ttg tac ttt gtc act 1385

Arg Asn Ala Ala Arg Ile Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr

220 225 230

aac ggc acc tca aca tcg aac aag att gtc tgg aac tca acc gtg gcg 1433

Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala

235 240 245 250

ccg ggt gat att gta gtg gtt gat cgt aac tgc cat aaa tcc gta ttg 1481

Pro Gly Asp Ile Val Val Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu

255 260 265

20

cac tcc atc att atg acg ggt gcc gtg ccc gtg ttc ctg atg cca acg 1529

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

270 275 280

cgc aac cat ttc ggc att atc ggg cct atc cca aaa agt gaa ttc gcc 1577

Arg Asn His Phe Gly Ile Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala

285 290 295

30

40

tgg gaa aac atc cag aaa aag atc gca cgc aac ccg ttt gcc acc gac	1625		
Trp Glu Asn Ile Gln Lys Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp			
300	305	310	
aaa aat gcc aag cca cgc gtg ctg acc att aca cag tcc acc tat gat	1673		
Lys Asn Ala Lys Pro Arg Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp			
315	320	325	330
ggc gtg ttg tat aac gtg gaa gaa atc aag gaa atg ctg gat ggc aaa	1721		
Gly Val Leu Tyr Asn Val Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys			
335	340	345	
att gac acc ctg cac ttt gac gaa gcc tgg ttg cca cat gcg acc ttc	1769		
Ile Asp Thr Leu His Phe Asp Glu Ala Trp Leu Pro His Ala Thr Phe			
350	355	360	
cat gac ttt tat ggt gac tac cat gcg att ggc gct gac cgc cca cgc	1817		
His Asp Phe Tyr Gly Asp Tyr His Ala Ile Gly Ala Asp Arg Pro Arg			
365	370	375	
tgt aaa gaa tcc atg gtg ttc tcc acc cag tcc acg cac aaa cta ttg	1865		
Cys Lys Glu Ser Met Val Phe Ser Thr Gln Ser Thr His Lys Leu Leu			
380	385	390	
gca ggc cta agc cag gcc tcg cag att ctg gta cag gat gcc gac cag	1913		
Ala Gly Leu Ser Gln Ala Ser Gln Ile Leu Val Gln Asp Ala Asp Gln			
395	400	405	410
aac cgc ctg gac cgt gac gtg ttc aac gaa gcc tat ttg atg cac acc	1961		
Asn Arg Leu Asp Arg Asp Val Phe Asn Glu Ala Tyr Leu Met His Thr			
415	420	425	
tcc acc agc ccg caa tat tca att att gcc agc tgc gac gtc gct gct	2009		
Ser Thr Ser Pro Gln Tyr Ser Ile Ile Ala Ser Cys Asp Val Ala Ala			
430	435	440	
gcc atg atg gaa gcc cct ggt ggc acc gcc ctg gta gaa gaa tcc ctc	2057		
Ala Met Met Glu Ala Pro Gly Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Ser Leu			

445	450	455	
aaa gaa gcg ttg gac ttc cgc cgc gcc atg cgc aag gtc gac gaa gaa			2105
Lys Glu Ala Leu Asp Phe Arg Arg Ala Met Arg Lys Val Asp Glu Glu			
460	465	470	
tgg ggc aca gac tgg tgg ttt aaa gtc tgg ggt cca act gac ctg tcc			2153
Trp Gly Thr Asp Trp Trp Phe Lys Val Trp Gly Pro Thr Asp Leu Ser			
475	480	485	490
gaa gac ggc ctg gaa gaa cgt gac gcg tgg atg ctc aaa gcc aat gaa			2201
Glu Asp Gly Leu Glu Glu Arg Asp Ala Trp Met Leu Lys Ala Asn Glu			
495	500	505	
cgc tgg cat ggc ttc ggc aac ctg gcc gaa ggc ttt aac atg ctg gat			2249
Arg Trp His Gly Phe Gly Asn Leu Ala Glu Gly Phe Asn Met Leu Asp			
510	515	520	
ccg atc aaa gcc acc atc atc acc cca gga cta gac gta gaa ggc gac			2297
Pro Ile Lys Ala Thr Ile Ile Thr Pro Gly Leu Asp Val Glu Gly Asp			
525	530	535	
ttt tcc gat gaa ttc ggc atc ccc gct gcc att gtc acc aag tac ctg			2345
Phe Ser Asp Glu Phe Gly Ile Pro Ala Ala Ile Val Thr Lys Tyr Leu			
540	545	550	
gct gaa cac ggt gtg atc gtt gaa aaa acc ggt tta tac tca ttc ttt			2393
Ala Glu His Gly Val Ile Val Glu Lys Thr Gly Leu Tyr Ser Phe Phe			
555	560	565	570
atc atg ttc acc atc ggc att acc aaa ggc cgc tgg aac acg atg gtg			2441
Ile Met Phe Thr Ile Gly Ile Thr Lys Gly Arg Trp Asn Thr Met Val			
575	580	585	
gcc gcg tta caa caa ttt aaa gac gac tac gac aag aat cag ccg ctg			2489
Ala Ala Leu Gln Gln Phe Lys Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Gln Pro Leu			
590	595	600	
tgg aaa gtg ctg cct gag ttt gta cag aaa cat cca cgc tat gaa cgc			2537

10

20

30

40

Trp Lys Val Leu Pro Glu Phe Val Gln Lys His Pro Arg Tyr Glu Arg

605 610 615

gta ggc ctg aaa gat cta tgc acg cag att cat gaa gtt tac aaa gct 2585

Val Gly Leu Lys Asp Leu Cys Thr Gln Ile His Glu Val Tyr Lys Ala

620 625 630

aac gac gta gca cgc ctg acc aca gaa atg tac ctg tct gac atg gtg 2633

Asn Asp Val Ala Arg Leu Thr Thr Glu Met Tyr Leu Ser Asp Met Val

635 640 645 650

cca gcc atg aaa ccg acc gat gct ttc tca aaa atg gcg cat cgc aaa 2681

Pro Ala Met Lys Pro Thr Asp Ala Phe Ser Lys Met Ala His Arg Lys

655 660 665

att gaa cgc gta gcc att gat gac ctc gaa ggc cgc gtc act gca gtg 2729

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

670 675 680

ctg tta acg ccc tat ccg cca ggc atc ccg ttg ctg atc cct ggc gaa 2777

Leu Leu Thr Pro Tyr Pro Pro Gly Ile Pro Leu Leu Ile Pro Gly Glu

685 690 695

cgc ttt aac aaa gtc att gtg aac tac ctc aag ttt gcg cgc gag ttt 2825

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

700 705 710

aat gag aaa ttc cca ggc ttt gag acg gat aac cat gga tta gtg aag 2873

Asn Glu Lys Phe Pro Gly Phe Glu Thr Asp Asn His Gly Leu Val Lys

715 720 725 730

caa ata gtc gat ggt aaa gcc gtg tat tat gtg gat tgc gtg aag caa 2921

Gln Ile Val Asp Gly Lys Ala Val Tyr Tyr Val Asp Cys Val Lys Gln

735 740 745

gaa gat taa attttagtt tcactcagca gttttctac tgag 2964

Glu Asp

10

20

30

40

<210> 4

<211> 748

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 4

Met Lys Phe Arg Phe Pro Ile Val Ile Ile Asp Glu Asp Phe Arg Ser

1 5 10 15 10

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

20 25 30

Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr Ser Tyr Gly Asp Leu Thr

35 40 45

Ser Phe Ala Gln Gln Gln Ser Arg Ala Ser Ala Phe Ile Leu Ser Ile

50 55 60

Asp Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro Glu Ala Ile Glu Gln Leu

65 70 75 80

Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Asn Glu Glu Ile Pro Ile

85 90 95

Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg His Ile Pro Asn Asp Val

100 105 110

Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met Asn Glu Asp Thr Pro Glu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Pro Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr His Tyr Ala Ala Asp Gly

145 150 155 160

Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser Gly Gly Val Ala Phe Leu

165 170 175

Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln Phe Phe Gly Glu Asn Met

180 185 190

10

20

30

40

Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp Glu Leu Gly Gln Leu Leu
 195 200 205
 Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu Arg Asn Ala Ala Arg Ile
 210 215 220
 Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala Pro Gly Asp Ile Val Val 10
 245 250 255
 Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu His Ser Ile Ile Met Thr
 260 265 270
 Gly Ala Val Pro Val Phe Leu Met Pro Thr Arg Asn His Phe Gly Ile
 275 280 285
 Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala Trp Glu Asn Ile Gln Lys
 290 295 300 20
 Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp Lys Asn Ala Lys Pro Arg
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp Gly Val Leu Tyr Asn Val
 325 330 335
 Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys Ile Asp Thr Leu His Phe
 340 345 350
 Asp Glu Ala Trp Leu Pro His Ala Thr Phe His Asp Phe Tyr Gly Asp 30
 355 360 365
 Tyr His Ala Ile Gly Ala Asp Arg Pro Arg Cys Lys Glu Ser Met Val
 370 375 380
 Phe Ser Thr Gln Ser Thr His Lys Leu Leu Ala Gly Leu Ser Gln Ala
 385 390 395 400
 Ser Gln Ile Leu Val Gln Asp Ala Asp Gln Asn Arg Leu Asp Arg Asp
 405 410 415 40
 Val Phe Asn Glu Ala Tyr Leu Met His Thr Ser Thr Ser Pro Gln Tyr

420	425	430	
Ser Ile Ile Ala Ser Cys Asp Val Ala Ala Ala Met Met Glu Ala Pro			
435	440	445	
Gly Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Ser Leu Lys Glu Ala Leu Asp Phe			
450	455	460	
Arg Arg Ala Met Arg Lys Val Asp Glu Glu Trp Gly Thr Asp Trp Trp			
465	470	475	10
Phe Lys Val Trp Gly Pro Thr Asp Leu Ser Glu Asp Gly Leu Glu Glu			
485	490	495	
Arg Asp Ala Trp Met Leu Lys Ala Asn Glu Arg Trp His Gly Phe Gly			
500	505	510	
Asn Leu Ala Glu Gly Phe Asn Met Leu Asp Pro Ile Lys Ala Thr Ile			
515	520	525	
Ile Thr Pro Gly Leu Asp Val Glu Gly Asp Phe Ser Asp Glu Phe Gly			
530	535	540	
Ile Pro Ala Ala Ile Val Thr Lys Tyr Leu Ala Glu His Gly Val Ile			
545	550	555	20
Val Glu Lys Thr Gly Leu Tyr Ser Phe Phe Ile Met Phe Thr Ile Gly			
565	570	575	
Ile Thr Lys Gly Arg Trp Asn Thr Met Val Ala Ala Leu Gln Gln Phe			
580	585	590	30
Lys Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Gln Pro Leu Trp Lys Val Leu Pro Glu			
595	600	605	
Phe Val Gln Lys His Pro Arg Tyr Glu Arg Val Gly Leu Lys Asp Leu			
610	615	620	
Cys Thr Gln Ile His Glu Val Tyr Lys Ala Asn Asp Val Ala Arg Leu			
625	630	635	40
Thr Thr Glu Met Tyr Leu Ser Asp Met Val Pro Ala Met Lys Pro Thr			
645	650	655	

Asp Ala Phe Ser Lys Met Ala His Arg Lys Ile Glu Arg Val Ala Ile
660 665 670
Asp Asp Leu Glu Gly Arg Val Thr Ala Val Leu Leu Thr Pro Tyr Pro
675 680 685
Pro Gly Ile Pro Leu Leu Ile Pro Gly Glu Arg Phe Asn Lys Val Ile
690 695 700
Val Asn Tyr Leu Lys Phe Ala Arg Glu Phe Asn Glu Lys Phe Pro Gly 10
705 710 715 720
Phe Glu Thr Asp Asn His Gly Leu Val Lys Gln Ile Val Asp Gly Lys
725 730 735
Ala Val Tyr Tyr Val Asp Cys Val Lys Gln Glu Asp
740 745

⟨210⟩ 5

20

⟨211⟩ 30

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: primer

30

⟨400⟩ 5

aaggctgtgc gcaagtgtcg ttctttgagt

30

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 64

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 6

ccagcctaca caatcgctca agacgtgtaa tgcacgcattt gtagtcacca taaaagtcat 60
ggaa 64

10

〈210〉 7

〈211〉 64

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

20

〈400〉 7

ggcttaattcc catgtcagcc gtttaagtgtt ccatgaacta cctcaagttt ggcgcgcgagt 60
ttaa 64

〈210〉 8

〈211〉 30

30

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 8

40

ggttggatc agttagaca cggttgcaag

30

〈210〉 9
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 9
gcattacacg tcttgaggcga ttgtgttaggc 30

〈210〉 10
〈211〉 32
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 10
ggaacactta acggctgaca tggaaattag cc 32

〈210〉 11
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 11

aacctgacat tcaccaaggg cacggtgcaa 30

〈210〉 12

〈211〉 30

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 12

tttgcgcaaa agcatcgatt atccttcccc 20 30

〈210〉 13

〈211〉 33

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

30

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 13

gccctgcagg agcgcgagtg actggatatc gga 33

〈210〉 14

〈211〉 32

40

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 14

gccctgcagg ctgtataaat agcaaaggca ac

32

〈210〉 15

〈211〉 35

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

10

20

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 15

gcctgcagta aggaaggatt ttccaggagg aacac

35

30

〈210〉 16

〈211〉 38

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

40

〈400〉 16

gcctgcagaa gctttgctca ccgcataatc cgtcgcaa 38

⟨210⟩ 17

⟨211⟩ 39

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

10

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: primer

⟨400⟩ 17

agggaattcc ccgttctgga taatgtttt tgcgccgac 39

⟨210⟩ 18

20

⟨211⟩ 58

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: primer

30

⟨400⟩ 18

cggatgcac tagatgttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacac 58

⟨210⟩ 19

⟨211⟩ 64

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

40

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 19

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggtgatca tgaaaatctt cattacaggt 60
ctgc 64

10

〈210〉 20

〈211〉 50

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

20

〈400〉 20

gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc 50

〈210〉 21

〈211〉 711

〈212〉 DNA

30

〈213〉 **Brevibacterium lactofermentum**

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (1)..(711)

〈400〉 21

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48

40

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga 96
 Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
 20 25 30
 att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct 144
 Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
 35 40 45
 gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc 192
 Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50 55 60
 aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct 240
 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac 288
 Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
 85 90 95
 aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc 336
 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
 100 105 110
 gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac 384
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
 115 120 125
 cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag 432
 Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
 130 135 140
 ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat 480
 Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
 145 150 155 160

10

20

30

40

ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac	528		
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp			
165	170	175	
acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc	576		
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile			
180	185	190	
tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg	624	10	
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu			
195	200	205	
tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg	672		
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val			
210	215	220	
atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag	711		
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly			
225	230	235	
⟨210⟩ 22			
⟨211⟩ 236			
⟨212⟩ PRT			
⟨213⟩ <i>Brevibacterium lactofermentum</i>			
30			
⟨400⟩ 22			
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly			
20	25	30	
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser			
35	40	45	40
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser			

50	55	60	
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala			
65	70	75	80
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn			
85	90	95	
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro			
100	105	110	10
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn			
115	120	125	
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys			
130	135	140	
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr			
145	150	155	160
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp			
165	170	175	20
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile			
180	185	190	
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu			
195	200	205	
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val			
210	215	220	30
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly			
225	230	235	
<210> 23			
<211> 712			
<212> DNA			
<213> <i>Brevibacterium lactofermentum</i>			

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 23

atg	gtg	atc	atg	gaa	atc	ttc	att	aca	ggt	ctg	ctt	ttg	ggg	gcc	agt	48		
Met	Val	Ile	Met	Glu	Ile	Phe	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser		10	
1		5					10								15			
ctt	ttg	ctg	tcc	atc	gga	ccg	cag	aat	gta	ctg	gtg	att	aaa	caa	gga	96		
Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Gly	Pro	Gln	Asn	Val	Leu	Val	Ile	Lys	Gln	Gly			
				20				25					30					
att	aag	cgc	gaa	gga	ctc	att	gcg	gtt	ctt	ctc	gtg	tgt	tta	att	tct	144		
Ile	Lys	Arg	Glu	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser			
	35				40							45					20	
gac	gtc	ttt	ttg	ttc	atc	gcc	ggc	acc	ttg	ggc	gtt	gat	ctt	ttg	tcc	192		
Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Ser			
	50				55				60									
aat	gcc	gcg	ccg	atc	gtg	ctc	gat	att	atg	cgc	tgg	ggt	ggc	atc	gct	240		
Asn	Ala	Ala	Pro	Ile	Val	Leu	Asp	Ile	Met	Arg	Trp	Gly	Gly	Ile	Ala			
	65			70				75				80						
ta	c	tg	t	ta	tgg	ttt	gcc	gtc	atg	gca	g	g	aa	g	ac	aa	288	
Tyr	Leu	Leu	Trp	Phe	Ala	Val	Met	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Met	Thr	Asn		30	
	85				90							95						
aag	gtg	gaa	g	cg	cc	c	ag	at	g	aa	ac	aa	cc	ac	gt	cc	336	
Lys	Val	Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu	Pro	Thr	Val	Pro			
	100				105							110						
gat	gac	acg	cct	ttg	ggc	gt	tg	ttc	ggc	ggt	ggc	cac	tga	cac	gcg	caac	385	
Asp	Asp	Thr	Pro	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	His							40
	115				120							125						

cgggtgccggg tggaggtgag cgtcgataag cagcgggttt gggtaagacc catgttgatg 445
 gcaatcggtc tgaccgtgtt gaacccgaat gcgtatttgg acgcgtttgt gtttatcggtc 505
 ggcgtcggcg cgcaatacgg cgacaccgga cggtggttgc tcggcgctgg cgcgttcggtc 565
 gcaagccctga tctggttccc gctgggtgggt ttccggcgag cagcattgtc acgcccgtc 625
 tccagccccca aggtgtggcg ctggatcaac gtcgtcgtgg cagttgtgat gaccgcattg 685
 gccatcaaac tgatgtttag gggtag 712

10

<210> 24

<211> 124

<212> PRT

<213> **Brevibacterium lactofermentum**

<400> 24

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

20

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly

20 25 30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser

35 40 45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser

30

50 55 60

Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn

85 90 95

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro

100 105 110

Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly His

40

115 120

〈210〉 25

〈211〉 35

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

10

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 25

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt

35

〈210〉 26

〈211〉 36

20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: primer

〈400〉 26

30

cattctagat ccctaaacctt tacagcaaac cggcat

36

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
C 1 2 R 1:01)

F I
C 1 2 R 1:01

テーマコード(参考)

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA05 BA72 CA03 DA05
4B050 CC04 DD02 LL05
4B064 AE25 CA02 CD06 DA01 DA10
4B065 AA01 AB01 BA01 BB06 CA17