

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4365099号  
(P4365099)

(45) 発行日 平成21年11月18日(2009.11.18)

(24) 登録日 平成21年8月28日(2009.8.28)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 19 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-583629 (P2002-583629)	(73) 特許権者	500586299
(86) (22) 出願日	平成14年4月18日 (2002.4.18)		ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2004-531257 (P2004-531257A)		デンマーク国, デーコー-2880 バグ
(43) 公表日	平成16年10月14日 (2004.10.14)		スバエルト, クロシェイバイ 36
(86) 国際出願番号	PCT/DK2002/000251	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02002/086114		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成14年10月31日 (2002.10.31)	(74) 代理人	100077517
審査請求日	平成17年2月4日 (2005.2.4)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	PA 2001 00631	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成13年4月20日 (2001.4.20)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
微生物の受託番号	DSM DSM 14139	(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボキシゲナーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) DSM 14139として寄託された大腸菌 (*Escherichia coli*) の中に存在するプラスミドpUC19の中にクローニングされたDNA配列によりコードされるポリペプチド;

b) 配列番号 2 の位置 1 から位置600に示すアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチド、あるいは配列番号 2 の位置 1 から位置600に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列相同性の範囲内で、1または2以上のアミノ酸の置換、欠失、および/または挿入によりそれから得ることができるポリペプチド;

c) i) 配列番号 2 の位置 1 から位置600に示すアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドと少なくとも90%の相同性を有し、

ii) 精製された形態の配列番号 2 の位置 1 から位置600に示すアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドに対して発生した抗体と免疫学的に反応性であり、そして

iii) 配列番号 2 の位置 1 から位置600に示すアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドの対立遺伝子変異型である、

上記 (a) または (b) において規定したポリペプチドのアナログ; あるいは

d) i) DSM 14139として寄託された大腸菌 (*Escherichia coli*) の中に存在するプラスミドpUC19の中にクローニングされたDNA配列、または

ii) 成熟ポリペプチドをコードする配列番号 1 のDNA配列、

の相補的鎖と高ストリンジェンシイ条件下にハイブリダイズするDNAによりコードされるポリペプチド;

であるリポキシゲナーゼ。

【請求項 2】

糸状真菌に由来する請求項1に記載のリポキシゲナーゼ。

【請求項 3】

前記糸状真菌が子囊菌門 (Ascomycota) である、請求項 2 に記載のリポキシゲナーゼ。

【請求項 4】

前記子囊菌門 (Ascomycota) がマグナポリテ (Magnaporthe) である、請求項 3 に記載のリポキシゲナーゼ。

【請求項 5】

前記マグナポリテ (Magnaporthe) がマグナポリテ・サルビニイ (M. salvinii) である、請求項 4 に記載のリポキシゲナーゼ。

10

【請求項 6】

前記マグナポリテ・サルビニイ (M. salvinii) が IFO 6642 株である、請求項 5 に記載のリポキシゲナーゼ。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のリポキシゲナーゼをコードする核酸配列を含んでなる DNA。

【請求項 8】

a) 大腸菌 (Escherichia coli) DSM 14139 の中に存在するプラスミドの中にクローニングされた成熟リポキシゲナーゼをコードする DNA 配列；

20

b) 配列番号 2 の位置 1 から位置 600 に示すアミノ酸配列に示す成熟リポキシゲナーゼをコードする DNA 配列；

c) リポキシゲナーゼをコードし、かつ

i) 配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 90% の相同性を有するか、または

ii) 配列番号 1 の DNA 配列の相補的鎖と高いストリンジェンシーにおいてハイブリダイズし、そして

iii) その対立遺伝子変異型である、

上記 a) または b) において規定した配列のアナログ；あるいは

d) 上記 a)、b) または c) の相補的鎖；

を含んでなるポリヌクレオチド。

30

【請求項 9】

適当な発現宿主におけるリポキシゲナーゼの発現を指令することができる 1 または 2 以上の調節配列に作用可能に連鎖された請求項 7 に記載の DNA または請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる核酸構築物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸構築物、プロモーター、および転写および翻訳停止シグナルを含んでなる組換え発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の核酸構築物または請求項 10 に記載のベクターを含んでなる組換え宿主細胞。

40

【請求項 12】

リポキシゲナーゼの産生を促す条件下に請求項 11 に記載の宿主細胞を培養し、そしてリポキシゲナーゼを回収する、ことを含んでなるリポキシゲナーゼを製造する方法。

【請求項 13】

工程：

a) 真核生物 DNA ライブラリーを準備し、

b) このライブラリーをスクリーニングして、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列のコード領域中の少なくとも 20 のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドプローブに対してハイブリダイズする DNA 分子を選択し、

c) 選択した DNA 分子で宿主細胞を形質転換し、

50

d) 形質転換した宿主細胞を培養して、DNA分子によりコードされるポリペプチドを発現させ、そして

e) 発現されたポリペプチドをアッセイして、リポキシゲナーゼ活性を有するポリペプチドを選択する、

を含んでなる、請求項1～6のいずれか1項に記載のリポキシゲナーゼを得る方法。

【請求項14】

練り粉に請求項1～6のいずれか1項に記載のリポキシゲナーゼを添加することを含んでなる、練り粉または練り粉から作られた焼き製品を製造する方法。

【請求項15】

請求項1～6のいずれか1項に記載のリポキシゲナーゼを含んでなる練り粉組成物。 10

【請求項16】

界面活性剤と、請求項1～6のいずれか1項に記載のリポキシゲナーゼを含んでなる洗剤組成物。

【請求項17】

前記界面活性剤がアニオン性である、請求項16に記載の洗剤組成物。

【請求項18】

空気の存在下に請求項1～6のいずれか1項に記載のリポキシゲナーゼをポリ不飽和脂肪酸と接触させることを含んでなる、前記脂肪酸を酸化する方法。

【請求項19】

生のフレーバーまたは植物ホルモンを合成するための請求項18に記載の方法の使用。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リポキシゲナーゼおよびそれをコードするポリヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

リポキシゲナーゼ (EC 1.13.11.12) は、ポリ不飽和脂肪酸、例えば、リノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸の酸素化を触媒する酵素である。ポリ不飽和脂肪酸はシス、シス-1,4-ペンタジエン単位を含有し、そしてこれらの脂肪酸のヒドロペルオキシドを生成する。この酵素は植物および動物において広く分布している。多数のリポキシゲナーゼ遺伝子は種々の植物および哺乳動物源から単離されてきている。 30

他方において、制限された数の微生物性リポキシゲナーゼが知られており、そして微生物由来のリポキシゲナーゼ遺伝子は記載されてきていない。SuおよびOliw、J. Biological Chemistry 273 (21)、13072-79 (1998) は、ゲウマンオマイセス・グラミニス (*Gaeumannomyces graminis*) からのリポキシゲナーゼを記載している。

【発明の開示】

【0003】

本発明者らは、工業的規模の酵素の製造に使用できる、新規な真菌のリポキシゲナーゼを発見し、その配列を決定した。その遺伝子を大腸菌 (*E. coli*) の中にクローニングし、そのクローンを寄託した。 40

【0004】

したがって、本発明は、

a) DSM 14139として寄託された大腸菌 (*Escherichia coli*) の中に存在するプラスミドpUC19の中にクローニングされたDNA配列によりコードされるポリペプチド；

b) 成熟ペプチドとして配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは1または2以上のアミノ酸の置換、欠失、および/または挿入によりそれから得ることができるポリペプチド；

c) i) 前記ポリペプチドと少なくとも50%の相同性を有し、

ii) 精製された形態の前記ポリペプチドに対して発生した抗体と免疫学的に反応性であり、 50

iii) 前記ポリペプチドの対立遺伝子変異型である、  
 上記 (a) または (b) において規定したポリペプチドのアナログ；あるいは  
 d) i) DSM 14139として寄託された大腸菌 (*Escherichia coli*) の中に存在するプラスミドpUC19の中にクローニングされたDNA配列、または  
 ii) 成熟ポリペプチドをコードする配列番号1のDNA配列または少なくとも100ヌクレオチドを有するその下位配列、  
 の相補的鎖と低ストリンジェンシイ条件下にハイブリダイズするDNAによりコードされるポリペプチド；  
 であるリポキシゲナーゼを提供する。

【0005】

10

本発明は、また、

a) 大腸菌 (*Escherichia coli*) DSM 14139の中に存在するプラスミドの中にクローニングされた成熟リポキシゲナーゼをコードする部分的DNA配列、  
 b) 配列番号1に示す成熟リポキシゲナーゼをコードする部分的DNA配列、  
 c) リポキシゲナーゼをコードし、かつ  
 i) 前記DNA配列と少なくとも60%の相同性を有するか、または  
 ii) 前記DNA配列の相補的鎖または少なくとも100ヌクレオチドを有するそのサブ配列と高いストリンジェンシイにおいてハイブリダイズし、  
 iii) その対立遺伝子変異型である、

上記a) またはb) において規定した配列のアナログ；あるいは

20

d) 上記a)、b) またはc) の相補的鎖、  
 を含んでなるポリヌクレオチドを提供する。

【0006】

本発明の他の面は、ポリペプチドを含んでなる核酸構築物および組換え発現ベクター、前記構築物またはベクターを含んでなる組換え宿主細胞、および前記細胞を培養することによってリポキシゲナーゼを製造する方法を提供する。さらに、本発明は、真核生物ライブラリーをスクリーニングして、リポキシゲナーゼおよびスクリーニングに有用なオリゴヌクレオチドプローブを得る方法を提供する。最後に、本発明は、パン焼きおよび洗浄剤におけるリポキシゲナーゼの使用を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0007】

#### ゲノムDNA源

本発明のリポキシゲナーゼ遺伝子は、糸状真菌、例えば、子囊菌門 (*Ascomycota*)、マグナポルタセエ (*Magnaporthaceae*)、例えば、マグナポリテ (*Magnaporthe*) の株、特にマグナポリテ・サルビニイ (*Magnaporthe salvinii*) Cattaneo (*Mycologia* 64 (1), 110 (1972)) に由来することができる。また、この種は同義語クルブラリア・シグモイデア (*Curvularia sigmoidea*)、ヘルミントスポリウム・シグモイデウム (*Helminthosporium sigmoideum*)、レプトスフェリア・サルビニイ (*Leptosphaeria salvinii*)、ナカテア・シグモイデア (*Nakataea sigmoidea*)、スクレロチウム・オリゼ (*Sclerotium oryzae*)、およびバクラベエジャ・シグモイデア (*Vakrabeeja sigmoidea*) で知られている。1例はマグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) IFO 6642株である。

40

【0008】

あるいは、遺伝子はピリクラリア (*Pyricularia*)、例えば、ピリクラリア・オリゼ (*P. oryzae*) またはピリクラリア・グリセス (*P. grises*)、例えば、ピリクラリア・オリゼ (*P. oryzae*) IFO 30517から単離することができる。IFO株は発酵研究所、大阪 (IFO)、〒532-8686 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17-85、から商業的に入手可能である。

リポキシゲナーゼ遺伝子は、この明細書においてDNA配列に基づいて表示されるプローブを使用して、これらの生物から単離することができる。

【0009】

50

マグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) IFO 6642からのリポキシゲナーゼ遺伝子を含む大腸菌 (*Escherichia coli*) の株は、ブタベスト条約の規定に従い本発明者らによりDSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D - 38124 Braunschweig DE, Germany) に寄託された。寄託日は2001年2月28日であり、そして受け入れ番号はDSM 14139であった。

#### 【0010】

##### 形質転換体の培養によるリポキシゲナーゼの製造

本発明のリポキシゲナーゼは、リポキシゲナーゼをコードするDNA配列で適当な宿主細胞を形質転換し、酵素の産生を可能とする条件下に形質転換された生物を培養し、培養物から酵素を回収することによって製造することができる。

10

#### 【0011】

宿主生物は真核細胞、特に真菌細胞、例えば、酵母菌細胞または糸状真菌細胞、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)、フザリウム (*Fusarium*)、トリコデルマ (*Trichoderma*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*)、特にアスペルギルス・ニガー (*A. niger*)、アスペルギルス・オリゼ (*A. oryze*)、フザリウム・グラミネアラム (*F. graminearum*)、フザリウム・サムブシナム (*F. sambucinum*)、フザリウム・セラリス (*F. cerealis*) またはサッカロマイセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) であることができる。このような宿主生物におけるリポキシゲナーゼの製造は、EP 238,023 (Novo Nordisk)、WO 96/0787 (Novo Nordisk) またはEP 244,234 (Alko) に記載されている一般的方法により実施することができる。

20

#### 【0012】

##### LOXの特性

本発明のリポキシゲナーゼは、シス-シス-ペンタジエル部分を含有する広い範囲の物質を酸化することができる。こうして、それはポリ不飽和脂肪酸、例えば、リノール酸 (18個の炭素原子、2つの二重結合)、リノレン酸 (18:3)、アラキドン酸 (20:4)、エイコサペンタエン酸 (EPA、20:5) およびドコサヘキサエン酸 (DHA、22:6) に対して作用する。また、それは脂肪酸以外の基質、例えば、メチルリノレートおよび多分またトリグリセリドに対して作用する。この酵素はリノール酸について非常に低いミカエリス定数 ( $K_M$ ) およびこの基質に対して高い特異性 ( $V_{max}/K_M$ ) を有する。

30

#### 【0013】

マグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) からのリポキシゲナーゼは9-リポキシゲナーゼである、すなわち、それはリノール酸およびリノレン酸中の炭素原子9および10の間の二重結合を酸化する。

マグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) からのリポキシゲナーゼはpH 7付近において最適活性を有し、そして広いpH範囲3~12にわたって高度に活性であり、pH範囲6~11において最適活性の50%より大きい活性を有する。それはpH 5~11において一夜インキュベートした後安定である。

#### 【0014】

マグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) からの天然のリポキシゲナーゼは50~60において最適活性を有する。それは40~60において非常に活性であり、そして70において活性は減少し始める。このリポキシゲナーゼはpH 7において50までの温度において30分のインキュベーション後安定である。

40

組換えリポキシゲナーゼ (アスペルギルス・オリゼ (*A. oryze*) において発現された) についての反応速度は、温室において得られた速度に比較して、触媒反応について最適温度においてほぼ10倍増加する。最大反応速度は67.5において得られる。速度定数の急な減少は最適温度より上において見られる。グルコシル化は組換え酵素を野生型酵素よりも熱に対していっそう安定とさせると考えられる。

#### 【0015】

組換えリポキシゲナーゼは50までの温度において少なくとも1時間非常に安定である。活性は50~60のより高い温度において直線的に低下し、60以上において1時間イ

50

ンキュベートした後、活性は検出されない。45 以下の温度におけるインキュベーション間に、活性の低下は検出されない。

リポキシゲナーゼの凍結溶液は貯蔵中に活性を多少減少させる。10%のグリセロールを添加すると、-20 において2週後、識別可能な活性の低下は存在せず、そして融解 - 凍結の反復サイクル後、酵素は活性を喪失しないで生き残る。

本発明のリポキシゲナーゼはアニオン界面活性剤の存在下にすぐれた安定性を有する。こうして、マグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) からのリポキシゲナーゼは400 ppmのLAS (直鎖状アルキルベンゼンスルホンネート) の存在下に安定である。

【0016】

#### リポキシゲナーゼの使用

リポキシゲナーゼは、生のフレーバー、例えば、リノレン酸の9-ヒドロペルオキシドからのノネナールの合成に使用することができる。この合成はWhitehead他、1995、*Cereal foods world* 40 (4)、193-197および米国特許第4,769,243号におけるように実施することができる。

また、リポキシゲナーゼはJP H 11-29410に記載されているように、植物ホルモンの合成に使用することができる。

【0017】

また、リポキシゲナーゼはカロチノイドのすぐれたオキシダントであるので、食料品、例えば、穀粉、油または海産食物、例えば、カロチノイドまたはカロチノイド様顔料の漂白に使用することができる。

酸化活性は、タンパク質、油、澱粉、繊維およびこれらの混合物の架橋に利用することができる。化学化合物の架橋をポリマーの合成に利用して、プラスチック繊維またはプラスチック樹脂を製造することができる。それをフェノール、カロチノイドまたは脂肪のしみまたは汚れの洗浄剤として漂白に使用することができる。あるいは、それは廃水または繊維材料の染料の漂白に使用することができる。

【0018】

リポキシゲナーゼは、カロチノイドを含有する植物または海産食物材料の漂白に使用することができる。こうして、それはパン、ヌードルまたはパスタの穀粉の漂白に、あるいはアスタキサンチンを含有する魚肉または魚油の漂白に使用することができる。

【0019】

また、それは脂肪酸、油または脂肪の存在下にタンパク質、油、澱粉、植物繊維またはこれらの混合物の架橋に使用することができる。それは食料品のテクスチャーまたは物理的性質を変化させるために、または脂肪または油のフレーバーを調節するために、または食物の使用のほかに天然の材料から作られたポリマーを製造するために有用である。架橋した化合物は化学化合物、例えば、フェノール、カルボニル、カルボキシルまたはアミド系化合物またはそれらの混合物であることができる。それはプラスチックの繊維または樹脂の合成に使用することができる。

【0020】

リポキシゲナーゼの他の使用は、ヒドロペルオキシドリナーゼの相乗作用としてフレーバー化合物、例えば、ヘキサナールまたはヘキセナールの一緒にした合成であることができる。あるいは、植物材料を上記2つの酵素源として使用する場合において、リポキシゲナーゼをそれに添加してフレーバー化合物の収率を改良することができる。植物または動物のホルモンの合成に同様なことを実施することができる。

最後に、それは漂白剤として使用することができる。それは布のフェノール、カロチノイド、脂肪のしみまたは汚れを漂白する洗浄剤において使用することができる。あるいは、それは廃水中の繊維材料の染料またはパルプ産業のための染料の漂白または染料のテクスチャーの変更に使用することができる。

【0021】

#### 組換え体発現ベクター

本発明の発現ベクターは典型的にはプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位

10

20

30

40

50

、翻訳開始シグナルをコードする調節配列、および、必要に応じて、選択可能なマーカー、転写ターミネーター、リプレッサー遺伝子または種々のアクチベーター遺伝子を含む。ベクターは自律的に複製するベクターであることができるか、あるいはそれを宿主細胞ゲノムの中に組み込むことができる。

【0022】

#### 形質転換体の培養による製造

本発明のリポキシゲナーゼは、リポキシゲナーゼをコードするDNA配列で適当な宿主細胞を形質転換し、酵素の産生を可能とする条件下に形質転換された生物を培養し、培養物から酵素を回収することによって製造することができる。

【0023】

宿主生物は真核細胞、特に真菌細胞、例えば、酵母菌細胞または糸状真菌細胞、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)、フザリウム (*Fusarium*)、トリコデルマ (*Trichoderma*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*)、特にアスペルギルス・ニガー (*A. niger*)、アスペルギルス・オリゼ (*A. oryze*)、フザリウム・グラミネアラム (*F. graminearum*)、フザリウム・サムブシナム (*F. sambucinum*)、フザリウム・セラリス (*F. cerealis*) またはサッカロマイセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) であることができる。このような宿主生物におけるリポキシゲナーゼの製造は、EP 238,023 (Novo Nordisk)、WO 96/007 87 (Novo Nordisk) またはEP 244,234 (Alko) に記載されている一般的方法により実施することができる。

酵素は1工程においてカチオン交換クロマトグラフィーにより均質に精製することができる。

【0024】

#### ヌクレオチドプローブ

ヌクレオチドプローブは、配列番号1のDNA配列または配列番号2のポリペプチド配列、特に成熟ペプチド部分に基づいて設計することができる。プローブは後述するようにLOXをコードするDNAのスクリーニングに使用することができる。

合成オリゴヌクレオチドプライマーは、標準的技術 (例えば、Sambrook J、Fritsch EF、Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual* (第2版) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) により、配列番号2中のアミノ酸配列の成熟部分またはDNA配列の対応する部分に基づいて製造することができる。それはデジェネレートプローブであることができ、典型的には少なくとも20のヌクレオチドを含有するであろう。

【0025】

#### 真核生物DNAライブラリーのスクリーニング

リポキシゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、工程：

- a) 真核生物DNAライブラリーを準備し、
- b) このライブラリーをスクリーニングして前述のプローブに対してハイブリダイゼーションするDNA分子を選択し、
- c) 選択したDNA分子で宿主細胞を形質転換し、
- d) 形質転換した宿主細胞を培養して、DNA分子によりコードされるポリペプチドを発現させ、そして
- e) 発現されたポリペプチドをアッセイして、リポキシゲナーゼ活性を有するポリペプチドを選択する、

を含んでなる方法により得ることができる。

【0026】

真核生物DNAライブラリーを慣用法により製造することができる。それは適当な源、例えば、前述の源に由来するゲノムDNAまたは二本鎖cDNAを含むことができる。

DNA配列についての分子スクリーニングは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および引き続くハイブリダイゼーションにより実施することができる。

よく知られている手順に従い、分子スクリーニングにおいて発生したPCRフラグメント

10

20

30

40

50

を単離し、適当にベクターの中にサブクローニングすることができる。PCRフラグメントを、例えば、コロニーまたはブランクハイブリダイゼーションにより、DNAライブラリーのスクリーニングに使用することができる。

【0027】

#### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションを使用して、所定のDNA配列が本発明のDNA配列に対応するヌクレオチドプローブに類似することを示す。ハイブリダイゼーションは低い、中程度の、または高いストリンジエンシイにおいて実施することができる。ハイブリダイゼーションの1例を後述する。

【0028】

ヌクレオチドプローブと相同的DNAまたはRNA配列との間のハイブリダイゼーションを決定するために適当な条件は、DNAフラグメントまたはRNAを含有するフィルターを5×SSC (標準的クエン酸塩類溶液) 中で10分間前ソーキングし、そして5×SSC (Sambrook他、1989)、5×デンハルト溶液 (Sambrook他、1989)、0.5% SDSおよび100 μg/mlの変性超音波処理サケ精子DNA (Sambrook他、1989) 中でプレハイブリダイズさせ、次いでランダムプライムド (Feinberg A. P. およびVogelstein B. (1983) Anal. Biochem. 132: 6 - 13)、<sup>32</sup>P-dCTP標識化 (比活性 > 1×10<sup>9</sup> cpm/μg) プローブを含有する同一溶液中でほぼ45 において12時間インキュベートすることを包含する。次いでフィルターを2×SSC、0.5% SDS中で少なくとも55 、好ましくは少なくとも60 、より好ましくは少なくとも65 、例えば、少なくとも70 、または少なくとも75 の温度において30分間2回洗浄する。

【0029】

オリゴヌクレオチドプローブがこれらの条件下にハイブリダイズする分子をX線フィルムにより検出する。

【0030】

#### アラインメントおよび相同性

本発明のリボキシゲナーゼおよびヌクレオチド配列は開示した配列に対して少なくとも75%または少なくとも85%、特に少なくとも90%または少なくとも95%、例えば、少なくとも98%の相同性を有することができる。

【0031】

本発明の目的に対して、配列のアラインメントおよび相同性スコアの計算は、タンパク質およびDNAの両方のアラインメントに有用な、ニードルマン - ウンシュ (Needleman - Wunsch) (すなわち、包括的アラインメント) を使用して実施した。デフォルト値スコアリングマトリックスBI.OSUM50および同一性マトリックスを、それぞれ、タンパク質およびDNAのアラインメントに使用する。

【0032】

ギャップにおける第1残基についてのペナルティーはタンパク質について - 12およびDNAについて - 16であるが、ギャップにおける追加の残基についてのペナルティーはタンパク質について - 2およびDNAについて - 4である。アラインメントはFASTAパッケージバージョンv20u6からである (W. R. PearsonおよびD. J. Lipman (1988)、“Improved Tools for Biological Sequence Analysis”、PNAS 85: 2444 - 2448、およびW. R. Pearson (1990) “Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTPおよびFASTA”、Methods in Enzymology 183: 63 - 98)。

【実施例】

【0033】

#### 材料および方法

分子クローニング技術はSambrook他 (1989) に記載されている。

下記の商業的プラスミドおよび大腸菌 (E. coli) 株をサブクローニングおよびDNAライブラリーの構築に使用した：

pT7Blue (Novagen)

pUC19 (TOYOBO、日本国)

10

20

30

40

50

大腸菌 (*E. coli*) JM 109 (TOYOBO、日本国)

大腸菌 (*E. coli*) DH12S (GIBCO BRL、Life Technologies、米国)

【 0 0 3 4 】

ハイブリダイゼーションプローブの標識化および検出は、DIG - 標識化および検出キット (Boehringer Mannheim) を使用して実施した。ナイロン膜Hybond - N+ (Amersham、英国) をコロニーハイブリダイゼーションのためのDNA転移に使用した。

大豆リポキシゲナーゼ (I - B型) (カタログ# L7315) およびアスタキサンチン (カタログ# A - 9335) はシグマ (Sigma) から入手した。 - カロテン (カタログ# 031 - 05533) はワコー (Wako) から入手した。

【 0 0 3 5 】

培地および緩衝液

COVE - ar : 1リットル当たり342.3 gのスクロース、20 mlのCOVE塩溶液、10 mMのアクリルアミド、15 mMのCsCl<sub>2</sub>、15 gのアガー・ノーブル (Agar noble) (Difco) 。

COVE2 - ar : 1リットル当たり30 gのスクロース、20 mlのCOVE塩溶液、10 mMのアクリルアミド、30 gのアガー・ノーブル (Agar noble) (Difco) 。

COVE塩溶液 : 1リットル当たり26 gのKCl、26 gのMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、76 gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、50 mlのコーブ (Cove) 微量金属。

【 0 0 3 6 】

コーブ微量金属 : 1リットル当たり0.04 gのNaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub>・10H<sub>2</sub>O、0.4 gのCuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、1.2 gのFeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.7 gのMnSO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O、0.7 gのNa<sub>2</sub>MoO<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.7 gのZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O。

AMG微量金属 : 1リットル当たり14.3 gのZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、2.5 gのCuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、0.5 gのNiCl<sub>2</sub>、13.8 gのFeSO<sub>4</sub>、8.5 gのMnSO<sub>4</sub>、3.0 gのクエン酸。

YPG : 1リットル当たり4 gの酵母エキス、1 gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 gのMnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、15 gのグルコース、pH 8.0。

STC : 0.8 Mのソルビトール、25 mMのTris pH 8、25 mMのCaCl<sub>2</sub>。

STPC : STC緩衝液中の40%PEG4000。

【 0 0 3 7 】

コーブ・トップ (Cove top) アガロース : 1リットル当たり342.3 gのスクロース、20 mlのCOVE塩溶液、10 mMのアセトアミド、10 gの低溶融アガロース。

MS - 9 : 1リットル当たり30 gのダイズ粉末、20 gのグリセロール、pH 8.0。

MDU - 2Bp : 1リットル当たり45 gのマルトース・1H<sub>2</sub>O、7 gの酵母エキス、12 gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 gのMnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、2 gのK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、5 gの尿素、1 gのNaCl、0.5 mlのAMG微量金属溶液、pH 5.0。

【 0 0 3 8 】

宿主生物

アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryze*) BECh2はWO 00/39322に記載されている。それはJaL228 (WO 98/123000に記載されている) の突然変異体であり、後者はIF04177の突然変異体である。

【 0 0 3 9 】

アスペルギルス・オリゼ (*A. oryze*) の形質転換

アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryze*) 株BECh2を100 mlのYPG培地中でインキュベートし、80 rpmで攪拌しながら32 において16時間インキュベートした。成長した菌糸体を濾過により収集し、次いで0.6 MのKClで洗浄し、30 μl/mlの濃度でGlucanex™ (Nvozymes) を含有する30 mlの0.6 MのKClの中に再懸濁させた。プロトプラストが形成するまで、この混合物を32 において60 rpmで攪拌しながらインキュベートした。濾過により残留する菌糸体を除去した後、プロトプラストを遠心により収集し、STC緩衝液で2回を洗浄した。

【 0 0 4 0 】

プロトプラストをヘマチトメーター (hematitometer) で計数し、STC : STPC : DMSO (8 : 2 : 0.1) の溶液の中に1.2 × 10<sup>7</sup>プロトプラスト/mlの最終濃度に再懸濁した。約4 μgの

10

20

30

40

50

DNAを100  $\mu$ lのプロトプラスト溶液に添加し、おだやかに混合し、氷上で30分間インキュベートした。1  $\mu$ lのSTPC緩衝液を混合物に添加し、37  $^{\circ}$ Cにおいてさらに30分間インキュベートした。10 mlの50  $^{\circ}$ Cに前もって加温したコーブ・トップ (Cove top) アガロースを添加した後、反応混合物をCOVE - ar寒天平板上に注いだ。平板を32  $^{\circ}$ Cにおいて5日間インキュベートした。

#### 【 0 0 4 1 】

##### SDS - PAGE

提供されたプロトコルに従い適当なAE - 6400 (Atto、日本国) を装備する商品化ゲルPA GEL AE6000 NPU - 7.5L (7.5T%) を使用して、SDSポリアクリルアミドの電気泳動を実施した。15  $\mu$ lの試料を15  $\mu$ lの2 $\times$ 濃度の試料負荷緩衝液 (100 mMのTris - HCl (pH 6.8)、200 mMのジチオスレイトール、4%のSDS、0.2%のプロモフェノールブルーおよび20%のグリセロール) の中に懸濁させ、5分間沸騰させた。20  $\mu$ lの試料溶液をポリアクリルアミドゲルに適用し、20 mA/ゲルにおいて流れる緩衝液 (25 mMのTris、0.1%のSDS、192 mMのグリシン) 中で電気泳動させた。生ずるゲルをSYPROオレンジで染色し、分子イメージャー (Imager) FX (BIO - RAD) で検出した。

10

#### 【 0 0 4 2 】

##### リポキシゲナーゼ活性のアッセイ

###### 分光光度測定アッセイ

ヒドロペルオキシドの生成を234 nmにおける吸収により追跡することによって、リポキシゲナーゼ活性を分光光度測定的に測定した。0.98 mlの緩衝液 (50 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaHPO<sub>4</sub>、pH 7.0) に、10  $\mu$ lの基質溶液 (0.2%のツイーン - 20で分散させた10 mMのリノレン酸) を添加し、10  $\mu$ lの酵素溶液の添加により反応を開始した。1単位は0.001/分の234 nmにおける吸収の増加をを引き起こす。

20

#### 【 0 0 4 3 】

##### FOXアッセイ

ヒスコトロン (Hiscotron) を使用して0.02%のツイーン - 20で分散した0.7 mMのリノレン酸を含有する50 mMの各緩衝液の80  $\mu$ lに20  $\mu$ lの酵素溶液を添加することによって、アッセイを開始し、10分間インキュベートした。900  $\mu$ lのメタノール : 水 (9 : 1) 中のFOX試薬 : 硫酸 (25 mM)、キシレノールオレンジ (100  $\mu$ M)、硫酸鉄 (II) (100  $\mu$ M)、ブチル化ヒドロキシトルエン (4 mM) を添加することによって、アッセイを停止させた。ブランクはインキュベーションの間に基質溶液のみを含有したが、FOX試薬の添加後、酵素溶液を添加した。色素によるFe<sup>2+</sup>イオンの脂質ヒドロペルオキシド仲介酸化により、酸性化キシレノールオレンジの黄色は青色に変化された。FOX試薬の添加後1時間に、620 nmにおけるFe<sup>3+</sup>錯体の吸収を測定した。

30

#### 【 0 0 4 4 】

##### 漂白アッセイ

25  $^{\circ}$ Cにおいて470 nmにおける吸収を追跡することによって、リポキシゲナーゼによる漂白作用を分光光度測定的に検査した。顔料溶液を次のようにして調製した。150  $\mu$ lのストック顔料溶液 (1 mlのクロロホルム中の1 mgの各顔料) を蒸発させて乾燥した。次いで0.3%のツイーン - 20を含む30 mlの緩衝液 (50 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaHPO<sub>4</sub>、pH 7.0) をゆっくり添加し、顔料を溶解した。0.98 mlの顔料溶液に、10  $\mu$ lの基質溶液 (0.2%のツイーン - 20で分散させた10 mMのリノレン酸) を添加し、10  $\mu$ lの酵素溶液の添加により反応を開始させた。

40

#### 実施例 1 . マグナポリテ・サルビニイ (M. salvinii) からのゲノムLOX遺伝子のクリーニング

マグナポリテ・サルビニイ (Magnaporthe salvinii) からのゲノムDNAをSac Iで消化し、1.0%のアガロースゲル上で分離した。約2.5 kbpのDNA消化物をゲルから回収し、Sac Iで線状化したBAP処理pUC19と結合させた。結合混合物を大腸菌 (E. coli) DH12Sの中に形質転換させて部分的ゲノムライブラリーを構築した。それをスクリーニングし、リポキシゲナーゼ陽性大腸菌 (E. coli) コロニーを単離し、プラスミド (pSG28と命名した) を回

50

収した。プラスミドpSG28は、推定したLOX相同体配列を含有する2.5 kbpのSac Iゲノムフラグメントを含有した。2.5 kbpのうちの1973 bpの配列を配列番号1として示す。

【0045】

イントロンを同定し、配列番号1の中に示す。S. M. Hebsgaard他、Nucleic Acids Research、1996、Vol. 24、No. 17、3439 - 3452に記載されているように、スプライス部位を予測した。

推定されたオープンリーディングフレームは1851 bpから成り、そして推定されたアミノ酸配列は617アミノ酸に対応した。これらは配列番号2に示されている。分子質量は67500 Daであるとして推定された。

プラスミドpSG28を収容する大腸菌 (E. coli) DH12SはDSMZにDSM 14139として寄託され、受け入れ日は2001年2月28日であった。

【0046】

実施例2 . アスペルギルス・オリゼ (A. oryze) におけるマグナポリテ・サルビニイ (M. salvinii) LOXの発現

発現プラスミドの構築

鋳型としてpSG28を使用するPCRにより、マグナポリテ・サルビニイ (M. salvinii) ゲノム遺伝子の部分的ゲノム配列を増幅した。プライマー3および4 (配列番号3および4) を消化して、PCR生成物の両端においてBamH IおよびXho I部位を作った (それぞれ、プライマー3のヌクレオチド4~9およびプライマー4のヌクレオチド5~10)。PCR反応混合物は2.5 mMのdNTP、30 pmolのプライマー3および4の各々、5単位のLA taqポリメラーゼ (Takara) および供給されたGC緩衝液Iから構成されていた。反応条件を下に示した。LA taqポリメラーゼを工程1後に反応混合物に添加した。

【0047】

【表1】

表1

<u>工程</u>	<u>温度</u>	<u>時間</u>
1	98 °C	10分
2	96 °C	20秒
3	55 °C	45秒
4	72 °C	30秒
5	72 °C	10分

\* 工程2~工程4を30回反復した。

PCR増幅した1.9 kbのフラグメントを単離し、pT7Blueの中にクローニングしてpSG29を形成した。

【0048】

プラスミドpSG29をBamH IおよびXho Iで消化し、そしてBamH IおよびXho Iで消化したpMT2188とLOX遺伝子を含有する1.9 kbのフラグメントを結合させた。プラスミドpMT2188は修

10

20

30

40

50

飾されたアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 中性アミロースプロモーター、アスペルギルス・ニツランス (*Aspergillus nidulans*) TPIリーダー配列、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼターミネーター、真菌形質転換のマーカースとしてアスペルギルス・ニツランス (*Aspergillus nidulans*) amdS遺伝子および大腸菌 (*E. coli*) 形質転換のマーカースとしてサッカロマイセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) *ura3*を有する。pyrF遺伝子を欠如し、サッカロマイセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) *Ura3*で相補可能である大腸菌 (*E. coli*) DB6507を使用して形質転換を実施した。生ずるプラスミドをpSG30と命名した。

【0049】

アスペルギルス・オリゼ (*A. oryzae*) におけるマグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) LOXの発現

10

アスペルギルス・オリゼ (*A. oryzae*) BECh2をプラスミドpSG30で形質転換し、選択陽性形質転換体を単離した。形質転換体をCOVE2 - ar上で32℃において5日間成長させ、100 mlのMS - 9震盪フラスコに接種した。32℃において激しく攪拌しながら1日間培養した後、3 mlの各培養物を震盪フラスコ中の100 mlのMDU - 2Bpに移し、32℃において3日間培養した。培養ブrossを3500 rpmで10分間遠心し、上清を収集した。

【0050】

上清のリポキシゲナーゼ活性を、前述したように、分光光度測定的に測定した。陽性形質転換体は約100,000U/ml培養ブrossを示したが、非形質転換アスペルギルス・オリゼ (*A. oryzae*) BECh2は活性を示さなかった。また、培養上清をSDS - PAGE分析に付した。陽性形質転換体は80 ~ 100 kDaのスミアバンドを示し、このバンドはタンパク質が高度にグリコシル化されていることを示した。非形質転換アスペルギルス・オリゼ (*A. oryzae*) BECh2は有意なバンドを示さなかった。

20

【0051】

実施例3．リポキシゲナーゼの基質特異性

多数の基質の速度論的パラメーターを標準的方法によりマグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) リポキシゲナーゼについて測定した。

【0052】

【表2】

30

表2

基質	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}/K_M$ ( $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}/\mu\text{M}$ )
リノール酸	2.63	1	2.557
Naリノレエート	2.07	0.41	5.061
リノエライジン酸	活性なし	活性なし	活性なし
リノレン酸	1.9	0.4	4.448
エイコサジエン酸	2.02	11	0.177
アラキドン酸	2.44	5.5	0.446
塩化リノレオイル	0.97	12	0.080
メチルリノレエート	0.82	30	0.026
酢酸リノレオイル	0.77	9	0.085
リノレオイル アルコール	1.4	8	0.175

40

【0053】

50

比較のために、1つの基質をまたダイズリポキシゲナーゼで試験した。

【表 3】

表 3

基質	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}/K_M$ ( $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}/\mu\text{M}$ )
リノール酸	12.3	230	0.054

10

【 0 0 5 4 】

実施例 3 . リポキシゲナーゼ活性のpH依存性

下記の緩衝液を使用して前述のFOXアッセイにより、種々のpH値におけるマグナポリテ・サルビニイ (M. salvinii) リポキシゲナーゼの相対活性を測定した：50 mMのクエン酸 / クエン酸ナトリウム (pH 2.21 ~ 3.73)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 5.30、6.17)、Tris/HCl (pH 7.01、8.02)、グリシルグリシンNaCl/NaOH (pH 9.33 ~ 11.0)。

【 0 0 5 5 】

【表 4】

20

表 4

pH	相対活性 (%)
2.21	7.11
2.90	20.6
3.73	27.7
5.30	60.0
6.17	83.7
7.01	100
8.02	92.9
9.33	82.6
11.0	77.7

30

【 0 0 5 6 】

実施例 4 . リポキシゲナーゼ活性の温度依存性

pH 7.0における10分間のインキュベーションにより、マグナポリテ・サルビニイ (M. s alvinii) リポキシゲナーゼに対する温度の作用を研究した。

40

【 0 0 5 7 】

## 【表5】

表5

温度	相対活性 (%)
25	50.1
40	90.0
50	100
60	99.6
70	60.4

10

## 【0058】

## 実施例5 . リポキシゲナーゼの漂白作用

マグナポリテ・サルビニイ (*M. salvinii*) LOXの漂白作用を検査した。比較のためにダイズL1を含めた。 - カロテンおよびアスタキサンチンを顔料として使用した。

## 【0059】

## 【表6】

20

表6

$\beta$ -カロテン	時間 (分)	<i>M. salvinii</i>	ダイズL1
	0	0.3783	0.3575
	0.4	0.3791	0.3616
	0.8	0.3729	0.3601
	1.2	0.3702	0.362
	1.4	0.3685	0.3602
	1.8	0.3651	0.3602
	2.2	0.3633	0.3595
	2.6	0.3486	0.3595
	3	0.341	0.3594
$\Delta A_{470}/分$		0.0121	0.00005
LOX活性		2.652	1.962

30

## 【0060】

40

【表7】

表7

アスタキサンチン	時間 (分)	M. salvinii	ダイズL1
	0	0.5292	0.5026
	0.4	0.5244	0.5029
	0.8	0.5177	0.505
	1	0.5166	0.5025
	1.4	0.512	0.5013
	1.8	0.5004	0.4993
	2.2	0.4876	0.4985
	2.6	0.4714	0.4986
	3	0.4566	0.498
$\Delta A_{470}/分$		0.0239	0.0021
LOX活性		2.4952	2.018

10

20

【0061】

これらの結果が示すように、マグナポリテ・サルピニイ (M. salvinii) LOXは顔料溶液を漂白する。ダイズLOXは漂白について作用をほとんど示さない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novozymes A/S

<120> Lipoxygenase

<130> 10148-wo

<160> 4

10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1973

<212> DNA

<213> Magnaporthe salvinii

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<223>

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (52)..()

<223>

30

<220>

<221> CDS

<222> (501)..(1970)

<223>

<400> 1

```

atg cgc atc gga ctc ttg gcc ttc gcc gtc gcg gcg cgc tat gtg gaa
Met Arg Ile Gly Leu Leu Ala Phe Ala Val Ala Ala Arg Tyr Val Glu
      -15              -10              -5

```

48

gcg ctg cca gtc gcg agc ggc gaa gaa gtg gcc tcg tcg tcc gct ccg Ala Leu Pro Val Ala Ser Gly Glu Glu Val Ala Ser Ser Ser Ala Pro -1 1 5 10 15	96	
acg acg ctg ccc tcg acg tcg agc agc tct gcg ctt ccc tcc ccg acc Thr Thr Leu Pro Ser Thr Ser Ser Ser 25 Ala Leu Pro Ser Pro Thr 20 30	144	
aag tac acg ctt ccc cac gag gac ccc aac ccg gaa gcg agg aag gcc Lys Tyr Thr Leu Pro His Glu Asp Pro Asn Pro Glu Ala Arg Lys Ala 35 40 45	192	
gag ata gcg tta aag agg gga ggg ttc ctc tac gga ccc tcc acc ctg Glu Ile Ala Leu Lys Arg Gly Gly Phe Leu Tyr Gly Pro Ser Thr Leu 50 55 60	240	
ggc cag act acc ttt tac ccc agc ggg acc ctg ggg acc gcc atg tcg Gly Gln Thr Thr Phe Tyr Pro Ser Gly Thr Leu Gly Thr Ala Met Ser 65 70 75	288	10
caa cgc gac cag gcc ctc tgg ctc agg gat gca gag aac caa acg ata Gln Arg Asp Gln Ala Leu Trp Leu Arg Asp Ala Glu Asn Gln Thr Ile 80 85 90 95	336	
aca gcg tat cgt gaa gcc aac gag aca ctg agg gat atc cag agc Thr Ala Tyr Arg Glu Ala Asn Glu Thr Leu Arg Asp Ile Gln Ser 100 105 110	381	
gtatgtgtcg agccgtgttt atgcgttcca atcattctct gtgctcctgt ccgtccccgc ccgggggttac agccaagccg attcagtagc taactcggaa tgtctggttt gctctgcag	441	
cat ggc ggt ctc aag acg ctt gac gac ttc gcg ctc ctc tac gac ggc His Gly Gly Leu Lys Thr Leu Asp Asp Phe Ala Leu Leu Tyr Asp Gly 115 120 125	500	
cat tgg aaa gcg tcg gtc cca gag gga ata gaa aag ggc atg ctg agc His Trp Lys Ala Ser Val Pro Glu Gly Ile Glu Lys Gly Met Leu Ser 130 135 140	548	20
aac tac act tcg gac ctg ctc ttt tcc atg gag cgg ctc tcc aac aac Asn Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Phe Ser Met Glu Arg Leu Ser Asn Asn 145 150 155	596	
ccc tac agc ctc aag cgc ctc cat cca acc aag gac aag ctg ccg ttc Pro Tyr Ser Leu Lys Arg Leu His Pro Thr Lys Asp Lys Leu Pro Phe 160 165 170	644	
agc gtc gag gac aag gtg gtc aag cag ctg acg gcc acg acg ctt gcg Ser Val Glu Asp Lys Val Val Lys Gln Leu Thr Ala Thr Thr Leu Ala 175 180 185 190	692	
gcg ctc cac aag gcc ggc cgt ctc ttc ttc gtt gac cac agc gat cag Ala Leu His Lys Ala Gly Arg Leu Phe Phe Val Asp His Ser Asp Gln 195 200 205	740	
aag aaa tac acg ccg cag gca ggt cgg tat gct gcg gcc tgc cag ggg Lys Lys Tyr Thr Pro Gln Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Ala Cys Gln Gly 210 215 220	788	30
ctt ttc tat gtg gac gcg cgg tcc aat cag ttc ctg ccg ctg gcc atc Leu Phe Tyr Val Asp Ala Arg Ser Asn Gln Phe Leu Pro Leu Ala Ile 225 230 235	836	
aag acc aac gtg ggc gca gac ctg acg tac acg cca ctc gac gac aag Lys Thr Asn Val Gly Ala Asp Leu Thr Tyr Thr Pro Leu Asp Asp Lys 240 245 250	884	
	932	

aac Asn 255	gac Asp	tgg Trp	ctt Leu	ctg Leu	gcc Ala 260	aag Lys	atc Ile	atg Met	ttc Phe	aac Asn 265	aac Asn	aat Asn	gac Asp	ctg Leu	ttc Phe 270	980	
tac Tyr	tcg Ser	cag Gln	atg Met	tac Tyr 275	cat His	gtc Val	ctg Leu	ttc Phe	cac His 280	acg Thr	gtt Val	cca Pro	gaa Glu	atc Ile 285	gtg Val	1028	
cac His	atg Met	gcc Ala	gcc Ala 290	atc Ile	cgg Arg	acg Thr	cta Leu	agc Ser 295	gag Glu	agc Ser	cac His	ccg Pro	gtg Val 300	ctg Leu	gcc Ala	1076	
gtg Val	ctc Leu	aat Asn 305	cgg Arg	atc Ile	atg Met	tat Tyr	caa Gln 310	gcc Ala	tat Tyr	gcg Ala	atc Ile	cgg Arg 315	cca Pro	gtg Val	ggc Gly	1124	
gaa Glu	cgc Arg 320	atc Ile	ctg Leu	ttc Phe	aac Asn	ccg Pro 325	ggc Gly	ggg Gly	ttt Phe	tgg Trp	gac Asp 330	cag Gln	aac Asn	ctt Leu	ggc Gly	1172	10
ctg Leu 335	ccc Pro	gcc Ala	acg Thr	gcg Ala	gcc Ala 340	gtc Val	gac Asp	ttt Phe	ctc Leu	agt Ser 345	tcc Ser	atc Ile	tac Tyr	gcc Ala	cat His 350	1220	
ggc Gly	gag Glu	ggc Gly	ggg Gly	ttc Phe 355	cgg Arg	gcc Ala	ggc Gly	tac Tyr	gtg Val 360	gaa Glu	aac Asn	aac Asn	ctg Leu	cgc Arg 365	aag Lys	1268	
cgg Arg	ggg Gly	ctg Leu	gtg Val 370	ggc Gly	gac Asp	acc Thr	ttt Phe	ggc Gly 375	ggc Gly	ccg Pro	gcg Ala	ctc Leu	ccg Pro 380	cac His	ttc Phe	1316	
ccc Pro	ttc Phe	tac Tyr 385	gag Glu	gac Asp	gcg Ala	cag Gln	cgc Arg 390	gtc Val	ctc Leu	ggg Gly	gcg Ala	atc Ile 395	cgc Arg	ggc Gly	ttc Phe	1364	20
atg Met 400	cag Gln	gcc Ala	ttt Phe	gtc Val	gac Asp	tcg Ser 405	acc Thr	tac Tyr	ggg Gly	ggc Gly	gac Asp 410	gac Asp	ggc Gly	gcg Ala	ctg Leu	1412	
gcg Ala 415	cgc Arg	gac Asp	ttt Phe	gag Glu	ctg Leu 420	cag Gln	gac Asp	tgg Trp	gtg Val	gcc Ala 425	gag Glu	gcc Ala	aac Asn	ggg Gly	ccg Pro 430	1460	
gcg Ala	cag Gln	gtg Val	cgc Arg	gac Asp 435	ttc Phe	ccc Pro	acg Thr	gcg Ala	ccg Pro 440	ctg Leu	cgg Arg	cgg Arg	cgc Arg	gag Glu 445	gag Glu	1508	
ctg Leu	gtg Val	ggc Gly	atc Ile 450	ctg Leu	acg Thr	cac His	ata Ile	gcc Ala 455	tgg Trp	aac Asn	acg Thr	ggc Gly	ggc Gly 460	gcg Ala	cac His	1556	
cac His	gtt Val 465	cta Leu	aac Asn	cag Gln	ggg Gly	gcg Ala	ccc Pro 470	gtg Val	cgc Arg	gcc Ala	tcg Ser	ggc Gly 475	gtg Val	ctg Leu	ccg Pro	1604	30
ctc Leu	cac His 480	ccg Pro	gcg Ala	gct Ala	ctt Leu	tac Tyr 485	gcg Ala	ccc Pro	gtc Val	ccg Pro	gcg Ala 490	gcc Ala	aag Lys	ggc Gly	gcc Ala	1652	
gtc Val 495	gcg Ala	tcc Ser	agc Ser	gac Asp	ggc Gly 500	ctg Leu	ctg Leu	gcg Ala	tgg Trp	ctg Leu 505	ccg Pro	gac Asp	gag Glu	gtc Val	aaa Lys 510	1700	
tcg Ser	gtg Val	gag Glu	cag Gln	gtg Val 515	tcg Ser	ctg Leu	ctg Leu	gcg Ala	cgc Arg 520	ttc Phe	aac Asn	cgc Arg	gcg Ala	cag Gln 525	gtt Val	1748	

agg gac aga aac cag acg gtg cgc aac atg ttc gcc gca ccg gag ctg 1796  
 Arg Asp Arg Asn Gln Thr Val Arg Asn Met Phe Ala Ala Pro Glu Leu  
 530 535 540

ctg gct gga aat ggc gag gcg tac gcg gcg gcc aac gcg agg ttc gtc 1844  
 Leu Ala Gly Asn Gly Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Asn Ala Arg Phe Val  
 545 550 555

gag gag acg ggc cgg ata agc cgc gag ata gag ggc agg ggt ttc gat 1892  
 Glu Glu Thr Gly Arg Ile Ser Arg Glu Ile Glu Gly Arg Gly Phe Asp  
 560 565 570

agc aag ggc ctg agc cag ggg atg ccc ttt atc tgg acc gcc ttg aat 1940  
 Ser Lys Gly Leu Ser Gln Gly Met Pro Phe Ile Trp Thr Ala Leu Asn  
 575 580 585 590

ccc gcg gtg aac ccg ttt ttc ctg agc atc tag 1973  
 Pro Ala Val Asn Pro Phe Phe Leu Ser Ile  
 595 600

10

<210> 2  
 <211> 617  
 <212> PRT  
 <213> Magnaporthe salvinii

<400> 2  
 Met Arg Ile Gly Leu Leu Ala Phe Ala Val Ala Ala Arg Tyr Val Glu  
 -15 -10 -5 20

Ala Leu Pro Val Ala Ser Gly Glu Glu Val Ala Ser Ser Ser Ala Pro  
 -1 1 5 10 15

Thr Thr Leu Pro Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Leu Pro Ser Pro Thr  
 20 25 30

Lys Tyr Thr Leu Pro His Glu Asp Pro Asn Pro Glu Ala Arg Lys Ala  
 35 40 45

Glu Ile Ala Leu Lys Arg Gly Gly Phe Leu Tyr Gly Pro Ser Thr Leu  
 50 55 60 30

Gly Gln Thr Thr Phe Tyr Pro Ser Gly Thr Leu Gly Thr Ala Met Ser  
 65 70 75

Gln Arg Asp Gln Ala Leu Trp Leu Arg Asp Ala Glu Asn Gln Thr Ile  
 80 85 90 95

Thr Ala Tyr Arg Glu Ala Asn Glu Thr Leu Arg Asp Ile Gln Ser His  
 100 105 110

Gly Gly Leu Lys Thr Leu Asp Asp Phe Ala Leu Leu Tyr Asp Gly His  
 115 120 125

20

30

Trp Lys Ala Ser Val Pro Glu Gly Ile Glu Lys Gly Met Leu Ser Asn  
130 135 140

Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Phe Ser Met Glu Arg Leu Ser Asn Asn Pro  
145 150 155

Tyr Ser Leu Lys Arg Leu His Pro Thr Lys Asp Lys Leu Pro Phe Ser  
160 165 170 175

Val Glu Asp Lys Val Val Lys Gln Leu Thr Ala Thr Thr Leu Ala Ala  
180 185 190

Leu His Lys Ala Gly Arg Leu Phe Phe Val Asp His Ser Asp Gln Lys  
195 200 205

10

Lys Tyr Thr Pro Gln Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Ala Cys Gln Gly Leu  
210 215 220

Phe Tyr Val Asp Ala Arg Ser Asn Gln Phe Leu Pro Leu Ala Ile Lys  
225 230 235

Thr Asn Val Gly Ala Asp Leu Thr Tyr Thr Pro Leu Asp Asp Lys Asn  
240 245 250 255

Asp Trp Leu Leu Ala Lys Ile Met Phe Asn Asn Asn Asp Leu Phe Tyr  
260 265 270

20

Ser Gln Met Tyr His Val Leu Phe His Thr Val Pro Glu Ile Val His  
275 280 285

Met Ala Ala Ile Arg Thr Leu Ser Glu Ser His Pro Val Leu Ala Val  
290 295 300

Leu Asn Arg Ile Met Tyr Gln Ala Tyr Ala Ile Arg Pro Val Gly Glu  
305 310 315

Arg Ile Leu Phe Asn Pro Gly Gly Phe Trp Asp Gln Asn Leu Gly Leu  
320 325 330 335

30

Pro Ala Thr Ala Ala Val Asp Phe Leu Ser Ser Ile Tyr Ala His Gly  
340 345 350

Glu Gly Gly Phe Arg Ala Gly Tyr Val Glu Asn Asn Leu Arg Lys Arg  
355 360 365

Gly Leu Val Gly Asp Thr Phe Gly Gly Pro Ala Leu Pro His Phe Pro  
370 375 380

Phe Tyr Glu Asp Ala Gln Arg Val Leu Gly Ala Ile Arg Gly Phe Met  
385 390 395

Gln Ala Phe Val Asp Ser Thr Tyr Gly Gly Asp Asp Gly Ala Leu Ala  
400 405 410 415

Arg Asp Phe Glu Leu Gln Asp Trp Val Ala Glu Ala Asn Gly Pro Ala  
420 425 430

Gln Val Arg Asp Phe Pro Thr Ala Pro Leu Arg Arg Arg Glu Glu Leu  
435 440 445

Val Gly Ile Leu Thr His Ile Ala Trp Asn Thr Gly Gly Ala His His  
450 455 460

Val Leu Asn Gln Gly Ala Pro Val Arg Ala Ser Gly Val Leu Pro Leu  
465 470 475

10

His Pro Ala Ala Leu Tyr Ala Pro Val Pro Ala Ala Lys Gly Ala Val  
480 485 490 495

Ala Ser Ser Asp Gly Leu Leu Ala Trp Leu Pro Asp Glu Val Lys Ser  
500 505 510

Val Glu Gln Val Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Arg Ala Gln Val Arg  
515 520 525

Asp Arg Asn Gln Thr Val Arg Asn Met Phe Ala Ala Pro Glu Leu Leu  
530 535 540

20

Ala Gly Asn Gly Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Asn Ala Arg Phe Val Glu  
545 550 555

Glu Thr Gly Arg Ile Ser Arg Glu Ile Glu Gly Arg Gly Phe Asp Ser  
560 565 570 575

Lys Gly Leu Ser Gln Gly Met Pro Phe Ile Trp Thr Ala Leu Asn Pro  
580 585 590

Ala Val Asn Pro Phe Phe Leu Ser Ile  
595 600

30

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc\_feature

<223> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Primer 3

<400> 3  
cgcggatcca tgcgcatcgg actccttggc

29

<210> 4

10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc\_feature

<223> Artificial

<220>

20

<221> misc\_feature

<223> Primer 4

<400> 4  
cccgctcgag ctagatgctc aggaaaaacg g

31

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 5/00 A
<i>A 2 1 D</i>	<i>2/26</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 2 1 D</i> 2/26
<i>A 2 1 D</i>	<i>13/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 2 1 D</i> 13/00
<i>A 2 3 L</i>	<i>1/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 2 3 L</i> 1/10 Z
<i>A 2 3 L</i>	<i>1/277</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 2 3 L</i> 1/277
<i>C 1 1 D</i>	<i>3/386</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 1 D</i> 3/386
<i>C 1 2 P</i>	<i>7/64</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 7/64

(72)発明者 杉尾 明子  
 アメリカ合衆国, カンザス 6 6 5 0 2 , マンハッタン , ヒルクレスト ドライブ 1 6 0 4 , ア  
 パートメント ユー - 2 1

(72)発明者 高木 忍  
 千葉県船橋市前原西 1 - 3 1 - 1 - 7 0 8

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 0 8 0 3 9 ( J P , A )  
 J.Biol.Chem.,Vol.273,No.21(1998)p.13072-13079

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 BIOSIS/WPI (DIALOG)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 SwissProt/PIR/GeneSeq