

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3601835号  
(P3601835)

(45) 発行日 平成16年12月15日(2004.12.15)

(24) 登録日 平成16年10月1日(2004.10.1)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 N 9/52

C 1 2 N 9/52

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/02

C

請求項の数 16 (全 53 頁)

|               |                         |           |                      |
|---------------|-------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平11-502065            | (73) 特許権者 | タカラバイオ株式会社           |
| (86) (22) 出願日 | 平成10年6月4日(1998.6.4)     |           | 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号      |
| (86) 国際出願番号   | PCT/JP1998/002465       | (74) 代理人  | 弁理士 青山 稔             |
| (87) 国際公開番号   | W01998/056926           | (74) 代理人  | 弁理士 田中 光雄            |
| (87) 国際公開日    | 平成10年12月17日(1998.12.17) | (72) 発明者  | 高蔵 晃                 |
| 審査請求日         | 平成13年8月31日(2001.8.31)   |           | 滋賀県大津市里7丁目3番12号      |
| (31) 優先権主張番号  | 特願平9-151969             | (72) 発明者  | 森下 みお                |
| (32) 優先日      | 平成9年6月10日(1997.6.10)    |           | 滋賀県大津市中央4丁目7番23号 桐野  |
| (33) 優先権主張国   | 日本国(JP)                 |           | ハイツB-2               |
| 微生物の受託番号      | FERM BP-6294            | (72) 発明者  | 下條 智子                |
|               |                         |           | 京都府京都市中京区西九軒町291-805 |
|               |                         |           | 最終頁に続く               |

(54) 【発明の名称】 超耐熱性プロテアーゼ発現系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端より1以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなり、かつ耐熱性プロテアーゼ活性を有するプロテアーゼであって、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とするプロテアーゼ。

【請求項2】

配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のプロテアーゼ。

【請求項3】

配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端より1以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなり、かつ耐熱性プロテアーゼ活性を有するタンパク質であって、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項4】

配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする請求項3記載のプロテアーゼ遺伝子。

【請求項5】

配列表の配列番号2に示される塩基配列からなる請求項4記載のプロテアーゼ遺伝子。

【請求項6】

式I:

SIG-Ala-Gly-Gly-Asn-PRO

[ I ]

[式中、SIGは配列表の配列番号3に示されるサブチリシン由来のシグナルペプチドのア

10

20

ミノ酸配列を、PROは発現させようとするタンパクのアミノ酸配列をそれぞれ示す]で表されるアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項 7】

PROが超好熱菌由来の耐熱性プロテアーゼのアミノ酸配列である請求項 6 記載の遺伝子。

【請求項 8】

PROがピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) 由来のプロテアーゼのアミノ酸配列である請求項 7 記載の遺伝子。

【請求項 9】

PROが請求項 1 あるいは請求項 2 に記載のプロテアーゼのアミノ酸配列を含有するものである請求項 8 記載の遺伝子。

10

【請求項 10】

請求項 6～9 いずれか 1 項記載の遺伝子を導入したバチルス属 (Bacillus) 細菌を培養し、該培養物から目的とするタンパクを採取する工程からなることを特徴とするタンパクの製造方法。

【請求項 11】

バチルス属細菌がバチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) である請求項 10 記載のタンパクの製造方法。

【請求項 12】

請求項 6～9 いずれか 1 項記載の遺伝子がプラスミドベクターによってバチルス属細菌に導入されている請求項 10 記載のタンパクの製造方法。

20

【請求項 13】

Bacillus subtilis DB104/pSP0124Δ C (FERM BP-6294) に保持されているプラスミドである pSP0124Δ C がバチルス属細菌に導入されている請求項 12 記載のタンパクの製造方法。

【請求項 14】

Bacillus subtilis DB104/pSP0124Δ C FERM BP-6294 を培養し、該培養物から目的とするタンパクを採取する工程からなることを特徴とする請求項 13 記載のタンパクの製造方法。

【請求項 15】

請求項 6～9 いずれか 1 項記載の遺伝子が挿入されているプラスミドベクター。

30

【請求項 16】

Bacillus subtilis DB104/pSP0124Δ C (FERM BP-6294) に保持されているプラスミド pSP0124Δ C である請求項 15 記載のプラスミドベクター。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、工業用酵素として有用な超耐熱性プロテアーゼ、それをコードする遺伝子および該酵素の遺伝子工学的製造方法に関する。

背景技術

プロテアーゼは蛋白質中のペプチド結合を切断する酵素であり、動物、植物、微生物より数多くの酵素が見い出されている。その用途は研究用試薬、医薬の他、洗剤への添加、食品の加工、逆反応を利用した化学合成といった工業的分野にも及び、産業上極めて重要な酵素といえる。工業的分野で使用されるプロテアーゼには物理的、化学的に高い安定性を要求されることから、特に耐熱性の酵素が好んで使用されている。バチルス (Bacillus) 属細菌の生産するプロテアーゼは割合に高い耐熱性を示すことから、現在、産業的に使用されているプロテアーゼの主流を占めている。しかし、さらに優れた酵素が望まれており、高温で生育する微生物、例えば、好熱性バチルス属細菌や超好熱菌より酵素を取得しようとする試みもなされている。

40

例えば、超好熱菌のひとつであるピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) がプロテアーゼを生産することが知られている [アプライド・アンド・エンバイロンメンタル・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 第 56 巻、第 1992～1998 頁 (1990

50

）、エフ・イー・エム・エス・マイクロバイオリジカル・レターズ（FEMS Microbiol. Letters）第71巻、第17～20頁（1990）、ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオリジ（J. Gen. Microbiol.）第137巻、第1193～1199頁（1991）]。

また、ピロコッカス属に属する超好熱菌、KOD1株（*Pyrococcus* sp. strain KOD1）はチオールプロテアーゼ（システインプロテアーゼ）を生産することが報告されている[アプライド・アンド・エンバイロンメンタル・マイクロバイオリジ（Appl. Environ. Microbiol.）第60巻、第4559～4566頁（1994）]。同じく超好熱菌であるサーモコッカス（*Thermococcus*）属、スタロフィロサーマス（*Staphylothermus*）属、サーモバクテロイデス（*Thermobacteroides*）属の細菌についてもプロテアーゼの生産が知られている[アプライド・マイクロバイオリジ・アンド・バイオテクノロジー（Appl. Microbiol. Biotechnol.）第34巻、第715～719（1991）]。 10

上記のような超好熱菌由来のプロテアーゼは高い熱安定性を有しており、現在使用されている耐熱性プロテアーゼに変わって、あるいは、これまではプロテアーゼの使用が考えられていなかった分野において利用されることが期待されている。

しかしながら、これらの酵素を生産する微生物のほとんどは高温条件でのみ生育するものであり、例えば、ピロコッカス・フリオサスの場合には90～100℃での培養が必要である。このような高温での培養操作はエネルギーコスト的にも不利である。また、これらの超好熱菌のプロテアーゼ生産量はこれまで使用されてきた微生物プロテアーゼに比べて低い。このように超好熱菌由来のプロテアーゼの工業的な製造方法は問題を有している。

一方、目的とする酵素遺伝子を単離し、培養の容易な宿主微生物にこれを導入して遺伝子工学的な酵素の生産を行うことは現在広く行われている。しかしながら、宿主に導入された酵素遺伝子は必ずしも意図したような効率で発現されるとは限らない。これは導入される遺伝子のGC含量やコドンの使用頻度が宿主の遺伝子のものと異なることなどが主たる原因と考えられている。したがって、その使用目的にかなう酵素生産量を得るためには、導入遺伝子、宿主ごとに発現方法を至適化することが必要である。 20

#### 発明の目的

本発明の目的は上記の課題を解決するために、工業的な使用に有利な超好熱菌のプロテアーゼを提供すること、該超好熱菌のプロテアーゼをコードする遺伝子を単離すること、および該遺伝子を用いた超耐熱性プロテアーゼの遺伝子工学的製造方法を提供することにある。 30

#### 発明の概要

超好熱菌の生産するプロテアーゼの中には、そのアミノ酸配列の相同性からサブチリシン・タイプと呼ばれるアルカリ性セリンプロテアーゼに属すると考えられるものがある。これらの遺伝子を、例えば、タンパクの遺伝子工学的生産に汎用されるバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）に導入した場合、該酵素の生産量はバチルス・サブチリスが本来生産しているタンパクには及ばない。

本発明者らは鋭意研究の結果、発現させようとする超好熱菌由来プロテアーゼ遺伝子の上流にサブチリシン由来のシグナルペプチド（シグナル配列）をコードする遺伝子を配し、さらにその切断点周辺のアミノ酸配列を改変することにより、目的遺伝子がバチルス・サブチリスにおいて高効率で発現されるようになることを見い出した。また、目的とする超好熱菌由来プロテアーゼ遺伝子のうち、酵素活性の発現には必須でない部分を欠失させることによって酵素発現量の改善が見られることを明らかにし、本発明を完成させるに至った。 40

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する耐熱性プロテアーゼ、および配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ耐熱性プロテアーゼ活性を有するプロテアーゼである。

また、本発明の第2の発明は、第1の発明の耐熱性プロテアーゼをコードする遺伝子、および該遺伝子にハイブリダイズする耐熱性プロテアーゼ遺伝子である。

本発明の第3の発明は、超好熱菌由来の耐熱性プロテアーゼを遺伝子工学的に製造するた 50

めに使用される遺伝子であり、式I:

SIG-Ala-Gly-Gly-Asn-PRO [ I ]

[式中、SIGはサブチリシン由来のシグナルペプチドのアミノ酸配列を、PROは発現させようとするタンパクのアミノ酸配列のアミノ酸配列をそれぞれ示す]

で表されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。SIGは、好ましくは配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列であり、また、PROは好ましくは超好熱菌由来の耐熱性プロテアーゼ、特に好ましくはピロコッカス・フリオサス由来のプロテアーゼのアミノ酸配列である。

本発明の第4の発明は、タンパクの遺伝子工学的な製造方法に関し、第3の発明の遺伝子を導入したバチルス属細菌を培養し、該培養物から目的のタンパクを採取する工程を含有することを特徴とする。 10

本発明の第5の発明はタンパクを遺伝子工学的に製造するために使用されるプラスミドであり、第3の発明の遺伝子を挿入されていることを特徴とする。

本発明によって開示されるプロテアーゼを含め、天然に存在するタンパクにはそれをコードする遺伝子の多形や変異の他、生成後のタンパクの生体内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中に1または数個のアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないタンパクと実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。人為的にタンパクのアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列 20 中のあるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている[サイエンス (Science)、第224巻、1431頁 (1984)]。このように本発明に開示されたアミノ酸配列中に1または数個のアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等が生じたアミノ酸配列を有し、かつ本発明のプロテアーゼと同等の活性を有するプロテアーゼは本発明の範囲内に属するものである。

本明細書における「(ある遺伝子に)ハイブリダイズする遺伝子」とは、ある遺伝子に類似した塩基配列を有する遺伝子である。ある遺伝子に類似した塩基配列を有する遺伝子は、そこにコードされているタンパク質のアミノ酸配列、さらに該タンパク質が有している機能も類似している可能性が高い。遺伝子の塩基配列の類似性は、両遺伝子あるいはその一部どうしがストリンジェントな条件においてハイブリッドを形成する(ハイブリダイズ 30 する)かどうかによって調べることができ、これを利用してある遺伝子がコードするタンパクと同様の機能を持つタンパクをコードする遺伝子を取得することができる。すなわち、本発明で得られた遺伝子、あるいはその一部をプローブに用いて公知の方法でハイブリダイゼーションを行うことにより、本発明の遺伝子に類似の塩基配列を有する遺伝子を取得することができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行、T.マニアティス(T.Maniatis)ら編集、モレキュラー クローニング: ア ラボラトリー マニュアル第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.)に記載された方法により実施することができる。さらに具体的には、例えば、以下の条件でハイブリダイゼーションを行うことができる。すなわち、DNAを 40 固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、0.01% 変性サケ精子DNAを含む6×SSC(1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0を示す)中で、50℃にて12~20時間、プローブとともにインキュベートする。インキュベーション終了後、0.5% SDSを含む2×SSC中、37℃での洗浄から始めて、SSC濃度は0.1×までの範囲で、また、温度は50℃までの範囲で変化させ、固定されたDNA由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまでメンブレンを洗浄する。

また、ハイブリダイゼーションに代えて本発明で得られた遺伝子の塩基配列の一部をプライマーに用いる遺伝子増幅法、例えば、PCR法を利用することもできる。こうして得られた遺伝子が目的の機能を有するタンパクをコードするものであるかどうかは、得られた遺伝子を適当な宿主と発現系とを利用して発現させ、得られたタンパクの活性を調べること 50

によって知ることができる。

【図面の簡単な説明】

図1は、プラスミドpSTC3の制限酵素地図である。

図2は、プロテアーゼPFUS、プロテアーゼTCESおよびサブチリシンのアミノ酸配列を比較する図である。

図3は、プロテアーゼPFUS、プロテアーゼTCESおよびサブチリシンのアミノ酸配列を比較する図である。

図4は、プロテアーゼPFUS、プロテアーゼTCESおよびサブチリシンのアミノ酸配列を比較する図である。

図5は、プロテアーゼPFUS、プロテアーゼTCESおよびサブチリシンのアミノ酸配列を比較する図である。 10

図6は、プラスミドpSNP1の制限酵素地図である。

図7は、プラスミドpPS1の制限酵素地図である。

図8は、プラスミドpNAPS1の制限酵素地図である。

発明の詳細な説明

本発明に係る超耐熱性プロテアーゼとしては、種々の超好熱菌由来のプロテアーゼがあげられる。例えば、W095/34645号公報にはピロコッカス・フリオサスおよびサーモコッカス・セラー由来のプロテアーゼについて記載されている。

ピロコッカス・フリオサスDSM3638由来のプロテアーゼ遺伝子は該菌株のゲノムDNAライブラリーより、耐熱性のプロテアーゼ活性を指標として単離された。該遺伝子を含有するプラスミドはプラスミドpTPR12と命名され、また、該プラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリJM109はEscherichia coli JM109/pTPR12と命名、表示され、平成6年5月24日（原寄託日）よりブダペスト条約の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5103として寄託されている。以降、本明細書においてはこのプロテアーゼを、プロテアーゼPFULと呼ぶ。プロテアーゼPFULは高い熱安定性を有するプロテアーゼであり、95℃においてもプロテアーゼ活性を示す。 20

上記のプラスミドpTPR12に挿入されたピロコッカス・フリオサス由来のDNA断片の塩基配列はすでに決定されている。プラスミドpTPR12の挿入DNA断片のうち、2つのDra Iサイトで挟まれた約4.8kb部分の塩基配列を配列表の配列番号5に示す。また、該塩基配列より推定される遺伝子産物のアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示す。すなわち、配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列は上記のプロテアーゼPFULのアミノ酸配列である。該配列に示されるように該プロテアーゼPFULは1398アミノ酸残基からなり、分子量15万をこえる高分子量のプロテアーゼである。 30

配列表の配列番号6に示される上記のプロテアーゼPFULのアミノ酸配列を既知の微生物由来プロテアーゼのアミノ酸配列と比較することにより、プロテアーゼPFULの前半部分のアミノ酸配列とサブチリシンに代表される一群のアルカリ性セリンプロテアーゼ〔プロテイン・エンジニアリング（Protein Engineering）第4巻、第719～737頁（1991）〕との間に相同性が存在し、特にプロテアーゼの触媒活性に重要とされる4つのアミノ酸残基周辺に極めて高い相同性が存在していることが判明している。 40

このように超好熱菌ピロコッカス・フリオサスの生産するプロテアーゼPFULのアミノ酸配列中に、常温菌由来のプロテアーゼに共通して存在する領域が保存されていることが明らかとなったことより、ピロコッカス・フリオサス以外の超好熱菌の生産する同種のプロテアーゼにもこの領域が存在していることが期待できる。

例えば、プロテアーゼPFULのアミノ酸配列のうちサブチリシン等と高い相同性を示す領域をコードするプロテアーゼPFUL遺伝子の塩基配列をもとに合成したオリゴヌクレオチドPRO-1F、PRO-2F、PRO-2RおよびPRO-4Rを組み合わせてプライマーに用い、各種の超好熱菌の染色体DNAを鋳型としたPCRを行うことにより超耐熱性プロテアーゼ遺伝子をスクリーニングすることができる。配列表の配列番号7、8、9および10にそれぞれオリゴヌクレオチドPRO-1F、PRO-2F、PRO-2RおよびPRO-4Rの塩基配列を示す。 50

本発明に係るプロテアーゼの由来する超好熱菌としては、ピロコッカス属、サーモコッカス属、スタフィロサーマス属、サーモバクテロイデス属等に属する細菌が使用でき、サーモコッカス属に属する細菌としては、例えば、サーモコッカス・セラー (Thermococcus celer) DSM2476が使用でき、該菌株はドイッチェ・ザムルンク・フォン・ミクロオルガニズメン・ウント・ツェルクルチュウレンGmbHより入手可能な菌株である。サーモコッカス・セラーDSM2476の染色体DNAを鋳型とし、上記のオリゴヌクレオチドPRO-1FとPRO-2Rの組み合わせ、あるいはPRO-2FとPRO-4Rの組み合わせをプライマーに用いてPCRを行った場合には特異的なDNA断片の増幅が認められ、プロテアーゼ遺伝子の存在を知ることができる。また、これらのDNA断片を適当なプラスミドベクターに挿入した組換えプラスミドを作製した後、挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法で調べることにより、該断片にコードされるアミノ酸配列を推定することができる。この結果、これらのDNA断片にはプロテアーゼPFUL、および各種微生物由来のアルカリ性セリンプロテアーゼのアミノ酸配列と相同性のあるアミノ酸配列がコードされており、上記のPCR増幅DNA断片がプロテアーゼ遺伝子を鋳型として増幅されたものであることが明らかとなった。

つぎに、上記のオリゴヌクレオチド、あるいは上記のPCRにより得られた増幅DNA断片をプローブに用いて超好熱菌の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより、超耐熱性プロテアーゼ遺伝子、例えば、サーモコッカス・セラーの生産する超耐熱性プロテアーゼの遺伝子を得ることができる。

例えば、サーモコッカス・セラーDSM2476の染色体DNAを制限酵素Sau3A Iで部分消化して得られたDNA断片と、ラムダGEM-11ベクター (プロメガ社製) とをライゲーションした後、イン・ビトロ・パッケージング法によってラムダファージ粒子中にパッケージングすることによって得られるライブラリーについて、上記のPCRにより得られた増幅DNA断片をプローブに用いたブラークハイブリダイゼーションを行い、目的の遺伝子を含むファージクローンを得ることができる。

このようにして得られたファージクローンに含有されるDNA断片を解析した結果、約1.9kbのSac I断片にプロテアーゼ遺伝子が存在することが示され、さらにその塩基配列を調べることによってこの断片はプロテアーゼ遺伝子の5'側領域を欠いていることがわかる。この5'側領域はカセット、およびカセットプライマーを用いるPCRを利用して取得することができる (宝酒造遺伝子工学製品ガイド、1994-1995年版、第250~251頁)。こうしてプラスミドpTCS6に欠けていた超耐熱性プロテアーゼ遺伝子の5'側領域をカバーするDNA断片を得ることができ、さらにこの両DNA断片の塩基配列からサーモコッカス・セラー由来の超耐熱性プロテアーゼ遺伝子全長の塩基配列を知ることができる。

得られた塩基配列中に存在するオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表の配列番号11に、また、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号12にそれぞれ示す。こうして、それをコードする遺伝子の塩基配列、およびそのアミノ酸配列が明らかにされたサーモコッカス・セラー由来の超耐熱性プロテアーゼはプロテアーゼTCESと命名されている。

上記の2つのDNA断片を組み合わせることによりプロテアーゼTCES遺伝子の全長を再構成した発現プラスミドを構築することができるが、エシェリヒア・コリを宿主とした場合には目的の発現プラスミドが導入された形質転換体は得られなかった。これは菌体内に該遺伝子の発現産物が生成されることがエシェリヒア・コリにとって有害、または致死になることが原因であると予想される。このような場合には、例えば、バチルス・サブチリスを宿主としてプロテアーゼを細胞外に分泌発現させ、その活性を確認することが考えられる。

バチルス・サブチリスとしてはバチルス・サブチリスDB104が使用でき、該菌株はジーン (Gene) 第83巻、第215~233頁 (1989) 記載の公知の菌株である。クローニングベクターとしてはプラスミドpUB18-P43が使用でき、該プラスミドはカルガリー大学、スイーラム・ウォン (Sui-Lam Wong) 博士より恵与されたプラスミドである。また、該プラスミドは選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を含んでいる。

プラスミドベクターpUB18-P43のP43プロモーター下流にプロテアーゼTCES遺伝子が挿入

10

20

30

40

50

された組換えプラスミドはプラスミドpSTC3と命名され、該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104は*Bacillus subtilis* DB104/pSTC3と命名、表示され、平成7年12月1日（原寄託日）より、ブタペスト条約の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5635として寄託されている。

図1に、プラスミドpSTC3の制限酵素地図を示す。図中、太実線がプラスミドベクターpUB18-P43への挿入DNA断片である。

上記の*Bacillus subtilis* DB104/pSTC3を培養し、培養液上清、および菌体抽出物についてプロテアーゼ活性を調べると、どちらにも耐熱性のプロテアーゼ活性が認められる。

該形質転換体培養物より得られるプロテアーゼの粗酵素標品の主な性質は以下のとおりである。 10

（1）作用：

カゼイン、ゼラチンを分解し、短鎖ポリペプチドを生成する。

スクシニル-L-ロイシル-L-ロイシル-L-バリル-L-チロシン-4-メチルクマリン-7-アミド（Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA）を加水分解し蛍光物質（7-アミノ-4-メチルクマリン）を生成する。

スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド（Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA）を加水分解し黄色物質（p-ニトロアニリン）を生成する。

（2）至適温度：

37～95℃で酵素活性を示し、その至適温度は70～80℃である。 20

（3）至適pH：

pH5.5～9の間で酵素活性を示し、その至適pHはpH7～8である。

（4）熱安定性：

80℃、3時間の処理後も90%以上の酵素活性を保持している。

プロテアーゼPFUL、プロテアーゼTCESおよびサブチリシン〔サブチリシンBPN'、ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Nucl. Acids Res.）第11巻、第7911～7925頁（1983）〕のアミノ酸配列を、図2～図5に示したように相同性のある領域が一致するように並べてみると、プロテアーゼPFULにはそのC末端側だけではなく、相同性がある領域の間にも、プロテアーゼTCESおよびサブチリシンには認められない配列が存在することがわかる。これより、ピロコッカス・フリオサスには、プロテアーゼPFULのほかに、それよりも分子量が小さいプロテアーゼTCESまたはサブチリシンのようなプロテアーゼが存在する可能性も考えられる。 30

そこで、上記の相同性を有する領域に由来するDNAプローブを使用し、ピロコッカス・フリオサスより調製した染色体DNAをターゲットにしてサザンハイブリダイゼーションを行うと、プロテアーゼPFULの遺伝子以外にもシグナルが認められ、さらにもう1種のプロテアーゼ遺伝子の存在が明らかとなった。

この新規のプロテアーゼ遺伝子は以下のような操作によって単離することができる。

例えば、ピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを適当な制限酵素で消化した後、これをターゲットとし、上記のようなサザンハイブリダイゼーションによって新規のプロテアーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を取得する。該DNA断片の塩基配列を調べて、それが上記のプロテアーゼと相同性を有するアミノ酸配列をコードするものかどうかを確認し、さらに該DNA断片が目的の遺伝子の全長を含んでいなかった場合にはインバースPCR法等によって足りない部分を単離する。 40

例えば、ピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを制限酵素Sac IおよびSpe I（宝酒造社製）で消化し、これを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った場合には約0.6kbのサイズにシグナルが認められる。このサイズのDNA断片を回収し、これをプラスミドベクターpBluescriptSK（-）（ストラタジーン社製）のSpe I-Sac Iサイト間に挿入し、得られる組換えプラスミドでエシェリヒア・コリJM109を形質転換する。この形質転換体より、上記のサザンハイブリダイゼーションに使用したものと同一プローブを用いたコロニ 50

ーハイブリダイゼーションによって目的の断片が組込まれたクローンを取得することができる。得られたクローンの保持するプラスミドがプロテアーゼをコードする配列を有するかどうかはプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を調べることによって確認することができる。こうしてプロテアーゼ遺伝子の存在が確認されたプラスミドはプラスミドpSS3と命名されている。

該プラスミドpSS3に挿入されたDNA断片の塩基配列より推定されるアミノ酸配列にはサブチリシン、プロテアーゼPFUL、プロテアーゼTCES等の配列と相同性があることが示される。こうしてピロコッカス・フリオサスより新たにその一部が得られた、プロテアーゼPFUL遺伝子とは異なるプロテアーゼ遺伝子の産物は、プロテアーゼPFUSと命名されている。該プロテアーゼのN末端側をコードする領域、およびC末端側をコードする領域はインバースPCR法によって得ることができる。

10

インバースPCRに使用するプライマーは、上記のプラスミドpSS3に含まれる挿入DNA断片の塩基配列をもとに作製することができる。つぎに、ピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを適当な制限酵素で消化した後、生じたDNA断片について分子内ライゲーション反応を行う。この反応液を鋳型とし、上記のプライマーを用いたPCRを行ってプラスミドpSS3に含まれるプロテアーゼ遺伝子の断片に隣接した領域のDNA断片を取得することができる。こうして得られたDNA断片の塩基配列を解析することによってその領域にコードされている酵素タンパクのアミノ酸配列を推定し、さらにピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを鋳型にしてプロテアーゼPFUS遺伝子の全長を増幅することが可能なプライマーを作製することができる。プロテアーゼPFUSの開始コドンの直前の塩基配列を有し、その5'側にBamH Iサイトが導入できるプライマーNPF-4、およびプロテアーゼPFUS遺伝子の3'側部分に相補的な配列を有し、その5'側にSph Iサイトを導入できるプライマーNPR-4を設定することができる。

20

上記のプライマーNPF-4およびNPR-4の塩基配列を配列表の配列番号13および14に示す。この2種のプライマーを用い、ピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを鋳型にしてプロテアーゼPFUS遺伝子の全長を増幅することができる。

プロテアーゼTCESの場合と同様にプロテアーゼPFUSをバチルス・サブチリスを宿主として発現させることができる。プロテアーゼPFUSを発現させるためのプラスミドは、プロテアーゼTCESの発現プラスミドpSTC3をもとにして構築できる。すなわち、上記のプライマーを用いたPCRによって増幅されるプロテアーゼPFUS遺伝子全長を含むDNA断片をプラスミドpSTC3上のプロテアーゼTCES遺伝子と置換することにより、プロテアーゼPFUSの発現のためのプラスミドを構築することができる。このようにして構築された発現プラスミドはプラスミドpSNP1と命名され、また、該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104はBacillus subtilis DB104/pSNP1と命名、表示され、平成7年12月1日（原寄託日）より、ブタペスト条約の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5634として寄託されている。図6にプラスミドpSNP1の制限酵素地図を示す。

30

プロテアーゼPFUSをコードする遺伝子のオープン・リーディング・フレーム部分の塩基配列を配列表の配列番号15に、また、該塩基配列から推定されるプロテアーゼPFUSのアミノ酸配列を配列表の配列番号16に示す

40

上記のBacillus subtilis DB104/pSNP1を培養し、培養液上清、および菌体抽出物についてプロテアーゼ活性を調べると、どちらにも耐熱性のプロテアーゼ活性が認められる。すなわち、発現されたプロテアーゼPFUSの一部は培養液上清中に分泌されている。

該形質転換体培養物より得られるプロテアーゼの主な性質は以下のとおりである。

(1) 作用：

カゼイン、ゼラチンを分解し、短鎖ポリペプチドを生成する。

スクシニル-L-ロイシル-L-ロイシル-L-バリル-L-チロシン-4-メチルクマリン-7-アミド (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA) を加水分解し蛍光物質 (7-アミノ-4-メチルクマリン) を生成する。

スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニルアラニン-p-

50

ニトロアニリド (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA) を加水分解し黄色物質 (p-ニトロアニリン) を生成する。

(2) 至適温度:

40~110°Cで酵素活性を示し、その至適温度は80~95°Cである。

(3) 至適pH:

pH5~10の間で酵素活性を示し、その至適pHはpH6~8である。

(4) 熱安定性:

95°C、8時間の処理後も90%以上の酵素活性を保持している。

(5) pH安定性

pH5~11、95°C、60分間の処理後も95%以上の活性を保持している。

10

(6) 分子量

SDS-PAGE上で約45kDaの分子量を示す。

プロテアーゼTCES遺伝子およびプロテアーゼPFUS遺伝子の場合と同様の方法により、これらの遺伝子に相同性を有するプロテアーゼ遺伝子をピロコッカス・フリオサス、サーモコッカス・セラー以外の超好熱菌より取得することができる。

配列表の配列番号6に示されたプロテアーゼPFULのアミノ酸配列の323番目の残基から650番目の残基までの配列をコードする約1kbのDNA断片を調製し、これをプローブとしてスタフィロサーマス・マリナス (*Staphylothermus marinus*) DSM3639およびサーモバクテロイデス・プロテオリティカス (*Thermobacteroides proteoliticus*) DSM5265の染色体DNAを用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行うことができる。その結果、Pst I (宝酒造社製) で消化したスタフィロサーマス・マリナス染色体DNAを用いた場合には約4.8kbの位置に、また、Xba Iで消化したサーモバクテロイデス・プロテオリティカス染色体DNAでは約3.5kbの位置にシグナルが認められる。

20

これより、スタフィロサーマス・マリナスおよびサーモバクテロイデス・プロテオリティカスの染色体DNAにもプロテアーゼPFUL、プロテアーゼPFUS、およびプロテアーゼTCES等の遺伝子と相同性のある配列が存在することが明らかになった。こうして検出されたDNA断片より、プロテアーゼTCES、およびプロテアーゼPFUSをコードする遺伝子を単離、同定したときと同様の方法を用いることによって、スタフィロサーマス・マリナスおよびサーモバクテロイデス・プロテオリティカスに存在する超耐熱性プロテアーゼをコードする遺伝子を単離、同定することができる。

30

一般に、遺伝子工学的な手法でタンパクを大量に調製しようとする場合には、目的のタンパクをコードする遺伝子自身が備えているプロモーターではなく、宿主において効果的に作用するプロモーターを使用することが有利と考えられる。この点で、プロテアーゼTCES、PFUSの発現系構築において使用されたP43プロモーターはバチルス・サブチリス由来のプロモーターであるが、これら2種のプロテアーゼの発現には十分な効果を示さなかった。

そこで、さらに発現量を向上させるためにはバチルス・サブチリスで高発現される遺伝子、特に分泌タンパクの遺伝子を利用することが考えられる。このような遺伝子としては、 $\alpha$ -アミラーゼや種々の菌体外プロテアーゼの遺伝子等が使用でき、例えば、サブチリシンのプロモーターとシグナルペプチドを利用してプロテアーゼPFUSの発現量を増加させることが期待される。

40

すなわち、プロモーター領域を含むサブチリシン遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域の後にプロテアーゼPFUS遺伝子全長を両遺伝子の翻訳のフレームが一致するように連結することにより、サブチリシン遺伝子のプロモーターの制御下に融合タンパクとしてプロテアーゼPFUSを発現させることができる。

本発明に使用されるサブチリシン遺伝子としては、例えば、サブチリシンEをコードする遺伝子が使用できる。サブチリシンEのプロモーターとシグナルペプチドはジャーナル・オブ・バクテリオロジー (*J.Bacteriol.*) 第171巻、第2657~2665頁 (1989) に記載のプラスミドpKWZに挿入されているサブチリシン遺伝子のものを使用することができる。該遺伝子の塩基配列は、プロモーター配列を含む5'上流領域については上記の文献に、また、

50

サブチリシンをコードする領域についてはジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.) 第158巻、第411~418頁 (1984) にそれぞれ記載されている。

これらの配列をもとに、該遺伝子のプロモーター配列上流にEcoR Iサイトを導入するためのプライマーSUB4と、サブチリシンEのシグナルペプチドをコードする領域の後ろにBamH Iサイトを導入するためのプライマーBmR1をそれぞれ合成する。配列表の配列番号17および18にそれぞれプライマーSUB4、BmR1の塩基配列を示す。プライマーSUB4、BmR1を用い、プラスミドpKWZを鋳型としたPCRによってサブチリシンE遺伝子のプロモーターおよびシグナルペプチドをコードする領域を含む約0.3kbのDNA断片を増幅することができる。

該DNA断片の下流に接続されるプロテアーゼPFUS遺伝子は、PCR法によってピロコッカス・フリオサスの染色体DNAより取得することができる。該遺伝子の5'側にハイブリダイズするプライマーとしては上記のプライマーNPF-4が使用できる。また、3'側にハイブリダイズするプライマーには、該遺伝子の終止コドン下流の塩基配列から設計され、かつSph Iサイトを有するプライマーNPM-1を使用することができる。配列表の配列番号19にプライマーNPM-1の配列を示す。

一方、BamH Iサイトを利用してプロテアーゼPFUS遺伝子を上記の0.3kbDNA断片に接続する場合には、該遺伝子中に1箇所存在するBamH Iサイトが操作の支障となる。このBamH IサイトをPCR-変異導入 (mutagenesis) 法によって除くためのプライマーmutRR、mutFRは配列表の配列番号15に示されるプロテアーゼPFUS遺伝子の塩基配列をもとに作製することができる。プライマーmutRR、mutFRの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号20、21に示す。なお、これらのプライマーを用いてBamH Iサイトを除去した場合には、該サイトに導入される塩基置換のためにそこにコードされるアミノ酸、すなわち、配列表の配列番号16に示されるプロテアーゼPFUSのアミノ酸配列中、560番目に存在するグリシンがバリンに置換される。

これらのプライマーを使用することにより、サブチリシンE遺伝子のプロモーターおよびシグナルペプチドをコードする領域に接続するためのプロテアーゼPFUS遺伝子を得ることができる。すなわち、ピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを鋳型とし、プライマーmutRRとNPF-4、およびプライマーmutFRとNPM-1の2通りのプライマー対と、鋳型としてピロコッカス・フリオサスの染色体DNAとを使用する2種類のPCRを行う。さらに、各々のPCRで増幅されたDNA断片を混合して形成されるヘテロ・デュプレックス (heteroduplex) を鋳型とし、プライマーNPF-4およびNPM-1を用いて2回目のPCRを行う。こうして、その内部にBamH Iサイトを含まない約2.4kbのプロテアーゼPFUS遺伝子全長を増幅することができる。

上記のPCR増幅DNA断片をBamH I、Sph Iで消化して得られる約2.4kbのDNA断片を単離し、上記プラスミドpSNP1中のプロテアーゼPFUS遺伝子を含むBamH I-Sph I断片と置き換える。このようにして構築された発現プラスミドはプラスミドpPS1と命名され、該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104はBacillus subtilis DB104/pPS1と命名されている。該形質転換体を培養した場合、培養液上清、および菌体抽出物の両方にプラスミドpSNP1を使用した場合と同様のプロテアーゼ活性が見い出され、上記のアミノ酸置換が酵素活性に影響を与えていないことが確認される。図7に、プラスミドpPS1の制限酵素地図を示す。

上記のサブチリシンEのプロモーターおよびシグナルペプチドをコードする領域を含む約0.3kbのDNA断片をEcoR I、BamH Iで消化し、上記プラスミドpPS1中のP43プロモーターとリボソーム結合部位配列を含むEcoR I-BamH I断片と置き換える。このようにして構築された発現プラスミドはpNAPS1と命名され、該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104はBacillus subtilis DB104/pNAPS1と命名されている。該形質転換体を培養し、培養液上清および菌体抽出物についてプロテアーゼ活性を調べると、どちらにも耐熱性のプロテアーゼ活性が認められ、その発現量はBacillus subtilis DB104/pSNP1に比べて増加している。図8にプラスミドpNAPS1の制限酵素地図を示す。

該形質転換体の発現するプロテアーゼは、上記のBacillus subtilis DB104/pSNP1の発現するものと同等の酵素化学的性質を示す。また該形質転換体の発現するプロテアーゼを精

10

20

30

40

50

Bacillus subtilis DB104/pNAPS1が生産するプロテアーゼの量はBacillus subtilis DB104/pSNP1 (FERM BP-5634)と比較して増加しているが、さらに生産量をあげることが望まれる。pNAPS1にはサブチリシンのシグナルペプチドとプロテアーゼPFUSの融合ペプチドがコードされているが、この接続部分を改変し、シグナルペプチドの除去が効率よく起こるようにすることによりプロテアーゼの発現量が増加することが期待される。上記のプラスミドpNAPS1においては、配列表の配列番号3に示されるサブチリシンEのシグナルペプチドのC末端アミノ酸(Ala)とプロテアーゼPFUSのN末端アミノ酸(Met)との間にはAla-Gly-Serの3アミノ酸からなるペプチドが挿入されている。プラスミドpNAPS1上のこのペプチドをコードする部分のDNAに変異を導入し、得られる変異プラスミドを導入した形質転換体についてプロテアーゼ生産能を調べることにより、プロテアーゼ発現量の向上した形質転換体を得ることができる。

つぎに、こうして得られた変異プラスミドを適当な宿主、例えば、バチルス・サブチリス DB104に導入して得られる形質転換体についてそのプロテアーゼ発現量を調べることにより、発現量の上昇した形質転換体を取得することができる。プロテアーゼ発現量の確認は、単離された形質転換体を個別に培養してその培養物中の活性を調べることによって行うことができるが、基質を含有する寒天プレートで培養に用いることにより、発現量の上昇した形質転換体を容易に選択することが可能になる。

こうして得られた、*Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1に比較してプロテアーゼ活性を高発現する形質転換体のひとつは*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124と命名されている。該形質転換体よりそこに含有されるプラスミド（該プラスミドはpSP0124と命名されている）を調製し、その塩基配列を解析した結果、上記のSerをコードする部分は塩基配列GGGAATに変異しており、したがって、SerがGly-Asnに変異したタンパクがコードされていることが明らかとなった。

10

20

30

40

50

uefacience) 由来のサブチリシンBPN' [ヌクレイック アシッド リサーチ (Nucl. Acids Res.) 第11巻、第7911~7925頁 (1983)]、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus lichniformis*) 由来のサブチリシンCarlsberg [ヌクレイック アシッド リサーチ (Nucl. Acids Res.) 第13巻、第8913~8926頁 (1985)] 等が知られており、そのアミノ酸配列には若干の相違があるがこれらのシグナルペプチドも本発明に好適に使用できる。また、本発明においては発現を制御するためのプロモーターとして、サブチリシンE由来のプロモーターが使用されたが、これにかえてバチルス属細菌で作用する種々のプロモーターを使用することが可能である。

また、発現させるタンパクについても何ら制限はなく、遺伝子を入手可能なものであれば本発明を適用して遺伝子工学的に高発現させることが可能である。本発明が宿主以外の生物に由来するタンパクの発現に利用可能なことは、バチルス属細菌とは分類学上の位置を異にするピロコッカス・フリオサス由来のタンパクが高発現されていることから明らかである。本発明は、特に上記のプロテアーゼPFUSと構造的に類似しているプロテアーゼPFUL、プロテアーゼTCESやスタフィロサーマス・マリナス、サーモバクテロイデス・プロテオリティカス由来のプロテアーゼの遺伝子工学的生産に好適である。

プロテアーゼPFUSはサブチリシンとの相同性から考えてシグナルペプチドとプロペプチドとを有する前駆体タンパクとして発現され、その後プロセッシングを受けて成熟型酵素になると考えられており、また、上記のプロテアーゼPFUS成熟型酵素のN末端アミノ酸配列解析の結果より、成熟型酵素は配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる酵素であると予想される。しかしながら、精製された成熟型プロテアーゼPFUSの分子量は約45 kDaであり、このアミノ酸配列から計算されるものに比べて小さい。このことは前駆体として発現されたプロテアーゼPFUSが、そのC末端側のペプチドもプロセッシングを受けて成熟型プロテアーゼに転換されていることを示唆している。

このプロセッシングによって除去されるC末端側ペプチドが酵素活性、および酵素タンパクの正しい構造へのフォールディングに必須でなければ、遺伝子上のこの部分をコードする領域を欠失させて発現させることによってもプロテアーゼPFUSの発現量の増加が期待される。

上記の*Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1より得られる成熟型プロテアーゼPFUSについて、例えば質量分析装置を用いてその分子量を精密に測定することができる。この分子量と、先に明らかにされた成熟型プロテアーゼPFUSのN末端アミノ酸配列より、該プロテアーゼが配列表の配列番号15に示されるアミノ酸配列の133番目のAlaから552番目のThrまでに対応するポリペプチドであることがわかる。さらに、上記のプラスミドpNAPS1に含まれるプロテアーゼPFUS遺伝子の552番目のThrをコードする部位の近傍に終止コドンを導入することにより、酵素活性には不必要なポリペプチドを欠失したプロテアーゼPFUSを発現するプラスミドを構築することができる。すなわち、プラスミドpNAPS1上のプロテアーゼPFUS遺伝子のうち、その開始コドンから544番目のアミノ酸 (Ser) をコードするコドンのC末端側に終止コドン (TGA) を導入することができるプライマーNPR544 (配列表の配列番号28にプライマーNPR544の塩基配列を示す) と、上記遺伝子上のNsp Vサイトの上流領域の塩基配列を有するプライマーNPFE81 (配列表の配列番号29にプライマーNPFE81の塩基配列を示す) とを使用したPCRにより、目的の終止コドンが導入された塩基配列を有するDNA断片を得ることができる。つぎに、この断片をプラスミドpNAPS1上の対応する領域と置き換えることによって目的の変異を導入されたプロテアーゼ遺伝子を含有する変異プラスミドを得ることができる。該プラスミドはプラスミドpNAPSΔCと命名され、また該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104は*Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔCと命名されている。

該形質転換体はプロテアーゼPFUSと同等の性質を有するプロテアーゼ活性を発現し、その発現量は*Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1に比較して高い。

こうして、プラスミドpNAPSΔCに含有されるプロテアーゼPFUS遺伝子が、該酵素の活性の発現に十分な領域を有していることが明らかとなった。該プラスミド上に存在するプロテアーゼPFUSをコードする領域の塩基配列を配列表の配列番号2に示す。また、該塩基配

10

20

30

40

50

列にコードされるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

さらに、上記のプラスミドpSP0124上のプロテアーゼPFUS遺伝子について、プラスミドpNAPSΔCと同様の変異を導入し、C末端側ペプチドを欠失させたプロテアーゼPFUSを発現させることができる。

すなわち、上記のプラスミドpNAPSΔCをNsp IとSph Iで消化して得られる約13kbのDNA断片を、予めNsp VとSph Iで消化したプラスミドpSP0124と混合してライゲーションを行うことにより、目的とするプラスミドを構築することができる。該プラスミドはプラスミドpSP0124ΔCと命名され、また該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104はBacillus subtilis DB104/pSP0124ΔCと命名、表示され、平成9年5月16日（原寄託日）より、ブダペスト条約の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の、通産省工業技術生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-6294として寄託されている。該形質転換体はBacillus subtilis DB104/pNAPS1に比較してプロテアーゼの発現量が向上している。

10

上記の形質転換体、Bacillus subtilis DB104/pNAPSΔCおよびBacillus subtilis DB104/pSP0124ΔCの生産するプロテアーゼの酵素学的、理化学的性質は、Bacillus subtilis DB104/pSNP1の生産するプロテアーゼのものと差は見られない。すなわちこれらの両形質転換体培養より得られるプロテアーゼの主な性質は以下のとおりである。

（1）作用：

カゼイン、ゼラチンを分解し、短鎖ポリペプチドを生成する。

スクシニル-L-ロイシル-L-ロイシル-L-バリル-L-チロシン-4-メチルクマリン-7-アミド（Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA）を加水分解し蛍光物質（7-アミノ-4-メチルクマリル）を生成する。

20

スクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド（Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA）を加水分解し黄色物質（p-ニトロアニリン）を生成する。

（2）至適温度：

40～110℃で酵素活性を示し、その至適温度は80～95℃である。

（3）至適pH：

pH5～10の間で酵素活性を示し、その至適pHはpH6～8である。

（4）熱安定性：

95℃、8時間の処理後も90%以上の酵素活性を保持している。

30

（5）pH安定性

pH5～11、95℃、60分間の処理後も95%以上の活性を保持している。

（6）分子量

SDS-PAGE上で約45kDaの分子量を示す。

こうして、高い熱安定性を有するプロテアーゼおよびその遺伝子が提供される。また、該プロテアーゼの大量発現を可能にする新規のタンパク発現系も本発明により開示される。該発現系は、本発明のプロテアーゼの他、種々のタンパクの遺伝子工学的な製造において有用である。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

40

実施例1

（1）ピロコッカス・フリオサスの染色体DNAの調製

ピロコッカス・フリオサスDSM3638の培養は以下のとおりに行った。

1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%可溶性デンプン、3.5%ジャマリンS・ソリッド（ジャマリンラボラトリー社製）、0.5%ジャマリンS・リキッド（ジャマリンラボラトリー社製）、0.003%MgSO<sub>4</sub>、0.001%NaCl、0.0001%FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.0001%CoSO<sub>4</sub>、0.0001%CaCl<sub>2</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.0001%ZnSO<sub>4</sub>、0.1ppm CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、0.1ppm H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.1ppm KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>・12H<sub>2</sub>O、0.25ppm NiCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oの組成の培地を2リットル容のメディウムボトルに入れ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込んで溶存酸素を除去し

50

た後、これに上記菌株を接種して95℃、16時間静置培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集めた。

つぎに、得られた菌体を25%スクロースを含む50mMトリス-HCl (pH8.0) 4mlに懸濁し、この懸濁液に2mlの0.2M EDTA、0.8mlのリゾチーム (5mg/ml) を加えて20℃、1時間保温した後、24mlのSET溶液 (150mM NaCl、1mM EDTA、20mMトリス-HCl、pH8.0)、4mlの5% SDS、400μlのプロテイナーゼK (10mg/ml) を加え、さらに37℃、1時間保温した。フェノールクロロホルム抽出を行って反応を停止した後、エタノール沈殿を行って約3.2mgの染色体DNAを得た。

## 実施例 2

### (1) プラスミドpNSP1の構築のためのプライマーの合成

10

プロテアーゼPFUS遺伝子全長の増幅に使用するためのプライマーを合成するために、該遺伝子全長を含むプラスミドpSNP1を*Bacillus subtilis* DB104/pSNP1 (FERM BP-5634) より単離し、必要な領域の塩基配列を決定した。この塩基配列をもとに、プロテアーゼPFUS遺伝子の開始コドンの直前にBamH Iサイトを導入するためのプライマーNPF-4、および該遺伝子の3'側にハイブリダイズし、Sph Iの認識配列を含むプライマーNPM-1を合成した。配列表の配列番号13、19にそれぞれプライマーNPF-4、プライマーNPM-1の塩基配列を示す。

また、プロテアーゼPFUS遺伝子の内部、開始コドンから約1.7kb下流に存在するBamH Iサイトを除くためのプライマーmutRR、mutFRを合成した。配列表の配列番号20、21にそれぞれプライマーmutRR、mutFRの塩基配列を示す。

20

### (2) プラスミドpPS1の調製

鋳型としてピロコッカス・フリオサスの染色体DNAを、またプライマーとして上記プライマーNPF-4とmutRRの組合せ、あるいはプライマーmutFRとNPM-1の組合せを含む2組のLA-PCR反応液を調製し、それぞれ94℃、30秒～55℃、1分～68℃、3分を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。LA-PCR反応液の調製にはLA PCR Kit Ver.2 (宝酒造社製) を使用した。この反応液の一部を用いてアガロース電気泳動を行うと、プライマーNPF-4およびmutRRを用いた場合は約1.8kbの、プライマーmutFRおよびNPM-1を用いた場合は約0.6kbのDNA断片が増幅した。

上記の2種類のPCR反応液よりSUPREC-02 (宝酒造社製) を用いてプライマーが除去された増幅DNA断片を調製した。これらの両増幅DNA断片を含み、プライマー、およびLA Taq は含まないLA-PCR反応液を調製して94℃、10分間の熱変性を行い、30分かけて30℃まで冷却した後、30℃で15分間保温してヘテロ・デュプレックス (hetero duplex) を形成させた。つぎに、この反応液にLA Taq (宝酒造社製) を添加して72℃で3分間反応させた後、さらにプライマーNPF-4、NPM-1を添加して94℃、30秒～55℃、1分～68℃、3分を1サイクルとして25サイクルの反応を行った。この反応液中には約2.4kbのDNA断片の増幅が見られた。

30

上記約2.4kbのDNA断片をBamH I、Sph I (ともに宝酒造社製) で消化し、この断片を予めBamH I、Sph Iで消化してプロテアーゼPFUS遺伝子全長を除去したプラスミドpSNP1と混合してライゲーションを行った後、バチルス・サブチリスDB104に導入した。得られたカナマイシン耐性の形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の約2.4kb断片1分子のみが挿入されたプラスミドを選び、これをプラスミドpPS1と命名した。また、該プラスミドpPS1で形質転換されたバチルス・サブチリスDB104を*Bacillus subtilis* DB104/pPS1と命名した。

40

図7にプラスミドpPS1の制限酵素地図を示す。

### (3) サブチリシンE遺伝子のプロモーター～シグナルペプチド領域のDNA断片の増幅

サブチリシンE遺伝子のプロモーター～シグナルペプチド領域を得るためのプライマーを合成した。まず、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J.Bacteriol.) 第171巻、第2657～2665頁 (1989) に記載のサブチリシンE遺伝子のプロモーター領域部分の塩基配列を参考に、該領域の上流にハイブリダイズし、EcoR Iサイトを含むプライマーSUB4 (配列表の配列番号17にプライマーSUB4の塩基配列を示す) を合成した。次にジャーナル・オブ・

50

バクテリオロジー (J.Bacteriol.) 第158巻、第411~418頁 (1984) に記載のサブチリシンE遺伝子の塩基配列を参考に、シグナルペプチドの直後にBamH Iサイトを導入できるプライマーBmR1 (配列表の配列番号18にプライマーBmR Iの塩基配列を示す) を合成した。ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J.Bacteriol.) 第171巻、第2657~2665頁 (1989) に記載のサブチリシンE遺伝子を含むプラスミドpKWZを鋳型とし、上記のプライマーSUB4、BmR1を含むPCR反応液を調製し、94℃、30秒~55℃、1分~68℃、2分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。この反応液の一部を用いてアガロース電気泳動を行うと、約0.3kbのDNA断片が増幅していることが確認された。

#### (4) プロテアーゼ発現プラスミドpNAPS1の構築

上記約0.3kbのDNA断片をEcoR I (宝酒造社製)、BamH Iで消化した後、予めEcoR I、BamH Iで消化した実施例3に記載のプラスミドpPS1と混合してライゲーションした後、バチルス・サブチリスDB104に導入した。得られたカナマイシン耐性の形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の約0.3kb断片1分子のみが挿入されたプラスミドを選び、これをプラスミドpNAPS1と命名した。また、該プラスミドpNAPS1で形質転換されたバチルス・サブチリスDB104をBacillus subtilis DB104/pNAPS1と命名した。

図8にプラスミドpNAPS1の制限酵素地図を示す。

#### (5) プラスミドpSNP2の構築

上記のプラスミドpNAPS1中に存在するサブチリシンEのシグナルペプチドをコードする領域の上流にBamH Iサイトを導入するためのプライマーSUB17R (配列表の配列番号23にプライマーSUB17Rの塩基配列を示す) を合成した。該プライマーと上記のプライマーSUB4、および鋳型としてプラスミドpNAPS1を含むPCR反応液を調製し、94℃、30秒~55℃、1分~72℃、1分を1サイクルとする25サイクルの反応を行った。増幅した約0.21kbのDNA断片をEcoR IとBamH Iで消化し、サブチリシンEのプロモーターとSD配列を含む約0.2kbのDNA断片を得た。この断片を、予めEcoR IとBamH Iで消化したプラスミドpNAPS1と混合してライゲーションした反応液を用いて、バチルス・サブチリスDB104を形質転換した。得られたカナマイシン耐性の形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の約0.2kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを選び、これをプラスミドpSNP2と命名した。

#### (6) プロテアーゼを高発現する変異プラスミドの作製

上記のプラスミドpNAPS1中のサブチリシンEのシグナルペプチドとプロテアーゼPFUSの開始コドンとの結合部のアミノ酸のSer (塩基配列TCC) を任意の2つのアミノ酸に置き換えるためのプライマーSPOF0とSPOR0 (配列表の配列番号24および25にそれぞれプライマーSPOF0とSPOR0の塩基配列を示す) を合成した。また、プラスミドpNAPS1中のサブチリシンEのシグナルペプチドをコードする領域の直前にBamH Iサイトを導入するためのプライマーSUB3、およびプロテアーゼPFUSをコードする領域内のSpe Iサイトを含むプライマーNPR-10 (配列表の配列番号26および27にプライマーSUB3およびプライマーNPR-10の塩基配列を示す) を合成した。

プラスミドpNAPS1を鋳型として、上記プライマーSPOF0とNPR-10とを含むPCR反応液及び上記プライマーSUB3とSPOR0とを含むPCR反応液を調製し、94℃、30秒~50℃、1分~72℃、1分を1サイクルとする20サイクルの反応を行った。両反応液で増幅したそれぞれ約0.13kbと約0.35kbのDNA断片を混合して94℃で10分間熱変性させた後、37℃まで徐冷してヘテロ・デュープレックスを形成させ、さらにTaqポリメラーゼ (宝酒造社製) によってこのヘテロ・デュープレックスから2本鎖DNAを作製した。こうして得られた2本鎖DNAを鋳型とし、上記のプライマーSUB3、プライマーNPR-10を含むPCR反応液を調製し、94℃、30秒~50℃、1分~72℃、1分を1サイクルとする25サイクルの反応を行った。増幅した約0.43kbのDNA断片をBamH IとSpe I (宝酒造社製) で消化して得たDNA断片を、予めBamH IとSpe Iで消化した上記のプラスミドpSNP2と混合してライゲーションを行い、この反応液を用いてバチルス・サブチリスDB104を形質転換した。

得られたカナマイシン耐性の形質転換体をスキムミルクプレート (10 µg/mlカナマイシン、1%スキムミルクを含むLB-高温培養用寒天培地) 上に接種してコロニーを形成させた後、このプレートを70℃で保温し、コロニー周辺のスキムミルクの分解の状態から各形成

10

20

30

40

50

転換体の発現するプロテアーゼ活性を調べた。その結果、特に高い活性が検出された1クローンを単離してこれよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpSP0124と命名した。また、該プラスミドで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104を*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124と命名した。プラスミドpSP0124についてその塩基配列を解析したところ、プラスミドpNAPS1において上記のSerをコードしていた部分の塩基配列はGGGAATに置換されており、SerがGly-Asnの2アミノ酸に変異したタンパクがコードされていた。また、この変異と同時にプロテアーゼPFUSの開始コドンから25番目に存在するProに対応するコドン(CCA)がLeuをコードするもの(CTA)に変化していることが判明した。

#### (7) プロテアーゼ発現プラスミドpNAPSΔCの構築

上記のプラスミドpNAPS1中のプロテアーゼPFUS遺伝子の開始コドンから544番目のアミノ酸のC末端側に終始コドンを導入し、この部位以降を欠失したプロテアーゼを発現するプラスミドを構築した。上記遺伝子上の544番目のアミノ酸をコードするコドンのC末端側に終止コドン(塩基配列TGA)を導入し、かつSph Iサイトを有するプライマーNPR544(配列表の配列番号28にプライマーNPR544の塩基配列を示す)を合成した。さらに、上記遺伝子上のNsp Vサイトの上流部分の塩基配列をもとに、プライマーNPFE81(配列表の配列番号29にプライマーNPFE81の塩基配列を示す)を合成した。

プラスミドpNAPS1を鋳型として、上記プライマーNPFE81とNPR544を含むPCR反応液を調製し、94℃、30秒～50℃、1分～72℃、1分を1サイクルとする20サイクルの反応を行った。増幅した約0.61kbのDNA断片をNsp V(宝酒造社製)とSph Iで消化し、終止コドンを含む約0.13kbのDNA断片を得た。このDNA断片を、予め制限酵素Nsp VとSph Iで消化したプラスミドpNAPS1と混合してライゲーションを行い、この反応液を用いて、バチルス・サブチリスDB104を形質転換した。得られたカナマイシン耐性の形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の約0.13kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを選び、これをプラスミドpNAPSΔCと命名した。さらに、このプラスミドpNAPSΔCで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104を*Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔCと命名した。

#### (8) プロテアーゼ発現プラスミドpSP0124ΔCの構築

上記プラスミドpNAPSΔCをNsp VとSph Iで消化して得られる約1.3kbのDNA断片を単離し、これを予めNsp VとSph Iで消化したプラスミドpSP0124と混合してライゲーションを行った。この反応液を用いて、バチルス・サブチリスDB104を形質転換した。得られたカナマイシン耐性の形質転換体よりプラスミドを調製し、上記の約1.3kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを選び、これをプラスミドpSP0124ΔCと命名した。さらに、このプラスミドpSP0124ΔCで形質転換されたバチルス・サブチリスDB104を*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124ΔCと命名した。

#### 実施例 3

##### (1) プロテアーゼPFUS遺伝子を含むプラスミドで形質転換したバチルス・サブチリスの培養と粗酵素液の調製

実施例2で得られた、プロテアーゼPFUS遺伝子を含むプラスミドpNAPS1を導入したバチルス・サブチリスDB104、*Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1を10μg/mlのカナマイシンを含むLB培地(トリプトン10g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaCl5g/リットル、pH7.2)2ml中、37℃で、24時間培養した。培養液は遠心分離して培養液上清(標品1-S)と菌体とを得た。

得られた菌体は100μlの50mMトリス-HCl、pH7.5に懸濁し、2mgのリゾチーム(シグマ社製)を加えた後に、37℃で45分間消化した。消化後の試料をさらに95℃で10分間加熱処理した後、遠心分離して上清を集め、無細胞抽出液(標品1-L)とした。

また、上記のプラスミドpSP0124を含む*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124、上記のプラスミドpNAPSΔCを含む*Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔC、あるいはpSP0124ΔCを含む*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124ΔCより、上記同様の操作で培養液上清、無細胞抽出液を調製した。*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124の培養液上清を124-S、細胞抽出液を124-Lと命名した。*Bacillus subtilis* DB104/pNAPSΔCの培養液上清をΔC-S、無細胞抽出液をΔC-Lと命名した。*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124ΔCの培

10

20

30

40

50

養液上清を124ΔC-S、無細胞抽出液を124ΔC-Lと命名した。これらの標品を用いて、プロテアーゼ活性を測定し、各標品中に含まれるプロテアーゼ濃度を調べた。

#### (2) プロテアーゼ生産能の比較

プロテアーゼPFUSの活性測定はSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA（シグマ社製）を基質とし、酵素による加水分解反応によって生成するp-ニトロアニリンを分光学的に測定する事により行なった。すなわち、酵素活性を測定しようとする酵素標品を適度に希釈し、その試料溶液50μlに1m Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA溶液（100mMリン酸緩衝液、pH7.0）50μlを加え、95℃で30分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、405nmにおける吸光度を測定し、p-ニトロアニリンの生成量を求めた。酵素1単位は、95℃において1分間に1μmoleのp-ニトロアニリンを生成する酵素量とした。さらに、得られた酵

素活性をもとに培養液上清および菌体内に発現された酵素タンパク量を、プロテアーゼPFUSの蛋白質重量当たりの比活性を9.5単位/mgとして算出した。実施例3-(1)で調製した各酵素標品のプロテアーゼ活性を測定し、その測定結果から算出した各形質転換体培養液1リットルあたりのプロテアーゼPFUS生産量を表1に示す。Bucillus subtilis DB104/pSP0124ではBucillus subtilis DB104/pNAPS1と比較して菌体内のプロテアーゼPFUS生産量が3.6倍に増加した。また、Bucillus subtilis DB104/pNAPSΔCでは培養液上清で2.4倍、菌体内で2.2倍のプロテアーゼPFUS生産量の増加が見られた。さらに、Bucillus subtilis DB104/pSP0124ΔCでも培養液上清で2倍、菌体内で2.4倍にプロテアーゼPFUS生産量が増加していた。、さらに、菌体当たりの生産量も増加した。培養液上清、菌体内のプロテアーゼPFUS生産量の合計値をBucillus subtilis DB104/pNAPS1での値と比較すると、Bucillus subtilis DB104/pSP0124で2.1倍、Bucillus subtilis DB104/pNAPSΔCで2.1倍、Bucillus subtilis DB104/pSP0124ΔCで2.2倍にそれぞれ増加した。

表1

プロテアーゼPFUSの生産量（培養液1リットルあたり、単位 mg）

| 形質転換体（プラスミド） | 培養液上清 | 菌体   | 培養液+菌体 |
|--------------|-------|------|--------|
| pNAPS1       | 15.1  | 12.5 | 27.6   |
| pSP0124      | 13.1  | 45.4 | 58.5   |
| pNAPSΔC      | 35.5  | 28.1 | 63.6   |
| pSP0124ΔC    | 30.5  | 30.1 | 60.6   |

#### 実施例4

##### (1) 成熟型プロテアーゼPFUSの精製酵素標品の調製

実施例2で得られた本発明の超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を導入されたバチルス・サブチリスDB104、Bucillus subtilis DB104/pNAPS1およびBucillus subtilis DB104/pSP0124ΔCを、それぞれ10μg/mlのカナマイシンを含むLB倍地5mlを含む試験管に接種し、37℃で7時間振とう培養した。10μg/mlのカナマイシンを含むTM倍地（大豆粉5g/リットル、ポリペプトン10g/リットル、肉エキス5g/リットル、酵母エキス2g/リットル、グルコース10g/リットル、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 10mg/リットル、MnSO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O 10mg/リットル、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1mg/リットル、pH7.0）500mlを5リットル容の三角フラスコに準備し、上記培養液を5ml接

種して30℃で3日間振とう培養した。得られた培養液を超音波処理後、95℃で30分間加熱処理し、遠心分離後上清を回収した。上清に25%飽和となるように硫酸アンモニウムを加えた後、遠心分離を行って得られる上清を、25%飽和の硫酸アンモニウムを含む25mMトリスー塩酸緩衝液 (pH7.6) で平衡化したマクロプレップ メチルHIC (Macro-Prep Methyl HIC、バイオラッド社製) カラムにアプライした。同じ緩衝液でゲルを洗浄後、40%エタノールを含む25mMトリスー塩酸緩衝液 (pH7.6) を用いたステップワイズ溶出により、カラムに吸着したプロテアーゼPFUSを溶出させた。こうして得られたプロテアーゼPFUSを含む画分を20%アセトニトリルを含む0.05%トリフルオロ酢酸で平衡化したNAP-25カラム (ファルマシア社製) を用いたゲルろ過に供し、プロテアーゼPFUSを変性させるとともに脱塩を行い、精製プロテアーゼPFUS標品を得た。なお、*Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1 10より得られた標品をNAPS-1、また*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124Δ Cより得られた標品をSP0-124Δ Cとそれぞれ命名した。

0.1% SDS-10% ポリアクリルアミドゲルを用いて上記の両精製酵素標品の電気泳動を行い、クーマシー・ブリリアントブルー R-250で染色をおこなうと、精製酵素標品NAPS-1、SP0-124Δ Cはどちらも単一のバンドを示し、推定分子量はともに約45kDaであった。

#### (2) 成熟型のプロテアーゼPFUSのN末端アミノ酸配列分析

G1000Aプロテインシーケンサー (ヒューレット・パカード社製) を用いた自動エドマン法により精製酵素標品NAPS-1、SP0-124Δ CのN末端アミノ酸配列分析を行った。これらの2種の精製酵素標品のN末端アミノ酸配列は、ともに配列表の配列番号22に示したものであった。該配列は配列表の配列番号15に示されたプロテアーゼPFUSのアミノ酸配列の 20133番目から144番目の配列に一致しており、NAPS-1、SP0-124Δ Cのどちらもこの部分以降のポリペプチドから成る酵素であることが示された。

#### (3) 成熟型のプロテアーゼPFUSの質量分析

API300四重極三連質量分析装置 (パーキナーエルマー・サイエックス社製) を用いて精製酵素標品NAPS-1、SP0-124Δ Cの質量分析を行った。NAPS-1の分子量は43,744Daと推定されたことにより、*Bacillus subtilis* DB104/pNAPS1の生産する成熟型のプロテアーゼPFUSは配列表の配列番号15に示されたプロテアーゼPFUSのアミノ酸配列の133番目のAlaから552番目のThrまでのポリペプチドからなる酵素であることが示された。また、SP0-124Δ Cの分子量は42,906Daと推定されたことより、*Bacillus subtilis* DB104/pSP0124Δ Cの生産する成熟型のプロテアーゼPFUSは配列表の配列番号15に示されたプロテアーゼPFUS 30のアミノ酸配列の133番目のAlaから544番目のSerまでのポリペプチド、すなわち配列表の配列番号2に示されたアミノ酸配列からなる酵素であることが示された。

配列表

出願人氏名：寶酒造株式会社

発明の名称：超耐熱性プロテアーゼ発現系

整理番号：660782

出願番号：

出願日：

優先権番号：平成9年特許願第151969号

優先日：平成9年6月10日

配列の数：29

配列番号：1

配列の長さ：412

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

10

20

30

40

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Glu | Leu | Glu | Gly | Leu | Asp | Glu | Ser | Ala | Ala | Gln | Val | Met | Ala |
|     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Thr | Tyr | Val | Trp | Asn | Leu | Gly | Tyr | Asp | Gly | Ser | Gly | Ile | Thr | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Gly | Ile | Ile | Asp | Thr | Gly | Ile | Asp | Ala | Ser | His | Pro | Asp | Leu | Gln |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Gly | Lys | Val | Ile | Gly | Trp | Val | Asp | Phe | Val | Asn | Gly | Arg | Ser | Tyr |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Pro | Tyr | Asp | Asp | His | Gly | His | Gly | Thr | His | Val | Ala | Ser | Ile | Ala |
|     |     |     | 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Ala | Gly | Thr | Gly | Ala | Ala | Ser | Asn | Gly | Lys | Tyr | Lys | Gly | Met | Ala |
|     |     |     | 80  |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |

Pro Gly Ala Lys Leu Ala Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly  
 95 100 105  
 Ser Gly Ser Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gly Val Glu Trp Ala Val  
 110 115 120  
 Asp Asn Lys Asp Lys Tyr Gly Ile Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu  
 125 130 135  
 Gly Ser Ser Gln Ser Ser Asp Gly Thr Asp Ala Leu Ser Gln Ala  
 140 145 150  
 Val Asn Ala Ala Trp Asp Ala Gly Leu Val Val Val Val Ala Ala  
 155 160 165  
 Gly Asn Ser Gly Pro Asn Lys Tyr Thr Ile Gly Ser Pro Ala Ala  
 170 175 180  
 Ala Ser Lys Val Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Lys Tyr Asp Val  
 185 190 195  
 Ile Thr Ser Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly Arg Leu  
 200 205 210  
 Lys Pro Glu Val Val Ala Pro Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala Arg  
 215 220 225  
 Ala Ser Gly Thr Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr  
 230 235 240  
 Ala Ala Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile  
 245 250 255  
 Ala Ala Leu Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys  
 260 265 270  
 Val Lys Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp  
 275 280 285  
 Glu Ile Ala Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr  
 290 295 300

10

20

30

40

Lys Ala Ile Asn Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly

305

310

315

Tyr Val Ala Asn Lys Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser

320

325

330

Gly Ala Ser Phe Val Thr Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn

335

340

345

Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val

350

355

360

Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr

365

370

375

Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr Ile Lys Val Val Ser Tyr

380

385

390

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

395

400

405

Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser

410

配列番号:2

配列の長さ:1236

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

起源:ピロコッカス・フリオサス

株名:DSM3638

配列:

GCAGAATTAG AAGGACTGGA TGAGTCTGCA GCTCAAGTTA TGGCAACTTA CGTTTGGAAC 60

TTGGGATATG ATGGTTCTGG AATCACAATA GGAATAATTG ACACTGGAAT TGACGCTTCT 120

10

20

30

|                                                                   |      |    |
|-------------------------------------------------------------------|------|----|
| CATCCAGATC TCCAAGGAAA AGTAATTGGG TGGGTAGATT TTGTCAATGG TAGGAGTTAT | 180  |    |
| CCATACGATG ACCATGGACA TGGAAGTCAT GTAGCTTCAA TAGCAGCTGG TACTGGAGCA | 240  |    |
| GCAAGTAATG GCAAGTACAA GGAATGGCT CCAGGAGCTA AGCTGCCGGG AATTAAGGTT  | 300  |    |
| CTAGGTGCCG ATGGTTCTGG AAGCATATCT ACTATAATTA AGGGAGTTGA GTGGGCCGTT | 360  |    |
| GATAACAAAG ATAAGTACGG AATTAAGGTC ATTAATCTTT CTCTTGGTTC AAGCCAGAGC | 420  |    |
| TCAGATGGTA CTGACGCTCT AAGTCAGGCT GTTAATGCAG CGTGGGATGC TGGATTAGTT | 480  |    |
| GTTGTGGTTG CCGCTGGAAA CAGTGGACCT AACAAGTATA CAATCGGTTC TCCAGCAGCT | 540  | 10 |
| GCAAGCAAAG TTATTACAGT TGGAGCCGTT GACAAGTATG ATGTTATAAC AAGCTTCTCA | 600  |    |
| AGCAGAGGGC CAACTGCAGA CGGCAGGCTT AAGCCTGAGG TTGTTGCTCC AGGAACTGG  | 660  |    |
| ATAATTGCTG CCAGAGCAAG TGGAAGTAGC ATGGGTCAAC CAATTAATGA CTATTACACA | 720  |    |
| GCAGCTCCTG GGACATCAAT GGCAACTCCT CACGTAGCTG GTATTGCAGC CCTCTTGCTC | 780  |    |
| CAAGCACACC CGAGCTGGAC TCCAGACAAA GTAAAAACAG CCCTCATAGA AACTGCTGAT | 840  |    |
| ATCGTAAAGC CAGATGAAAT AGCCGATATA GCCTACGGTG CAGGTAGGGT TAATGCATAC | 900  | 20 |
| AAGGCTATAA ACTACGATAA CTATGCAAAG CTAGTGTTCA CTGGATATGT TGCCAACAAA | 960  |    |
| GGCAGCCAAA CTCACCAGTT CGTTATTAGC GGAGCTTCGT TCGTAACTGC CACATTATAC | 1020 |    |
| TGGGACAATG CCAATAGCGA CCTTGATCTT TACCTCTACG ATCCCAATGG AAACCAGGTT | 1080 |    |
| GACTACTCTT ACACCGCCTA CTATGGATTC GAAAAGGTTG GTTATTACAA CCCAACTGAT | 1140 |    |
| GGAACATGGA CAATTAAGGT TGTAAGCTAC AGCGGAAGTG CAACTATCA AGTAGATGTG  | 1200 |    |
| GTAAGTGATG GTTCCCTTTC ACAGCCTGGA AGTTCA                           | 1236 | 30 |

配列番号:3

配列の長さ:29

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr

5

10

15

40

Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala

20

25

配列番号:4

配列の長さ:522

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

50

配列の特徴:428番目のXaaはGlyかVal

配列:

Ala Glu Leu Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln Val Met Ala

5 10 15

Thr Tyr Val Trp Asn Leu Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Thr Ile

20 25 30

Gly Ile Ile Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln

35 40 45

Gly Lys Val Ile Gly Trp Val Asp Phe Val Asn Gly Arg Ser Tyr

50 55 60

Pro Tyr Asp Asp His Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile Ala

65 70 75

Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Gly Met Ala

80 85 90

Pro Gly Ala Lys Leu Ala Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly

95 100 105

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

110 115 120

10

20

|                                                             |         |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| Asp Asn Lys Asp Lys Tyr Gly Ile Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu |         |
| 125                                                         | 130 135 |
| Gly Ser Ser Gln Ser Ser Asp Gly Thr Asp Ala Leu Ser Gln Ala |         |
| 140                                                         | 145 150 |
| Val Asn Ala Ala Trp Asp Ala Gly Leu Val Val Val Val Ala Ala |         |
| 155                                                         | 160 165 |
| Gly Asn Ser Gly Pro Asn Lys Tyr Thr Ile Gly Ser Pro Ala Ala | 10      |
| 170                                                         | 175 180 |
| Ala Ser Lys Val Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Lys Tyr Asp Val |         |
| 185                                                         | 190 195 |
| Ile Thr Ser Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly Arg Leu |         |
| 200                                                         | 205 210 |
| Lys Pro Glu Val Val Ala Pro Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala Arg | 20      |
| 215                                                         | 220 225 |
| Ala Ser Gly Thr Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr |         |
| 230                                                         | 235 240 |
| Ala Ala Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile |         |
| 245                                                         | 250 255 |
| Ala Ala Leu Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys | 30      |
| 260                                                         | 265 270 |
| Val Lys Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp |         |
| 275                                                         | 280 285 |
| Glu Ile Ala Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr |         |
| 290                                                         | 295 300 |
| Lys Ala Ile Asn Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly | 40      |
| 305                                                         | 310 315 |
| Tyr Val Ala Asn Lys Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser |         |
| 320                                                         | 325 330 |

Gly Ala Ser Phe Val Thr Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn  
 335 340 345  
 Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val  
 350 355 360  
 Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr  
 365 370 375  
 Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr Ile Lys Val Val Ser Tyr  
 380 385 390  
 Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val Val Ser Asp Gly Ser  
 395 400 405  
 Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser Pro Ser Pro Gln Pro Glu Pro Thr  
 410 415 420  
 Val Asp Ala Lys Thr Phe Gln Xaa Ser Asp His Tyr Tyr Tyr Asp  
 425 430 435  
 Arg Ser Asp Thr Phe Thr Met Thr Val Asn Ser Gly Ala Thr Lys  
 440 445 450  
 Ile Thr Gly Asp Leu Val Phe Asp Thr Ser Tyr His Asp Leu Asp  
 455 460 465  
 Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gln Lys Leu Val Asp Arg Ser Glu  
 470 475 480  
 Ser Pro Asn Ser Tyr Glu His Val Glu Tyr Leu Thr Pro Ala Pro  
 485 490 495  
 Gly Thr Trp Tyr Phe Leu Val Tyr Ala Tyr Tyr Thr Tyr Gly Trp  
 500 505 510  
 Ala Tyr Tyr Glu Leu Thr Ala Lys Val Tyr Tyr Gly  
 515 520

10

20

30

40

配列番号:5

配列の長さ:4765

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

起源:ピロコッカス・フリオサス

株名:DSM3638

50

配列：

|                                                                   |      |    |
|-------------------------------------------------------------------|------|----|
| TTTAAATTAT AAGATATAAT CACTCCGAGT GATGAGTAAG ATACATCATT ACAGTCCCAA | 60   |    |
| AATGTTTATA ATTGGAACGC AGTGAATATA CAAAATGAAT ATAACCTCGG AGGTGACTGT | 120  |    |
| AGAATGAATA AGAAGGGACT TACTGTGCTA TTTATAGCGA TAATGCTCCT TTCAGTAGTT | 180  |    |
| CCAGTGCACT TTGTGTCCGC AGAAACACCA CCGGTTAGTT CAGAAAATTC AACAACTTCT | 240  |    |
| ATACTCCCTA ACCAACAAGT TGTGACAAAA GAAGTTTCAC AAGCGGCGCT TAATGCTATA | 300  |    |
| ATGAAAGGAC AACCCAACAT GGTTCTTATA ATCAAGACTA AGGAAGGCAA ACTTGAAGAG | 360  | 10 |
| GCAAAAACCG AGCTTGAAAA GCTAGGTGCA GAGATTCTTG ACGAAAATAG AGTTCTTAAC | 420  |    |
| ATGTTGCTAG TTAAGATTAA GCCTGAGAAA GTTAAAGAGC TCAACTATAT CTCATCTCTT | 480  |    |
| GAAAAAGCCT GGCTTAACAG AGAAGTTAAG CTTTCCCCTC CAATTGTCGA AAAGGACGTC | 540  |    |
| AAGACTAAGG AGCCCTCCCT AGAACCAAAA ATGTATAACA GCACCTGGGT AATTAATGCT | 600  |    |
| CTCCAGTTCA TCCAGGAATT TGGATATGAT GGTAGTGGTG TTGTTGTTGC AGTACTTGAC | 660  |    |
| ACGGGAGTTG ATCCGAACCA TCCTTTCTTG AGCATAACTC CAGATGGACG CAGGAAAATT | 720  | 20 |
| ATAGAATGGA AGGATTTTAC AGACGAGGGA TTCGTGGATA CATCATTCAG CTTTAGCAAG | 780  |    |
| GTTGTAAATG GGA CTCTTAT AATTAACACA ACATTCCAAG TGGCCTCAGG TCTCAGCTG | 840  |    |
| AATGAATCGA CAGGACTTAT GGAATACGTT GTTAAGACTG TTTACGTGAG CAATGTGACC | 900  |    |
| ATTGGAAATA TCACTTCTGC TAATGGCATC TATCACTTCG GCCTGCTCCC AGAAAGATAC | 960  |    |
| TTCGACTTAA ACTTCGATGG TGATCAAGAG GACTTCTATC CTGTCTTATT AGTTAACTCC | 1020 |    |
| ACTGGCAATG GTTATGACAT TGCATATGTG GATACTGACC TTGACTACGA CTTACCGAC  | 1080 | 30 |
| GAAGTTCCAC TTGGCCAGTA CAACGTTACT TATGATGTTG CTGTTTTTAG CTACTACTAC | 1140 |    |
| GGTCCTCTCA ACTACGTGCT TGCAGAAATA GATCCTAACG GAGAATATGC AGTATTTGGG | 1200 |    |

TGGGATGGTC ACGGTCACGG AACTCACGTA GCTGGAAGTG TTGCTGGTTA CGACAGCAAC 1260  
 AATGATGCTT GGGATTGGCT CAGTATGTAC TCTGGTGAAT GGGAAGTGTT CTCAAGACTC 1320  
 TATGGTTGGG ATTATACGAA CGTTACCACA GACACCGTGC AGGGTGTTGC TCCAGGTGCC 1380  
 CAAATAATGG CAATAAGAGT TCTTAGGAGT GATGGACGGG GTAGCATGTG GGATATTATA 1440  
 GAAGGTATGA CATACGCAGC AACCCATGGT GCAGACGTTA TAAGCATGAG TCTCGGTGGA 1500  
 AATGCTCCAT ACTTAGATGG TACTGATCCA GAAAGCGTTG CTGTGGATGA GCTTACCGAA 1560  
 AAGTACGGTG TTGTATTCGT AATAGCTGCA GGAAATGAAG GTCCTGGCAT TAACATCGTT 1620  
 GGAAGTCCTG GTGTTGCAAC AAAGGCAATA ACTGTTGGAG CTGCTGCAGT GCCCATTAAC 1680  
 GTTGGAGTTT ATGTTTCCCA AGCACTTGGG TATCCTGATT ACTATGGATT CTATTACTTC 1740  
 CCCGCTACA CAAACGTTAG AATAGCATTG TTCTCAAGCA GAGGGCCGAG AATAGATGGT 1800  
 GAAATAAAAC CCAATGTAGT GGCTCCAGGT TACGGAATTT ACTCATCCCT GCCGATGTGG 1860  
 ATTGGCGGAG CTGACTTCAT GTCTGGAAGT TCGATGGCTA CTCCACATGT CAGCGGTGTC 1920  
 GTTGCACTCC TCATAAGCGG GGCAAAGGCC GAGGGAATAT ACTACAATCC AGATATAATT 1980  
 AAGAAGGTTT TTGAGAGCGG TGCAACCTGG CTTGAGGGAG ATCCATATAC TGGGCAGAAG 2040  
 TAACTGAGC TTGACCAAGG TCATGGTCTT GTTAACGTTA CCAAGTCCTG GGAAATCCTT 2100  
 AAGGCTATAA ACGGCACCAC TCTCCCAATT GTTGATCACT GGGCAGACAA GTCCTACAGC 2160  
 GACTTTGCGG AGTACTTGGG TGTGGACGTT ATAAGAGGTC TCTACGCAAG GAACTCTATA 2220  
 CCTGACATTG TCGAGTGGCA CATTAAGTAC GTAGGGGACA CGGAGTACAG AACTTTTGAG 2280  
 ATCTATGCAA CTGAGCCATG GATTAAGCCT TTTGTCAGTG GAAGTGTAAT TCTAGAGAAC 2340  
 AATACCGAGT TTGTCCTTAG GGTGAAATAT GATGTAGAGG GTCTTGAGCC AGGTCTCTAT 2400  
 GTTGAAGGA TAATCATTGA TGATCCAACA ACGCCAGTTA TTGAAGACGA GATCTTGAAC 2460  
 ACAATTGTTA TTCCCGAGAA GTTCACTCCT GAGAACAATT ACACCCTCAC CTGGTATGAT 2520  
 ATTAATGGTC CAGAAATGGT GACTCACCAC TTCTTCACTG TGCCTGAGGG AGTGGACGTT 2580  
 CTCTACGCGA TGACCACATA CTGGGACTAC GGTCTGTACA GACCAGATGG AATGTTTGTG 2640  
 TTCCCATACC AGCTAGATTA TCTTCCCGCT GCAGTCTCAA ATCCAATGCC TGGAAACTGG 2700  
 GAGCTAGTAT GGACTGGATT TAACTTTGCA CCCCTCTATG AGTCGGGCTT CCTTGTAAGG 2760  
 ATTTACGGAG TAGAGATAAC TCCAAGCGTT TGGTACATTA ACAGGACATA CCTTGACACT 2820  
 AACACTGAAT TCTCAATTGA ATTCAATATT ACTAACATCT ATGCCCCAAT TAATGCAACT 2880

10

20

30

40

CTAATCCCCA TTGGCCTTGG AACCTACAAT GCGAGCGTTG AAAGCGTTGG TGATGGAGAG 2940  
 TTCTTCATAA AGGGCATTGA AGTTCCTGAA GGCACCGCAG AGTTGAAGAT TAGGATAGGC 3000  
 AACCCAAGTG TTCCGAATTC AGATCTAGAC TTGTACCTTT ATGACAGTAA AGGCAATTTA 3060  
 GTGGCCTTAG ATGGAACCCC AACAGCAGAA GAAGAGGTTG TAGTTGAGTA TCCTAAGCCT 3120  
 GGAGTTTATT CAATAGTAGT ACATGGTTAC AGCGTCAGGG ACGAAAATGG TAATCCAACG 3180  
 ACAACCACCT TTGACTTAGT TGTTCAAATG ACCCTTGATA ATGGAACAT AAAGCTTGAC 3240  
 AAAGACTCGA TTATTCTTGG AAGCAATGAA AGCGTAGTTG TAACTGCAAA CATAACAATT 3300  
 GATAGAGATC ATCCTACAGG AGTATACTCT GGTATCATAG AGATTAGAGA TAATGAGGTC 3360  
 TACCAGGATA CAAATACTTC AATTGCGAAA ATACCCATAA CTTTGGTAAT TGACAAGGCG 3420  
 GACTTTGCCG TTGGTCTCAC ACCAGCAGAG GGAGTACTTG GAGAGGCTAG AAATTACACT 3480  
 CTAATTGTAA AGCATGCCCT AACACTAGAG CCTGTGCCAA ATGCTACAGT GATTATAGGA 3540  
 AACTACACCT ACCTCACAGA CGAAAACGGT ACAGTGACAT TCACGTATGC TCCAACCTAAG 3600  
 TTAGGCAGTG ATGAAATCAC AGTCATAGTT AAGAAAGAGA ACTTCAACAC ATTAGAGAAG 3660  
 ACCTTCCAAA TCACAGTATC AGAGCCTGAA ATAACTGAAG AGGACATAAA TGAGCCCAAG 3720  
 CTTGCAATGT CATCACCAGA AGCAAATGCT ACCATAGTAT CAGTTGAGAT GGAGAGTGAG 3780  
 GGTGGCGTTA AAAAGACAGT GACAGTGGAA ATAACTATAA ACGGAACCGC TAATGAGACT 3840  
 GCAACAATAG TGGTTCCTGT TCCTAAGAAG GCCGAAAACA TCGAGGTAAG TGGAGACCAC 3900  
 GTAATTCCT ATAGTATAGA GGAAGGAGAG TACGCCAAGT ACGTTATAAT TACAGTGAAG 3960  
 TTTGCATCAC CTGTAACAGT AACTGTTACT TACACTATCT ATGCTGGCCC AAGAGTCTCA 4020  
 ATCTTGACAC TTAACCTCCT TGGCTACTCA TGGTACAGAC TATATTCACA GAAGTTTGAC 4080  
 GAATTGTACC AAAAGGCCCT TGAATTGGGA GTGGACAACG AGACATTAGC TTTAGCCCTC 4140  
 AGCTACCATG AAAAAGCCAA AGAGTACTAC GAAAAGGCCC TTGAGCTTAG CGAGGGTAAC 4200  
 ATAATCCAAT ACCTTGAGAG CATAAGACTA TTACCTCCAT TAAGACAGGC ATACATCAAT 4260  
 GAAATGAAGG CAGTTAAGAT ACTGGAAAAG GCCATAGAAG AATTAGAGGG TGAAGAGTAA 4320  
 TCTCCAATTT TTCCCACTT TCTTTTATA ACATTCCAAG CCTTTTCTTA GCTTCTTCGC 4380  
 TCATTCTATC AGGAGTCCA1 GGAGGATCAA AGGTAAGTTC AACCTCCACA TCTCTTACTC 4440  
 CTGGGATTTT GAGTACTTTC TCCTCTACAG CTCTAAGAAG CCAGAGAGTT AAAGGACACC 4500  
 CAGGAGTTGT CATTGTCATC TTTATATATA CCGTTTTGTC AGGATTAATC TTTAGCTCAT 4560

10

20

30

40

AAATTAATCC AAGGTTTACA ACATCCATCC CAATTTCTGG GTCGATAACC TCCTTTAGCT 4620  
 TTTCCAGAAT CATTTCTTCA GTAATTTCAA GGTTCATC TTTGGTTTCT CTCACAAACC 4680  
 CAATTTCAAC CTGCCTGATA CCTTCTAACT CCCTAAGCTT GTTATATATC TCCAAAAGAG 4740  
 TGGCATCATC AATTTTCTCT TTAAA 4765

配列番号:6

配列の長さ:1398

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Met Asn Lys Lys Gly Leu Thr Val Leu Phe Ile Ala Ile Met Leu

5 10 15

Leu Ser Val Val Pro Val His Phe Val Ser Ala Glu Thr Pro Pro

20 25 30

Val Ser Ser Glu Asn Ser Thr Thr Ser Ile Leu Pro Asn Gln Gln

35 40 45

Val Val Thr Lys Glu Val Ser Gln Ala Ala Leu Asn Ala Ile Met

50 55 60

Lys Gly Gln Pro Asn Met Val Leu Ile Ile Lys Thr Lys Glu Gly

65 70 75

Lys Leu Glu Glu Ala Lys Thr Glu Leu Glu Lys Leu Gly Ala Glu

80 85 90

Ile Leu Asp Glu Asn Arg Val Leu Asn Met Leu Leu Val Lys Ile

95 100 105

Lys Pro Glu Lys Val Lys Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Ser Leu Glu

110 115 120

10

20

30

40

Lys Ala Trp Leu Asn Arg Glu Val Lys Leu Ser Pro Pro Ile Val  
 125 130 135  
 Glu Lys Asp Val Lys Thr Lys Glu Pro Ser Leu Glu Pro Lys Met  
 140 145 150  
 Tyr Asn Ser Thr Trp Val Ile Asn Ala Leu Gln Phe Ile Gln Glu  
 155 160 165  
 Phe Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Val Val Val Ala Val Leu Asp Thr  
 170 175 180  
 Gly Val Asp Pro Asn His Pro Phe Leu Ser Ile Thr Pro Asp Gly  
 185 190 195  
 Arg Arg Lys Ile Ile Glu Trp Lys Asp Phe Thr Asp Glu Gly Phe  
 200 205 210  
 Val Asp Thr Ser Phe Ser Phe Ser Lys Val Val Asn Gly Thr Leu  
 215 220 225  
 Ile Ile Asn Thr Thr Phe Gln Val Ala Ser Gly Leu Thr Leu Asn  
 230 235 240  
 Glu Ser Thr Gly Leu Met Glu Tyr Val Val Lys Thr Val Tyr Val  
 245 250 255  
 Ser Asn Val Thr Ile Gly Asn Ile Thr Ser Ala Asn Gly Ile Tyr  
 260 265 270  
 His Phe Gly Leu Leu Pro Glu Arg Tyr Phe Asp Leu Asn Phe Asp  
 275 280 285  
 Gly Asp Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Val Leu Leu Val Asn Ser Thr  
 290 295 300  
 Gly Asn G yr Asp Ile Ala Tyr Val Asp Thr Asp Leu Asp Tyr  
 305 310 315  
 Asp Phe Thr Asp Glu Val Pro Leu Gly Gln Tyr Asn Val Thr Tyr  
 320 325 330

10

20

30

40

|                                                             |         |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| Asp Val Ala Val Phe Ser Tyr Tyr Tyr Gly Pro Leu Asn Tyr Val |         |
| 335                                                         | 340 345 |
| Leu Ala Glu Ile Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Ala Val Phe Gly Trp |         |
| 350                                                         | 355 360 |
| Asp Gly His Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Gly |         |
| 365                                                         | 370 375 |
| Tyr Asp Ser Asn Asn Asp Ala Trp Asp Trp Leu Ser Met Tyr Ser |         |
| 380                                                         | 385 390 |
| Gly Glu Trp Glu Val Phe Ser Arg Leu Tyr Gly Trp Asp Tyr Thr |         |
| 395                                                         | 400 405 |
| Asn Val Thr Thr Asp Thr Val Gln Gly Val Ala Pro Gly Ala Gln |         |
| 410                                                         | 415 420 |
| Ile Met Ala Ile Arg Val Leu Arg Ser Asp Gly Arg Gly Ser Met |         |
| 425                                                         | 430 435 |
| Trp Asp Ile Ile Glu Gly Met Thr Tyr Ala Ala Thr His Gly Ala |         |
| 440                                                         | 445 450 |
| Asp Val Ile Ser Met Ser Leu Gly Gly Asn Ala Pro Tyr Leu Asp |         |
| 455                                                         | 460 465 |
| Gly Thr Asp Pro Glu Ser Val Ala Val Asp Glu Leu Thr Glu Lys |         |
| 470                                                         | 475 480 |
| Tyr Gly Val Val Phe Val Ile Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gly |         |
| 485                                                         | 490 495 |
| Ile Asn Ile Val Gly Ser Pro Gly Val Ala Thr Lys Ala Ile Thr |         |
| 500                                                         | 505 510 |
| Val Gly Ala Ala Ala Val Pro Ile Asn Val Gly Val Tyr Val Ser |         |
| 515                                                         | 520 525 |
| Gln Ala Leu Gly Tyr Pro Asp Tyr Tyr Gly Phe Tyr Tyr Phe Pro |         |
| 530                                                         | 535 540 |

10

20

30

40

|                                                             |         |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| Ala Tyr Thr Asn Val Arg Ile Ala Phe Phe Ser Ser Arg Gly Pro |         |
| 545                                                         | 550 555 |
| Arg Ile Asp Gly Glu Ile Lys Pro Asn Val Val Ala Pro Gly Tyr |         |
| 560                                                         | 565 570 |
| Gly Ile Tyr Ser Ser Leu Pro Met Trp Ile Gly Gly Ala Asp Phe |         |
| 575                                                         | 580 585 |
| Met Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ser Gly Val Val | 10      |
| 590                                                         | 595 600 |
| Ala Leu Leu Ile Ser Gly Ala Lys Ala Glu Gly Ile Tyr Tyr Asn |         |
| 605                                                         | 610 615 |
| Pro Asp Ile Ile Lys Lys Val Leu Glu Ser Gly Ala Thr Trp Leu |         |
| 620                                                         | 625 630 |
| Glu Gly Asp Pro Tyr Thr Gly Gln Lys Tyr Thr Glu Leu Asp Gln | 20      |
| 635                                                         | 640 645 |
| Gly His Gly Leu Val Asn Val Thr Lys Ser Trp Glu Ile Leu Lys |         |
| 650                                                         | 655 660 |
| Ala Ile Asn Gly Thr Thr Leu Pro Ile Val Asp His Trp Ala Asp |         |
| 665                                                         | 670 675 |
| Lys Ser Tyr Ser Asp Phe Ala Glu Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile | 30      |
| 680                                                         | 685 690 |
| Arg Gly Leu Tyr Ala Arg Asn Ser Ile Pro Asp Ile Val Glu Trp |         |
| 695                                                         | 700 705 |
| His Ile Lys Tyr Val Gly Asp Thr Glu Tyr Arg Thr Phe Glu Ile |         |
| 710                                                         | 715 720 |
| Tyr Ala Thr Glu Pro Trp Ile Lys Pro Phe Val Ser Gly Ser Val | 40      |
| 725                                                         | 730 735 |
| Ile Leu Glu Asn Asn Thr Glu Phe Val Leu Arg Val Lys Tyr Asp |         |
| 740                                                         | 745 750 |

|                                                             |         |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| Val Glu Gly Leu Glu Pro Gly Leu Tyr Val Gly Arg Ile Ile Ile |         |
| 755                                                         | 760 765 |
| Asp Asp Pro Thr Thr Pro Val Ile Glu Asp Glu Ile Leu Asn Thr |         |
| 770                                                         | 775 780 |
| Ile Val Ile Pro Glu Lys Phe Thr Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Leu |         |
| 785                                                         | 790 795 |
| Thr Trp Tyr Asp Ile Asn Gly Pro Glu Met Val Thr His His Phe |         |
| 800                                                         | 805 810 |
| Phe Thr Val Pro Glu Gly Val Asp Val Leu Tyr Ala Met Thr Thr |         |
| 815                                                         | 820 825 |
| Tyr Trp Asp Tyr Gly Leu Tyr Arg Pro Asp Gly Met Phe Val Phe |         |
| 830                                                         | 835 840 |
| Pro Tyr Gln Leu Asp Tyr Leu Pro Ala Ala Val Ser Asn Pro Met |         |
| 845                                                         | 850 855 |
| Pro Gly Asn Trp Glu Leu Val Trp Thr Gly Phe Asn Phe Ala Pro |         |
| 860                                                         | 865 870 |
| Leu Tyr Glu Ser Gly Phe Leu Val Arg Ile Tyr Gly Val Glu Ile |         |
| 875                                                         | 880 885 |
| Thr Pro Ser Val Trp Tyr Ile Asn Arg Thr Tyr Leu Asp Thr Asn |         |
| 890                                                         | 895 900 |
| Thr Glu Phe Ser Ile Glu Phe Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Ala Pro |         |
| 905                                                         | 910 915 |
| Ile Asn Ala Thr Leu Ile Pro Ile Gly Leu Gly Thr Tyr Asn Ala |         |
| 920                                                         | 925 930 |
| Ser Val Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Phe Phe Ile Lys Gly Ile |         |
| 935                                                         | 940 945 |
| Glu Val Pro Glu Gly Thr Ala Glu Leu Lys Ile Arg Ile Gly Asn |         |
| 950                                                         | 955 960 |

10

20

30

40

|                                                             |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|
| Pro Ser Val Pro Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Ser |      |      |
| 965                                                         | 970  | 975  |
| Lys Gly Asn Leu Val Ala Leu Asp Gly Asn Pro Thr Ala Glu Glu |      |      |
| 980                                                         | 985  | 990  |
| Glu Val Val Val Glu Tyr Pro Lys Pro Gly Val Tyr Ser Ile Val |      |      |
| 995                                                         | 1000 | 1005 |
| Val His Gly Tyr Ser Val Arg Asp Glu Asn Gly Asn Pro Thr Thr |      |      |
| 1010                                                        | 1015 | 1020 |
| Thr Thr Phe Asp Leu Val Val Gln Met Thr Leu Asp Asn Gly Asn |      |      |
| 1025                                                        | 1030 | 1035 |
| Ile Lys Leu Asp Lys Asp Ser Ile Ile Leu Gly Ser Asn Glu Ser |      |      |
| 1040                                                        | 1045 | 1050 |
| Val Val Val Thr Ala Asn Ile Thr Ile Asp Arg Asp His Pro Thr |      |      |
| 1055                                                        | 1060 | 1065 |
| Gly Val Tyr Ser Gly Ile Ile Glu Ile Arg Asp Asn Glu Val Tyr |      |      |
| 1070                                                        | 1075 | 1080 |
| Gln Asp Thr Asn Thr Ser Ile Ala Lys Ile Pro Ile Thr Leu Val |      |      |
| 1085                                                        | 1090 | 1095 |
| Ile Asp Lys Ala Asp Phe Ala Val Gly Leu Thr Pro Ala Glu Gly |      |      |
| 1100                                                        | 1105 | 1110 |
| Val Leu Gly Glu Ala Arg Asn Tyr Thr Leu Ile Val Lys His Ala |      |      |
| 1115                                                        | 1120 | 1125 |
| Leu Thr Leu Glu Pro Val Pro Asn Ala Thr Val Ile Ile Gly Asn |      |      |
| 1130                                                        | 1135 | 1140 |
| Tyr Thr Tyr Leu Thr Asp Glu Asn Gly Thr Val Thr Phe Thr Tyr |      |      |
| 1145                                                        | 1150 | 1155 |
| Ala Pro Thr Lys Leu Gly Ser Asp Glu Ile Thr Val Ile Val Lys |      |      |
| 1160                                                        | 1165 | 1170 |

10

20

30

40

|                                                             |      |      |    |
|-------------------------------------------------------------|------|------|----|
| Lys Glu Asn Phe Asn Thr Leu Glu Lys Thr Phe Gln Ile Thr Val |      |      |    |
| 1175                                                        | 1180 | 1185 |    |
| Ser Glu Pro Glu Ile Thr Glu Glu Asp Ile Asn Glu Pro Lys Leu |      |      |    |
| 1190                                                        | 1195 | 1200 |    |
| Ala Met Ser Ser Pro Glu Ala Asn Ala Thr Ile Val Ser Val Glu |      |      |    |
| 1205                                                        | 1210 | 1215 |    |
| Met Glu Ser Glu Gly Gly Val Lys Lys Thr Val Thr Val Glu Ile |      |      | 10 |
| 1220                                                        | 1225 | 1230 |    |
| Thr Ile Asn Gly Thr Ala Asn Glu Thr Ala Thr Ile Val Val Pro |      |      |    |
| 1235                                                        | 1240 | 1245 |    |
| Val Pro Lys Lys Ala Glu Asn Ile Glu Val Ser Gly Asp His Val |      |      |    |
| 1250                                                        | 1255 | 1260 |    |
| Ile Ser Tyr Ser Ile Glu Glu Gly Glu Tyr Ala Lys Tyr Val Ile |      |      | 20 |
| 1265                                                        | 1270 | 1275 |    |
| Ile Thr Val Lys Phe Ala Ser Pro Val Thr Val Thr Val Thr Tyr |      |      |    |
| 1280                                                        | 1285 | 1290 |    |
| Thr Ile Tyr Ala Gly Pro Arg Val Ser Ile Leu Thr Leu Asn Phe |      |      |    |
| 1295                                                        | 1300 | 1305 |    |
| Leu Gly Tyr Ser Trp Tyr Arg Leu Tyr Ser Gln Lys Phe Asp Glu |      |      | 30 |
| 1310                                                        | 1315 | 1320 |    |
| Leu Tyr Gln Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asp Asn Glu Thr Leu |      |      |    |
| 1325                                                        | 1330 | 1335 |    |
| Ala Leu Ala Leu Ser Tyr His Glu Lys Ala Lys Glu Tyr Tyr Glu |      |      |    |
| 1340                                                        | 1345 | 1350 |    |
| Lys Ala Leu Glu Leu Ser Glu Gly Asn Ile Ile Gln Tyr Leu Gly |      |      | 40 |
| 1355                                                        | 1360 | 1365 |    |
| Asp Ile Arg Leu Leu Pro Pro Leu Arg Gln Ala Tyr Ile Asn Glu |      |      |    |
| 1370                                                        | 1375 | 1380 |    |
| Met Lys Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Ala Ile Glu Glu Leu Glu |      |      |    |
| 1385                                                        | 1390 | 1395 |    |
| Gly Glu Glu                                                 |      |      | 50 |

配列番号:7

配列の長さ:35

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)

配列:

GGWWSDRRTG TTRRHGTHGC DGTDMTYGAC ACBGG 35

配列番号:8

10

配列の長さ:32

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)

配列:

KSTCACGGAA CTCACGTGDC BGGHACDGTG GC 32

配列番号:9

配列の長さ:33

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)

配列:

ASCMGCAACH GTKCCVGCHA CGTGAGTTCC GTG 33

配列番号:10

配列の長さ:34

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

30

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

CHCCGSYVAC RTGBGGAGWD GCCATBGAVG TDCC 34

配列番号:11

配列の長さ:1977

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

40

起源:サーモコッカス・セラー

株名:DSM2476

配列:

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| ATGAAGAGGT TAGGTGCTGT GGTGCTGGCA CTGGTGCTCG TGGGTCTTCT GGCCGGAACG | 60  |
| GCCCTTGCGG CACCCGTAAA ACCGGTTGTC AGGAACAACG CGGTCAGCA GAAGAACTAC  | 120 |
| GGACTGCTGA CCCCCGGACT GTTCAAGAAA GTCCAGAGGA TGAAGTGGAA CCAGGAAGTG | 180 |
| GACACCGTCA TAATGTTCCG GAGCTACGGA GACAGGGACA GGGCGGTAA GGTACTGAGG  | 240 |
| CTCATGGGCG CCCAGGTCAA GTACTCCTAC AAGATAATCC CTGCTGTCCG GGTAAAATA  | 300 |
| AAGGCCAGGG ACCTTCTGCT GATCGCGGGC ATGATAGACA CGGGTACTT CGGTAACACA  | 360 |
| AGGGTCTCGG GCATAAAGTT CATAAGGAG GATTACAAGG TTCAGGTTGA CGACGCCACT  | 420 |

|                                                                   |      |    |
|-------------------------------------------------------------------|------|----|
| TCCGTCTCCC AGATAGGGGC CGATACCGTC TGGAACTCCC TCGGCTACGA CGGAAGCGGT | 480  |    |
| GTGGTGGTTG CCATCGTCCA TACGGGTATA GACCGGAACC ACCCCGATCT GAAGGGCAAG | 540  |    |
| GTCATAGGCT GGTACGACGC CGTCAACGGC AGGTGACCCC CCTACGATGA CCAGGGACAC | 600  |    |
| GGAACCCACG TTGCGGGTAT CGTTGCCGGA ACCGGCAGCG TTAAGTCCCA GTACATAGGC | 660  |    |
| GTCGCCCCCG GCGCGAAGCT CGTCGGCGTC AAGGTTCTCG GTGCCGACGG TTCGGGAAGC | 720  |    |
| GTCTCCACCA TCATCGCGGG TGTGACTGG GTCGTCCAGA ACAAGGACAA GTACGGGATA  | 780  |    |
| AGGGTCATCA ACCTCTCCCT CGGCTCCTCC CAGAGCTCCG ACCGAACCGA CTCCCTCAGT | 840  | 10 |
| CAGGCCGTCA ACAACGCCTG GGACGCCGGT ATAGTAGTCT GCGTCGCCGC CGGCAACAGC | 900  |    |
| GGGCCGAACA CCTACACCGT CGGCTCACCC GCCGCCGCGA GCAAGGTCAT AACCGTCGGT | 960  |    |
| GCAGTTGACA GCAACGACAA CATCGCCAGC TTCTCCAGCA GGGGACCGAC CGCGGACGGA | 1020 |    |
| AGGCTCAAGC CGGAAGTCGT CGCCCCGGC GTTGACATCA TAGCCCCGCG CGCCAGCGGA  | 1080 |    |
| ACCAGCATGG GCACCCCGAT AAACGACTAC TACACCAAGG CCTCTGGAAC CAGCATGGCC | 1140 |    |
| ACCCCGCAGC TTTCGGGCGT TGGCGCGCTC ATCCTCCAGG CCCACCCGAG CTGGACCCCG | 1200 | 20 |
| GACAAGGTGA AGACCGCCCT CATCGAGACC GCCGACATAG TCGCCCCCAA GGAGATAGCG | 1260 |    |
| GACATCGCCT ACGGTGCGGG TAGGGTGAAC GTCTACAAGG CCATCAAGTA CGACGACTAC | 1320 |    |
| GCCAAGCTCA CCTTCACCGG CTCCGTCGCC GACAAGGGAA GCGCCACCCA CACCTTCGAC | 1380 |    |
| GTCAGCGGCG CCACCTTCGT GACCGCCACC CTCTACTGGG ACACGGGCTC GAGCGACATC | 1440 |    |
| GACCTCTACC TCTACGACCC CAACGGGAAC GAGGTTGACT ACTCCTACAC CGCCTACTAC | 1500 |    |
| GGCTTCGAGA AGGTGCGCTA CTACAACCCG ACCGCCGGAA CCTGGACGGT CAAGGTCGTC | 1560 | 30 |
| AGCTACAAGG GCGCGGCGAA CTACCAGGTC GACGTCGTCA GCGACGGGAG CCTCAGCCAG | 1620 |    |
| TCCGGCGGCG GCAACCCGAA TCCAAACCCC AACCCGAACC CAACCCCGAC CACCGACACC | 1680 |    |
| CAGACCTTCA CCGGTTCCGT TAACGACTAC TGGGACACCA GCGACACCTT CACCATGAAC | 1740 |    |
| GTCAACAGCG GTGCCACCAA GATAACCGGT GACCTGACCT TCGATACTTC CTACAACGAC | 1800 |    |
| CTCGACCTCT ACCTCTACGA CCCCAACGGC AACCTCGTTG ACAGGTCCAC GTCGAGCAAC | 1860 |    |
| AGCTACGAGC ACGTCGAGTA CGCCAACCCC GCCCGGGGAA CCTGGACGTT CTTGCTCTAC | 1920 | 40 |
| GCCTACAGCA CCTACGGCTG GGCGGACTAC CAGCTCAAGG CCGTCGTCTA CTACGGG    | 1977 |    |

配列番号:12

配列の長さ:659

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

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

|                                                             |     |     |    |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| Val Asp Thr Gly Ile Asp Ala Asn His Pro Asp Leu Lys Gly Lys |     |     |    |
| 170                                                         | 175 | 180 |    |
| Val Ile Gly Trp Tyr Asp Ala Val Asn Gly Arg Ser Thr Pro Tyr |     |     |    |
| 185                                                         | 190 | 195 |    |
| Asp Asp Gln Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ile Val Ala Gly |     |     |    |
| 200                                                         | 205 | 210 | 10 |
| Thr Gly Ser Val Asn Ser Gln Tyr Ile Gly Val Ala Pro Gly Ala |     |     |    |
| 215                                                         | 220 | 225 |    |
| Lys Leu Val Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Ser |     |     |    |
| 230                                                         | 235 | 240 |    |
| Val Ser Thr Ile Ile Ala Gly Val Asp Trp Val Val Gln Asn Lys |     |     |    |
| 245                                                         | 250 | 255 | 20 |
| Asp Lys Tyr Gly Ile Arg Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Ser Ser |     |     |    |
| 260                                                         | 265 | 270 |    |
| Gln Ser Ser Asp Gly Thr Asp Ser Leu Ser Gln Ala Val Asn Asn |     |     |    |
| 275                                                         | 280 | 285 |    |
| Ala Trp Asp Ala Gly Ile Val Val Cys Val Ala Ala Gly Asn Ser |     |     |    |
| 290                                                         | 295 | 300 |    |
| Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Lys |     |     | 30 |
| 305                                                         | 310 | 315 |    |
| Val Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Asp Asn Ile Ala Ser |     |     |    |
| 320                                                         | 325 | 330 |    |
| Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly Arg Leu Lys Pro Glu |     |     |    |
| 335                                                         | 340 | 345 |    |
| Val Val Ala Pro Gly Val Asp Ile Ile Ala Pro Arg Ala Ser Gly |     |     | 40 |
| 350                                                         | 355 | 360 |    |
| Thr Ser Met Gly Thr Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr Lys Ala Ser |     |     |    |
| 365                                                         | 370 | 375 |    |

|                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ser Gly Val Gly Ala Leu |     |     |
| 380                                                         | 385 | 390 |
| Ile Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys Thr |     |     |
| 395                                                         | 400 | 405 |
| Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Ala Pro Lys Glu Ile Ala |     |     |
| 410                                                         | 415 | 420 |
| Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Val Tyr Lys Ala Ile |     |     |
| 425                                                         | 430 | 435 |
| Lys Tyr Asp Asp Tyr Ala Lys Leu Thr Phe Thr Gly Ser Val Ala |     |     |
| 440                                                         | 445 | 450 |
| Asp Lys Gly Ser Ala Thr His Thr Phe Asp Val Ser Gly Ala Thr |     |     |
| 455                                                         | 460 | 465 |
| Phe Val Thr Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Thr Gly Ser Ser Asp Ile |     |     |
| 470                                                         | 475 | 480 |
| Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Glu Val Asp Tyr Ser |     |     |
| 485                                                         | 490 | 495 |
| Tyr Thr Ala Tyr Tyr Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro |     |     |
| 500                                                         | 505 | 510 |
| Thr Ala Gly Thr Trp Thr Val Lys Val Val Ser Tyr Lys Gly Ala |     |     |
| 515                                                         | 520 | 525 |
| Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln |     |     |
| 530                                                         | 535 | 540 |
| Ser Gly Gly Gly Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Thr |     |     |
| 545                                                         | 550 | 555 |
| Pro Thr Thr Asp Thr Gln Thr Phe Thr Gly Ser Val Asn Asp Tyr |     |     |
| 560                                                         | 565 | 570 |
| Trp Asp Thr Ser Asp Thr Phe Thr Met Asn Val Asn Ser Gly Ala |     |     |
| 575                                                         | 580 | 585 |

10

20

30

40

Thr Lys Ile Thr Gly Asp Leu Thr Phe Asp Thr Ser Tyr Asn Asp  
590 595 600  
Leu Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Leu Val Asp Arg  
605 610 615  
Ser Thr Ser Ser Asn Ser Tyr Glu His Val Glu Tyr Ala Asn Pro  
620 625 630  
Ala Pro Gly Thr Trp Thr Phe Leu Val Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr  
635 640 645  
Gly Trp Ala Asp Tyr Gln Leu Lys Ala Val Val Tyr Tyr Gly  
650 655

10

配列番号:13

配列の長さ:28

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)

配列:

AGAGGGATCC ATGAAGGGGC TGAAAGCT

28

配列番号:14

配列の長さ:28

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)

配列:

AGAGGCATGC GCTCTAGACT CTGGGAGAGT

28

配列番号:15

配列の長さ:1962

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

起源:ピロコッカス・フリオサス

株名:DSM3638

配列:

20

30

40

ATGAAGGGGC TGAAAGCTCT CATATTAGTG ATTTTAGTTC TAGGTTTGGT AGTAGGGAGC 60  
GTAGCGGCAG CTCCAGAGAA GAAAGTTGAA CAAGTAAGAA ATGTTGAGAA GAACTATGGT 120  
CTGCTAACGC CAGGACTGTT CAGAAAAATT CAAAAATTGA ATCCTAACGA GGAAATCAGC 180  
ACAGTAATTG TATTTGAAAA CCATAGGGAA AAAGAAATTG CAGTAAGAGT TCTTGAGTTA 240  
ATGGGTGCAA AAGTTAGGTA TGTGTACCAT ATTATACCCG CAATAGCTGC CGATCTTAAG 300  
GTTAGAGACT TACTAGTCAT CTCAGGTTTA ACAGGGGGTA AAGCTAAGCT TTCAGGTGTT 360  
AGGTTTATCC AGGAAGACTA CAAAGTTACA GTTTCAGCAG AATTAGAAGG ACTGGATGAG 420  
TCTGCAGCTC AAGTTATGGC AACTTACGTT TGGAAGTTGG GATATGATGG TTCTGGAATC 480  
ACAATAGGAA TAATTGACAC TGAATTGAC GCTTCTCATC CAGATCTCCA AGGAAAAGTA 540  
ATTGGGTGGG TAGATTTTGT CAATGGTAGG AGTTATCCAT ACGATGACCA TGGACATGGA 600  
ACTCATGTAG CTTCAATAGC AGCTGGTACT GGAGCAGCAA GTAATGGCAA GTACAAGGGA 660  
ATGGCTCCAG GAGCTAAGCT GCGGGGAATT AAGGTTCTAG GTGCCGATGG TTCTGGAAGC 720  
ATATCTACTA TAATTAAGGG AGTTGAGTGG GCCGTTGATA ACAAAGATAA GTACGGAATT 780  
AAGGTCATTA ATCTTTCTCT TGGTTCAAGC CAGAGCTCAG ATGGTACTGA CGCTCTAAGT 840  
CAGGCTGTTA ATGCAGCGTG GGATGCTGGA TTAGTTGTTG TGGTTGCCGC TGGAAACAGT 900  
GGACCTAACA AGTATACAAT CGGTTCTCCA GCAGCTGCAA GCAAAGTTAT TACAGTTGGA 960  
GCCGTTGACA AGTATGATGT TATAACAAGC TTCTCAAGCA GAGGGCCAAC TGCAGACGGC 1020  
AGGCTTAAGC CTGAGGTTGT TGCTCCAGGA AACTGGATAA TTGCTGCCAG AGCAAGTGGA 1080

10

20

ACTAGCATGG GTCAACCAAT TAATGACTAT TACACAGCAG CTCCTGGGAC ATCAATGGCA 1140  
 ACTCCTCACG TAGCTGGTAT TGCAGCCCTC TTGCTCCAAG CACACCCGAG CTGGACTCCA 1200  
 GACAAAGTAA AAACAGCCCT CATAGAAACT GCTGATATCG TAAAGCCAGA TGAAATAGCC 1260  
 GATATAGCCT ACGGTGCAGG TAGGGTTAAT GCATACAAGG CTATAAACTA CGATAACTAT 1320  
 GCAAAGCTAG TGTTCACTGG ATATGTTGCC AACAAAGGCA GCCAAACTCA CCAGTTCGTT 1380  
 ATTAGCGGAG CTTCGTTCTG AACTGCCACA TTATACTGGG ACAATGCCAA TAGCGACCTT 1440  
 GATCTTTACC TCTACGATCC CAATGGAAAC CAGGTTGACT ACTCTTACAC CGCCTACTAT 1500  
 GGATTCGAAA AGGTTGGTTA TTACAACCCA ACTGATGGAA CATGGACAAT TAAGGTTGTA 1560  
 AGCTACAGCG GAAGTGCAAA CTATCAAGTA GATGTGGTAA GTGATGGTTC CCTTTCACAG 1620  
 CCTGGAAGTT CACCATCTCC ACAACCAGAA CCAACAGTAG ACGCAAAGAC GTTCCAAGGA 1680  
 TCCGATCACT ACTACTATGA CAGGAGCGAC ACCTTTACAA TGACCGTTAA CTCTGGGGCT 1740  
 ACAAAGATTA CTGGAGACCT AGTGTTTGAC ACAAGCTACC ATGATCTTGA CCTTTACCTC 1800  
 TACGATCCTA ACCAGAAGCT TGTAAGATAGA TCGGAGAGTC CCAACAGCTA CGAACACGTA 1860  
 GAATACTTAA CCCCCGCCCC AGGAACCTGG TACTTCCTAG TATATGCCTA CTACACTTAC 1920  
 GGTGCGGCTT ACTACGAGCT GACGGCTAAA GTTTATTATG GC 1962

10

20

配列番号:16

配列の長さ:654

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

30

配列:

Met Lys Gly Leu Lys Ala Leu Ile Leu Val Ile Leu Val Leu Gly

5

10

15

Leu Val Val Gly Ser Val Ala Ala Ala Pro Glu Lys Lys Val Glu

20

25

30

Gln Val Arg Asn Val Glu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Thr Pro Gly

|                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 35                                                          | 40  | 45  |
| Leu Phe Arg Lys Ile Gln Lys Leu Asn Pro Asn Glu Glu Ile Ser |     |     |
| 50                                                          | 55  | 60  |
| Thr Val Ile Val Phe Glu Asn His Arg Glu Lys Glu Ile Ala Val |     |     |
| 65                                                          | 70  | 75  |
| Arg Val Leu Glu Leu Met Gly Ala Lys Val Arg Tyr Val Tyr His |     |     |
| 80                                                          | 85  | 90  |
| Ile Ile Pro Ala Ile Ala Ala Asp Leu Lys Val Arg Asp Leu Leu |     |     |
| 95                                                          | 100 | 105 |
| Val Ile Ser Gly Leu Thr Gly Gly Lys Ala Lys Leu Ser Gly Val |     |     |
| 110                                                         | 115 | 120 |
| Arg Phe Ile Gln Glu Asp Tyr Lys Val Thr Val Ser Ala Glu Leu |     |     |
| 125                                                         | 130 | 135 |
| Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln Val Met Ala Thr Tyr Val |     |     |
| 140                                                         | 145 | 150 |
| Trp Asn Leu Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Thr Ile Gly Ile Ile |     |     |
| 155                                                         | 160 | 165 |
| Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln Gly Lys Val |     |     |
| 170                                                         | 175 | 180 |
| Ile Gly Trp Val Asp Phe Val Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Tyr Asp |     |     |
| 185                                                         | 190 | 195 |
| Asp His Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Thr |     |     |
| 200                                                         | 205 | 210 |
| Gly Ala Ala Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Gly Met Ala Pro Gly Ala |     |     |
| 215                                                         | 220 | 225 |
| Lys Leu Ala Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Ser |     |     |
| 230                                                         | 235 | 240 |
| Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gly Val Glu Trp Ala Val Asp Asn Lys |     |     |

10

20

30

40

|                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 245                                                         | 250 | 255 |
| Asp Lys Tyr Gly Ile Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Ser Ser |     |     |
| 260                                                         | 265 | 270 |
| Gln Ser Ser Asp Gly Thr Asp Ala Leu Ser Gln Ala Val Asn Ala |     |     |
| 275                                                         | 280 | 285 |
| Ala Trp Asp Ala Gly Leu Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Ser |     |     |
| 290                                                         | 295 | 300 |
| Gly Pro Asn Lys Tyr Thr Ile Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Lys |     |     |
| 305                                                         | 310 | 315 |
| Val Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Lys Tyr Asp Val Ile Thr Ser |     |     |
| 320                                                         | 325 | 330 |
| Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly Arg Leu Lys Pro Glu |     |     |
| 335                                                         | 340 | 345 |
| Val Val Ala Pro Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala Arg Ala Ser Gly |     |     |
| 350                                                         | 355 | 360 |
| Thr Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr Ala Ala Pro |     |     |
| 365                                                         | 370 | 375 |
| Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile Ala Ala Leu |     |     |
| 380                                                         | 385 | 390 |
| Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys Thr |     |     |
| 395                                                         | 400 | 405 |
| Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala |     |     |
| 410                                                         | 415 | 420 |
| Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile |     |     |
| 425                                                         | 430 | 435 |
| Asn Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala |     |     |
| 440                                                         | 445 | 450 |
| Asn Lys Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser |     |     |

10

20

30

40

|                                                             |     |     |    |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| 455                                                         | 460 | 465 |    |
| Phe Val Thr Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu |     |     |    |
| 470                                                         | 475 | 480 |    |
| Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser |     |     |    |
| 485                                                         | 490 | 495 |    |
| Tyr Thr Ala Tyr Tyr Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro |     |     | 10 |
| 500                                                         | 505 | 510 |    |
| Thr Asp Gly Thr Trp Thr Ile Lys Val Val Ser Tyr Ser Gly Ser |     |     |    |
| 515                                                         | 520 | 525 |    |
| Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln |     |     |    |
| 530                                                         | 535 | 540 |    |
| Pro Gly Ser Ser Pro Ser Pro Gln Pro Glu Pro Thr Val Asp Ala |     |     | 20 |
| 545                                                         | 550 | 555 |    |
| Lys Thr Phe Gln Gly Ser Asp His Tyr Tyr Tyr Asp Arg Ser Asp |     |     |    |
| 560                                                         | 565 | 570 |    |
| Thr Phe Thr Met Thr Val Asn Ser Gly Ala Thr Lys Ile Thr Gly |     |     |    |
| 575                                                         | 580 | 585 |    |
| Asp Leu Val Phe Asp Thr Ser Tyr His Asp Leu Asp Leu Tyr Leu |     |     | 30 |
| 590                                                         | 595 | 600 |    |
| Tyr Asp Pro Asn Gln Lys Leu Val Asp Arg Ser Glu Ser Pro Asn |     |     |    |
| 605                                                         | 610 | 615 |    |
| Ser Tyr Glu His Val Glu Tyr Leu Thr Pro Ala Pro Gly Thr Trp |     |     |    |
| 620                                                         | 625 | 630 |    |
| Tyr Phe Leu Val Tyr Ala Tyr Tyr Thr Tyr Gly Trp Ala Tyr Tyr |     |     | 40 |
| 635                                                         | 640 | 645 |    |
| Glu Leu Thr Ala Lys Val Tyr Tyr Gly                         |     |     |    |
| 650                                                         |     |     |    |

配列番号:17

配列の長さ:25

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)

配列:

TCTGAATTCG TTCTTTTCTG TATGG

25

配列番号:18

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)

配列:

TGTACTGCTG GATCCGGCAG

20

配列番号:19

10

配列の長さ:25

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)

配列:

AGAGGCATGC GTATCCATCA GATTTTGTAG

30

配列番号:20

配列の長さ:20

配列の型:核酸

20

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)

配列:

AGTGAACGGA TACTTGAAC

20

配列番号:21

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

30

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

GTTCCAAGTA TCCGTTCACT

20

配列番号:22

配列の長さ:12

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

40

Ala Glu Leu Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln

5

10

配列番号:23

配列の長さ:24

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)

配列:

50

TCATGGATCC ACCCTCTCCT TTTA

24

配列番号:24

配列の長さ:26

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)

配列:

GTCTGCGCAG GCTGCCGGAN NNNNNATGAA GGGGCTGAAA GCTCTC

26

10

配列番号:25

配列の長さ:29

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)

配列:

GAGAGCTTTC AGCCCCTTCA TNNNNNTCC GGCAGCCTGC GCAGACATG

29

配列番号:26

配列の長さ:27

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)

配列:

AGAGGGGGAT CCGTGAGAAG CAAAAAA

27

配列番号:27

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)

配列:

GATGACTAGT AAGTCTCTAA

20

配列番号:28

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)

配列:

AAGCCTGAGG TTGTTGCTCC

20

配列番号:29

配列の長さ:29

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

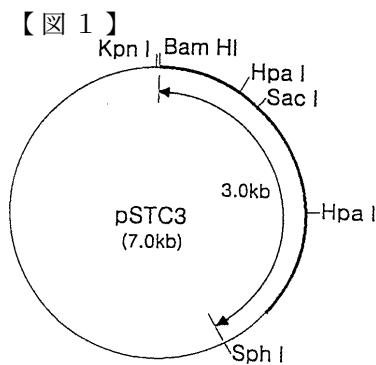
トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

50

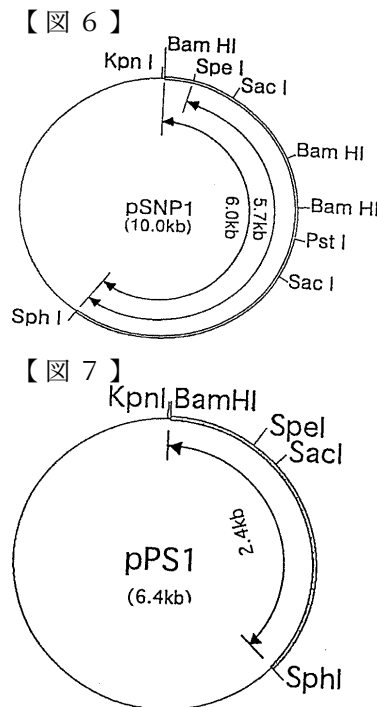
GGGCATGCTC ATGAACTTCC AGGCTGTGA



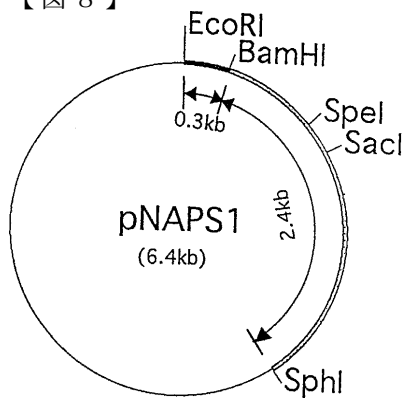
|                       |             |            |            |             |            |  |  |  |  |  |
|-----------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|--|--|--|--|--|
| PFUL<br>TCES<br>サブクリン | 【図 2】       |            |            |             |            |  |  |  |  |  |
|                       | 10          | 20         | 30         | 40          | 50         |  |  |  |  |  |
|                       | MNKGITVLF   | IAIMLLSVVP | VHFVSAETPP | VSESENSTTSI | LPNQVVVTK  |  |  |  |  |  |
|                       |             | MKRLGAVV   | LALVLVGLLA | GTALAAPVKP  | VVRNNAVOQK |  |  |  |  |  |
|                       |             |            |            |             | MRGKKVWISL |  |  |  |  |  |
| PFUL<br>TCES<br>サブクリン | 60          | 70         | 80         | 90          | 100        |  |  |  |  |  |
|                       | VSQAALNAIM  | KGQPNVLI   | KTEKGLKEA  | KTELEKLGAE  | ILDENRVLNM |  |  |  |  |  |
|                       | NYGLLTPLGF  | KKVORNMNQ  | EVDFVIMFGS | YGRDRAVKV   | LRMGAGQVKY |  |  |  |  |  |
|                       | LFALALIFTM  | AFGSTSSAQ  | AGKSNGEKY  | IVGFKQTMST  | MSAAKKKQVI |  |  |  |  |  |
| PFUL<br>TCES<br>サブクリン | 110         | 120        | 130        | 140         | 150        |  |  |  |  |  |
|                       | LLAVKIKPEKV | KELNVISSE  | KAWLNREVKL | SPPIVEKDVK  | TKPESLEPKM |  |  |  |  |  |
|                       | SYKLIIPAVAV | KIKARDILLI | AGMIDTGYFG | NTRVSGIKFI  | QEDYKQVDD  |  |  |  |  |  |
|                       | SEKGGKQKQ   | FKYVDAASAT | LNEKAVRELK | KDFSVAYVEE  | DVVAHAYQSS |  |  |  |  |  |
| PFUL<br>TCES<br>サブクリン | 160         | 170        | 180        | 190         | 200        |  |  |  |  |  |
|                       | YNSTWVINAL  | QFIQEFQVDC | SGVVAVLDT  | GMPPNHPETIS | ITPDGRRKII |  |  |  |  |  |
|                       | ATSVSQIGAD  | TVWNSLGYDC | SGVVAVLDT  | GIDANHPDLK  | GKVIWGYDAV |  |  |  |  |  |
|                       | VYGVYSQIKA  | PALHSQVYTG | SMKVAVIDS  | GIDSSHEDLK  | VAGGASMVPS |  |  |  |  |  |
| PFUL<br>TCES<br>サブクリン | 210         | 220        | 230        | 240         | 250        |  |  |  |  |  |
|                       | EWKDFDEGF   | VDTSFSFSKV | VNGTLIINTT | FOVASGLTLN  | ESTGLMEYVV |  |  |  |  |  |
|                       | NGRSTPYDDQ  | -----      | -----      | -----       | -----      |  |  |  |  |  |
|                       | ETNPFQDNN-  | -----      | -----      | -----       | -----      |  |  |  |  |  |
| PFUL<br>TCES<br>サブクリン | 260         | 270        | 280        | 290         | 300        |  |  |  |  |  |
|                       | KTVVVSNTVI  | GNITSANGIY | HFGLLPERYF | DLNFDGQED   | FYPVLIVNST |  |  |  |  |  |
|                       | -----       | -----      | -----      | -----       | -----      |  |  |  |  |  |

|       |            |            |            |            |           |
|-------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| PFUL  | 310        | 320        | 330        | 340        | 350       |
| TCES  | TDLVDFTDE  | VPLGQNVVY  | DVAVFSYYG  | PLNYVLAED  |           |
| サブチリシ |            |            |            |            |           |
| PFUL  | 360        | 370        | 380        | 390        | 400       |
| TCES  | DGHGHTHVA  | CTVAGYDSNN | DAMDWLSNYS | GEWEVFSRDY |           |
| サブチリシ |            |            |            |            |           |
| PFUL  | 410        | 420        | 430        | 440        | 450       |
| TCES  | YIGVAPGK   | TVGAVIGAL  | SSGSVSLIA  | GYDMVYQNKD |           |
| サブチリシ |            |            |            |            |           |
| PFUL  | 460        | 470        | 480        | 490        | 500       |
| TCES  | DVISES     | LGSNAPYLG  | LDPSVAVDE  | LTEKYGVVVF | IPAGNEGPI |
| サブチリシ |            |            |            |            |           |
| PFUL  | 510        | 520        | 530        | 540        | 550       |
| TCES  | N--IVGSEGV | ATKATVGA   | AVPVGVTY   | SOALGYPDY  | GFYYPAYTN |
| サブチリシ |            |            |            |            |           |
| PFUL  | 560        | 570        | 580        | 590        | 600       |
| TCES  | VRIFSSRC   | FRIDGEIRN  | WVAPGYVGS  | SEFWIGGAD  | F-----MS  |
| サブチリシ |            |            |            |            |           |

|       |             |            |            |             |            |
|-------|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| PFUL  | 960         | 970        | 980        | 990         | 1000       |
| TCES  | GEFFIKGIEV  | PEGTAELKIR | IGNPSVPNSD | LDILYLYDSKG | NLVALDGNPT |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1010        | 1020       | 1030       | 1040        | 1050       |
| TCES  | AEEVVVEYP   | KPGVYSIVH  | GYSVRDENG  | PTTTFDLVV   | QMTLDNGNIK |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1060        | 1070       | 1080       | 1090        | 1100       |
| TCES  | LDKDSILGS   | NESVVVTANI | TIDRDHPTGV | YSGIIEIRDN  | EVYQDNTWSI |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1110        | 1120       | 1130       | 1140        | 1150       |
| TCES  | AKITPITLVID | KADFAVGLTP | REGVLGEARN | YTLIVKHALT  | LEPVNPATVI |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1160        | 1170       | 1180       | 1190        | 1200       |
| TCES  | IGNYVLTDE   | NGVTFTYAP  | TKLGSDELTV | IVKENFNEL   | EKTFQITVSE |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1210        | 1220       | 1230       | 1240        | 1250       |
| TCES  | PEITEEDINE  | PKLAMSSPEA | NATIVSVEME | SEGGVKKVT   | VEITTINGAN |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1260        | 1270       | 1280       | 1290        | 1300       |
| TCES  | ETATIVVVP   | KKAENIEVSG | DHVISYSIEE | GEYAKVVIIT  | VKFPSPVTVT |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1310        | 1320       | 1330       | 1340        | 1350       |
| TCES  | VVTYIYAGR   | VSILTLNFLG | YSWVRLYSQK | FDELYQKALE  | LGVDNETLAL |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1360        | 1370       | 1380       | 1390        | 1400       |
| TCES  | ALSYHEKAKE  | YYEKALELSE | GNIIQYLGDI | RLLPPLRQAY  | INEMKAVKIL |
| サブチリシ |             |            |            |             |            |
| PFUL  | 1410        |            |            |             |            |
| TCES  | EKAIEELSGE  | E*         |            |             |            |



【図 8】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 浅田 起代蔵  
滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘3-20-9  
(72)発明者 加藤 郁之進  
京都府宇治市南陵町1-1-150

審査官 新留 豊

- (56)参考文献 特許第3516455 (JP, B2)

- (58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
C12N 9/52  
C12P 21/00 - 21/08  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DBL/GeneSeq