

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4589540号  
(P4589540)

(45) 発行日 平成22年12月1日(2010.12.1)

(24) 登録日 平成22年9月17日(2010.9.17)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 R	1/07	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 R	1/46	(2006.01)	C 1 2 R	1:07	
			C 1 2 N	15/00	Z N A A
			C 1 2 R	1:46	

請求項の数 1 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2001-14951 (P2001-14951)  
 (22) 出願日 平成13年1月23日(2001.1.23)  
 (65) 公開番号 特開2002-218977 (P2002-218977A)  
 (43) 公開日 平成14年8月6日(2002.8.6)  
 審査請求日 平成19年7月31日(2007.7.31)

微生物の受託番号 FERM BP-6532

(73) 特許権者 000000918  
 花王株式会社  
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1  
 〇号  
 (74) 代理人 110000084  
 特許業務法人アルガ特許事務所  
 (74) 代理人 100068700  
 弁理士 有賀 三幸  
 (74) 代理人 100077562  
 弁理士 高野 登志雄  
 (74) 代理人 100096736  
 弁理士 中嶋 俊夫  
 (74) 代理人 100089048  
 弁理士 浅野 康隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え遺伝子形成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

相同性をもつ2種の遺伝子を同一微生物体内で組換える方法であって、一の遺伝子が配列番号1で示される塩基配列又は該塩基配列に1個若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加した塩基配列又は配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列に連結してなる第1プラスミドベクターと、他の遺伝子が該第1プラスミドベクターとは異なる複製開始領域に連結してなるローリングサ-クル複製形式によって複製をするタイプの他のプラスミドベクターとをバチルス属細菌に導入し、該遺伝子間の相同組換えを生じさせる組換え遺伝子形成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物体内で組換え遺伝子を形成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

近年、様々な生物のゲノム情報の解明をはじめとして、遺伝子解析の研究が盛んに行われており、これに伴って遺伝子工学や蛋白工学の重要性が益々高くなっている。蛋白、DNA、RNAやそれらの複合体の立体構造が推定され、酵素など機能性分子の構造と機能の関係を解明する分野も進んできている。これら機能性分子の開発を行う上で、対象となる機能性分子にいかに多様性を持たせ、これら多様性分子から目的に適合する分子をいかに

効率よく探索していくかが非常に大事なポイントとなる。

【0003】

遺伝子に多様性をもたせる方法として目的遺伝子配列にランダムに変異を導入する方法が確立されてきた。ランダムに変異を導入する方法としては化学修飾剤を利用する方法やポリメラーゼチェーンリアクションによる遺伝子増幅を利用する方法が主たる方法とされている。

【0004】

しかしながら、ランダム変異法は試験管内で組換えを起こして目的遺伝子に多様性を持たせるために、これら組換え遺伝子をまた一つずつ生体内（微生物体内）に戻して目的に適合するものであるか否か調べるといふ余分な操作が必要である。特に、外来遺伝子による形質転換率の悪い宿主細胞や、生育の悪い宿主細胞に対してこの操作を行うのは非常に効率が悪いという問題があった。

【0005】

本発明は、遺伝子組換えによって目的遺伝子に多様性をもたせる場合において、微生物体内のままで組換え遺伝子の機能を評価し、目的遺伝子を微生物体内で直接探索することを可能とする組換え遺伝子の形成方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、組換え遺伝子の作製について検討した結果、特定の複製開始領域をもつDNA断片を含有するプラスミドベクターと、これと異なる複製開始領域をもつ異種プラスミドベクターのそれぞれに相同性をもつ遺伝子を含有させ、微生物中で共存させることにより、遺伝子間に存在する相同性領域によって遺伝子組換えが起き、多様性をもつ組換え遺伝子が形成されることを見出した。

【0007】

すなわち本発明は、相同性をもつ2種以上の遺伝子を同一微生物体内で組換える方法であって、一の遺伝子が配列番号1で示される塩基配列又は該塩基配列に1個以上の塩基が欠失、置換若しくは付加した塩基配列又は配列番号2で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列に連結してなる第1プラスミドベクターと、他の遺伝子が該第1プラスミドベクターとは異なる複製開始領域に連結してなる他のプラスミドベクターとを微生物に導入し、該遺伝子間の相同組換えを生じさせる組換え遺伝子形成方法を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明における第1プラスミドベクターは、一の遺伝子が配列番号1で示される塩基配列又は該塩基配列に1個以上の塩基が欠失、置換若しくは付加した塩基配列からなるDNA断片又は配列番号2で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列に連結してなるプラスミドベクターをいう。

【0009】

「一の遺伝子」とは、本発明方法により遺伝子組換えをして、多様性を付与すべき遺伝子であって、様々な酵素をコードする遺伝子や生体内の様々な機能、代謝調節に関与する遺伝子等をいい、一例を示せばアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、ペクチナーゼ、ブルナーゼ、ペルオキシダーゼ、オキシゲナーゼ、カタラーゼ等の酵素、インシュリン、人成長ホルモン、インターフェロン、カルシトニン、インターロイキン等の生理活性ペプチド、抗生物質耐性関与タンパク等をコードする遺伝子が挙げられる。

【0010】

これらの遺伝子は、それぞれ生体内において発現される、或いは生体機能において何らかの影響を示すことから、微生物体内において多様性を持たせればその影響は即座に検出でき、目的遺伝子の選択が大変効率的に行われる。

【0011】

また、第1プラスミドベクターは、配列番号1で示される塩基配列又は該塩基配列に1個以上の塩基が欠失、置換若しくは付加した塩基配列又は配列番号2で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものである。

斯かる塩基配列は、複製開始領域を示すが、これは所謂RCR(rolling circle-replicating)形態(Gros, M. F. et al., The EMBO Journal, 6, 3863-3869, (1987))を形成するグループには属さないと考えられる。また、当該塩基配列を持つ第1プラスミドベクターは、グラム陰性菌の1種から発見されたクロストリジウム由来のプラスミドpIP404(Garnier, T. and Cole, S.T., Plasmid, 19, 134-150(1988))の複製開始領域とアミノ酸配列で約40%の相同性を示し、それ以外のプラスミドの複製開始領域との相同性はアミノ酸配列で20%以下である新規なプラスミドである。

10

#### 【0012】

斯かる第1プラスミドにおける当該領域の変異の程度は、配列番号2中のアミノ酸番号1~432のうち40%以上の相同性を有しているのが好ましく、60%以上の相同性を有していることがより好ましく、70%以上の相同性を有しているのが特に好ましい。尚、「1個以上」とは、1個若しくは複数個又はそれ以上を意味する。当該塩基配列を有するプラスミドベクターの好適な例としては、例えばバチルスエスピーKSM-KP43株(FERM BP-6532)由来のプラスミドDNAが挙げられる。

#### 【0013】

本発明の第1プラスミドベクターを構築するためのプラスミドDNAは、例えばバチルスエスピーKSM-KP43株(FERM BP-6532)からアルカリ抽出法(Birnboim and Doly 1979 Nucleic Acids Res., 7:1513-1523)等の一般的なプラスミド回収法及び適当なプライマーを合成してのPCR法を用いることによって単離、取得することができ、得られたプラスミドDNAの複製開始領域を含むDNA断片と上記の改変を目的とする遺伝子を連結することにより、本発明の第1プラスミドベクターを構築することができる。

20

#### 【0014】

本発明においては、第1プラスミドベクターの他に、これとは異なる少なくとも1種の他のプラスミドベクターが用いられる。

斯かる「他のプラスミドベクター」とは、第1プラスミドベクターとは異なる複製開始領域を持ち且つ該プラスミドベクターと微生物中で共存できるものであって、第1プラスミドベクター上に存在する一の遺伝子と相同性を有する遺伝子が該複製開始領域に連結してなるものである。

30

他のプラスミドベクターが有する複製開始領域としては、特に限定はされないが、RCR形態を形成するタイプのものが比較的好ましく、斯かる複製開始領域を有するプラスミドベクターを用いることにより、第1プラスミドベクターとのより安定した共存が可能となる。

#### 【0015】

第1プラスミドベクターとは異なる複製開始領域を持ち、当該ベクターと共に微生物中で共存できるプラスミドベクターとしては、例えば、ストレプトコッカス フェーカリス(Streptococcus faecalis)由来のプラスミドpAM1(Clewill, D. B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1720-2724, (1975)やpHY300PLK(Ishiwa, H and Tsucida, N., Gene, 32, 129(1984))、スタフィロコッカス アウレウス(Staphylococcus aureus)由来のプラスミドpC194(Gros, M. F. et al., EMBO J., 6, 3863-3869 (1987))他、RCR形式(Gros, M. F. et al., The EMBO Journal, 6, 3863-3869, (1987))によってプラスミド複製をするタイプのプラスミド等が挙げられる。

40

#### 【0016】

かくして構築された第1プラスミドベクターと少なくとも1種類以上の他のプラスミドベクターをエレクトロポレーション法等により微生物に導入し、同一宿主内に共存させたままで増殖させておいて目的遺伝子間の相同組換えを生じさせることにより、組換え体を得

50

ることができる(図1参照)。

【0017】

ここで用いられる微生物としては、原核生物が好ましく、安全性や酵素の分泌性の点からバチルス属細菌がより好ましい。

【0018】

かくして、本発明の方法を用いれば、微生物体内において組換え遺伝子を形成することができる。

相同性組換えを利用して組換え遺伝子が作製された場合の多様性は、材料となる遺伝子同士の間隔が低ければ低い程、理論的にはほぼ無限種におよび、これを試験管内で構築して全て改めて宿主細胞に導入していくことは不可能に近い程困難であると考えられる。本発明の方法によれば、宿主体内での組換え遺伝子の創製は終わることなく無限に繰り返され、目的にあった組換え遺伝子が構築されたと同時にそれは表現系として形質転換体に現れることから、形質転換体のままの表現系でポジティブにスクリーニングを行えることができれば目的の遺伝子のみを優先的に取得できることになり効果的である。例えば、新規抗生物質耐性遺伝子の取得を試みる場合、耐性能力を有する遺伝子が構築されたと同時にこれが優先して生育ことになりスクリーニングが非常に容易となる。

【0019】

実施例

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

【0020】

実施例1

(1) バチルスエスピーKSM-KP43株由来のプラスミドDNAの複製開始領域を含むDNA断片から構築したプラスミドベクターpTS43TCの構築: バチルスエスピーKSM-KP43株由来プラスミドDNAの複製開始領域を含むDNA断片は以下の様に取得した。即ち、バチルスエスピーKSM-KP43株を0.5%ポリペプトン(日本製薬社製)、0.5%酵母エキス(ディフコ社製)、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.02%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、及び0.5%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>からなる培地100mLで30で12時間振盪培養した。遠心分離によって集めた菌体から、BirnboimとDolyの方法(Nucl. Acids. Res, 7, 1513-1523(1979))に従ってプラスミドDNAを取得した。該プラスミド約10ng、PCRバッファー(ベーリンガー Pwo DNAポリメラーゼ添付)10μL、2種類のオリゴヌクレオチド(プライマー3; 5'-GAATTCCTGCAAGAAAACGATTGTG-3'(配列番号3))、(プライマー4; 5'-AAGATGAGCTATAAGTCTTGTTAC-3'(配列番号4))20pmol、及び4種類のヌクレオチド(A, T, G, C)各20pmolを加え脱イオン水で100μLに調製した。94 2分間の処理後、94 1分、55 1分、72 2分の反応を1サイクルとして30サイクル繰り返し、最後に、72 5分間の反応をDNA Thermal Cycler(パーキン エルマー社)を用いて行った後、バチルスエスピーKSM-KP43株由来プラスミドDNAの複製開始領域を含む2.2kbpのDNA断片をThe GENECLEAN キット(バイオ101社製)を用いて単離し、さらにT4DNAポリメラーゼにより末端の平滑化を行った。

【0021】

次に、ストレプトコッカス フェーカリス由来プラスミドpAM 1上のテトラサイクリン遺伝子を含むDNA断片1.6kbpをPCRによって増幅した。ストレプトコッカス フェーカリス由来プラスミドpAM 1を鋳型として約1ng用い、PCRバッファー(ベーリンガー Pwo DNAポリメラーゼ添付)10μL、2種類のオリゴヌクレオチド(プライマー1; 5'-TGCAATGTGGAATTGGGAACGG-3'(配列番号5))、(プライマー2; 5'-CCCTTAACGATTTAGAAATCCC-3'(配列番号6))20pmol、及び4種類のヌクレオチド(A, T, G, C)各20pmolを加え脱イオン水で100μLに調製した。94 2分間の処理後、94 1分、55 1分、72 1分の反応を1サイクルとして30サイクル繰り返し、最後に、72 5分間の反応をDNA Thermal Cycler(パーキン エルマー社)を用いて行った後、テトラサイクリン遺伝

10

20

30

40

50

子を含むDNA断片1.6kbpをThe GENECLEAN キット (バイオ 101社製) を用いて単離し、さらにT4 DNAポリメラーゼにより末端の平滑化を行った後バチルスエスピー KSM-KP43株由来プラスミドDNAの複製開始領域を含むDNA断片2.2kbpとT4 DNAリガーゼで結合した。この結合反応物による枯草菌ISW1214株(Leu A8, metB8, hsrM1)の形質転換をプロトプラスト法(S. ChangとS. N. Choen; Mol. Gen. Genet., 168, 111-115 (1978))に従って行ない、5 µg/mLテトラサイクリンを含むプロトプラスト再生用DM3培地[0.5%コハク酸ナトリウム(pH7.3)、0.5%カザミノ酸、0.5%酵母エキス、0.35%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.15%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5%グルコース、20mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%牛血清アルブミン(シグマ社製)]を用いて形質転換体を選択した。

10

## 【0022】

組換え枯草菌の保持する組換えプラスミドをBirnboimとDolyの方法(Nucl. Acids. Res, 7, 1513-1523(1979))に従って調製し、得られた組換えプラスミドの制限酵素切断点の解析をアガロースゲル電気泳動法を用いて行って、プラスミドベクターpTS43TC(図2)を得た。

## 【0023】

(2) 遺伝子組換え体作製の材料としてpUB110由来のカナマイシン耐性遺伝子(205アミノ酸からなるカナマイシン耐性酵素; Sadaie, Y et al., J. Bacteriol. 141, 178-1182(1980))を用いた。

76番目のアミノ酸の位置が1bp欠落しその結果フレームシフトがなされているカナマイシン耐性遺伝子Aをコードする遺伝子をライゲーション反応によって上記(1)で構築されたpTS43TCと連結した。また、121番目のアミノ酸の位置が1bp欠落しその結果フレームシフトがなされているカナマイシン耐性遺伝子Bをライゲーション反応によってpAM1にクロラムフェニコール耐性遺伝子を連結したプラスミドと連結した。これら両プラスミドをエレクトロポレーション法によってバチルスエスピーKSM-KP43株に導入した。(尚、A、Bそれぞれの遺伝子のみによる形質転換体はカナマイシン耐性が無く、15 µg/mLのカナマイシンを含有するLB寒天培地(バクトトリプトン 1%、塩化ナトリウム 1%、酵母エキス 0.5%、炭酸ナトリウム 0.05%、寒天 1.5%)で生育できないことは事前に確かめた)。

20

## 【0024】

次に、両プラスミドを含有する形質転換体をLB寒天培地(バクトトリプトン1%、塩化ナトリウム 1%、酵母エキス 0.5%、炭酸ナトリウム 0.05%、寒天 1.5%、テトラサイクリン 10 µg/mL、クロラムフェニコール5 µg/mL)上で2日間生育させ、更にこの生育菌体を集めて1000倍希釈した後、再び同LB寒天培地上で2日間生育させた。続いて、この生育菌体を集めて100倍希釈した後、カナマイシン15 µg/mL入りのLB寒天培地に蒔き、2日間インキュベートを行った。その結果、数百個の形質転換体が出現した。出現した形質転換体からプラスミドを調製し、その配列を解析したところカナマイシンに耐性を示す能力の有る蛋白をコードしている遺伝子が検出された。

30

## 【0025】

## 実施例2

カナマイシン耐性タンパクの1~178番目までのアミノ酸をコードする遺伝子と同カナマイシン耐性遺伝子の調節領域を含むカナマイシン耐性遺伝子C(約800塩基)をライゲーション反応によって実施例1(1)で構築されたpTS43TCと連結した。また、102番目のアミノ酸から終始コドンを含むカナマイシン耐性遺伝子D(約650塩基)をライゲーション反応によってpC194プラスミドと連結した。これら両プラスミドをエレクトロポレーション法によってBacillus subtilis ISW1214株に導入した(尚、C、Dそれぞれの遺伝子のみによる形質転換体はカナマイシン耐性が無く、10 µg/mLのカナマイシンを含有するLB寒天培地(バクトトリプトン 1%、塩化ナトリウム 1%、酵母エキス 0.5%、寒天 1.5%)では生育できないことは事前に確かめた)。

40

50

次に、両プラスミドを含有する形質転換体をLB液体培地（バクトトリプトン1%、塩化ナトリウム 1%、酵母エキス 0.5%、テトラサイクリン 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、クロラムフェニコール 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で1日間生育させ、培養液10  $\mu\text{L}$ をカナマイシン15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 入りのLB寒天培地に蒔き、1日間インキュベートを行った。その結果、数百個の形質転換体が出現した。出現した形質転換体からプラスミドを調製し、その配列を解析したところカナマイシンに耐性を示す能力の有る蛋白をコードしている遺伝子が検出された。

【0026】

【発明の効果】

本発明の組換え遺伝子形成方法を用いれば、微生物体内のままに組換え遺伝子の機能の評価し、目的遺伝子を直接探索することが可能である。すなわち、従来の遺伝子組換え操作において行われているような組換え遺伝子をまた一つずつ微生物体内に戻すという余分な操作を行うことなく目的遺伝子を探索できる。

【0027】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KAO CORPORATION

&lt;120&gt; Method of forming recombinant genes

&lt;130&gt; P00181301

10

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2263

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus sp. KSM-KP43

20

&lt;400&gt; 1

agatgagcta taagtcttgt tacggttccg aacceaaccc gtttgatgaa cacataatga 60  
 atttgaagga attagcagtt gaattaggaa acacigaagt gattactgtt attgcagact 120  
 attttaagtc cgatataaca gggttaacca aatctcagag gaagacctta aagaagtttc 180  
 tggacttgaa atatigggag aacatactc ctgttaagta gtatatgtta agtggttacat 240  
 gttatatggt atatgttaag tggtatgata tacacacttg aatctattga ttccatacca 300  
 ctcaataaag attttattat ttaaaaagaa ttagagaaat tataaacatc cttcttcitt 360  
 gtcctttttt gaaaaacaaa aaggactttt ctgttttcaa tatcatcttg gaattigtit 420  
 ttctgacaga caatagcacc agatacaaaa ttctgatagt attatagaca aagaaaaaac 480  
 tccctcaagg ttggcggcc aacgggagtt ctgtgcaag ggattagtgt accctttiga 540  
 cattgtatit aatttatit taccacaaat atatcatagg tacacgtccc ttccactat 600  
 gaaaggggaa aaaataatgg aaaatgcaaa ctccattcag aaggcgcaat atcacgccig 660  
 gttccaacat agtgaigctg atggatggat tacagtagca agaaaaggig agagtaatag 720  
 cttcatccag aaacactata agcctactga acttgccggac aagctgacag aatggtagg 780  
 agaagatgia ttctttagcc aaaatacatt ttatcggcca caaagaagca tagagaacgt 840

30

40

ccggcaatta cggiccttat atactgactt ggatititit ttatttact acgatccatc 900  
 ctgggtgatg gggaaactgc agcatgaatt ttttggccaa tcgataccag aaccgaactt 960  
 aattatitit agtggccaag gaatcgittt gatatggttg ttggatcctg tacctcataa 1020  
 agctctaccc ttaiggcaag ctgtgcaaaa tcatttctta agccaattag aagagcttgg 1080  
 tggagatccg aaagctgctg atgctgcacg agtattccgt attgctggta gigttaatic 1140  
 taagaacggg gcagaagtga gagcagagtt ccgiccatgat cataagtacc aacttaggca 1200  
 gctgcaatat gattacttac cggagcittaa cgatgagata aatccaccta agaagaaaaa 1260  
 aagaggacgc aagaaacggg tagcgcagtt atitaaatac tacaactgc attacgcacg 1320  
 tctgatggat ttagtgagat tggtagagtt gagaaactac caggtagaagg gtcatagaga 1380  
 gttaatctgc tttttatacc gatattggca atgttgcctat tcaaacgatc cgtcagaagc 1440  
 cctgaatcag accatgacgc ttaattigca gtttccggca cccttaaccc tccgagaagt 1500  
 ggaaagagcc accagaagcg ccgagaaaagc ttgggaagct cgtaacaacg aagaagctaa 1560  
 taaaattgca atcgataaag gttatccagg agccggctat aatattagca ataaaaagct 1620  
 aatttcttgg cttgatatct ctccgatga aatgacgcat ttatcgacca ttatagacgg 1680  
 tttagagaag aacagaagga aacgtattgc caacatggaa atgcgccgag aacagggcgt 1740  
 gaagcctcgt gaagagtata taaaagagca acatgctaaa acagataacc aattaacgaa 1800  
 cctgcagcaa gcattgcaag aaaatccgaa ggcaaaacgg aaggatttag ctgctatatt 1860  
 aggtgtttct gtgtttcgta ttgatcagtt aaaacgacaa ttaaaaagtt tgtagtggic 1920  
 tgtacgccta tattatgggc gttagccctgt gggitttaatt tgaggctttt tggggggcct 1980  
 cttttgcttt tcttctgggg gaggatcctg gcgttacatc atgttccctt tgtatcgaga 2040  
 agttattccg tgcitattct actttacttt tcttgagcta ctccaaaat acggagattt 2100  
 taggtgattt atatactgtt ttataaatt tgtctccaaa aagtatattt catatgttat 2160  
 aattaanaagt tttaaaaaat atattgaccg aacatatgtt agtgitttat aattaaggta 2220  
 ggtcattaat acaactccca caatcgittt ctgacaggaa ttc 2263

10

20

30

<210>2

<211>432

<212>PRT

<213>Bacillus sp. KSM-KP43

40

&lt;400&gt;2

Met Glu Asn Ala Asn Ser Ile Gln Lys Ala Gln Tyr His Ala Trp Phe  
                                   5                                  10                                  15  
 Gln His Ser Asp Ala Asp Gly Trp Ile Thr Val Ala Arg Lys Gly Glu  
                                   20                                  25                                  30  
 Ser Asn Ser Phe Ile Gln Lys His Tyr Lys Pro Thr Glu Leu Ala Asp  
                                   35                                  40                                  45  
 Lys Leu Thr Glu Trp Leu Gly Glu Asp Val Phe Phe Ser Gln Asn Thr  
                                   50                                  55                                  60  
 Phe Tyr Arg Pro Gln Arg Ser Ile Glu Asn Val Arg Gln Leu Arg Ser  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Leu Tyr Thr Asp Leu Asp Phe Tyr Leu Phe Asn Tyr Asp Pro Ser Trp  
                                   85                                  90                                  95  
 Val Met Gly Lys Leu Gln His Glu Phe Phe Gly Gln Ser Ile Pro Glu  
                                   100                                  105                                  110  
 Pro Asn Leu Ile Ile Phe Ser Gly Gln Gly Ile Val Leu Ile Trp Leu  
                                   115                                  120                                  125  
 Leu Asp Pro Val Pro His Lys Ala Leu Pro Leu Trp Gln Ala Val Gln  
                                   130                                  135                                  140  
 Asn His Phe Leu Ser Gln Leu Glu Glu Leu Gly Gly Asp Pro Lys Ala  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Ala Asp Ala Ala Arg Val Phe Arg Ile Ala Gly Ser Val Asn Ser Lys  
                                   165                                  170                                  175  
 Asn Gly Ala Glu Val Arg Ala Glu Phe Arg His Asp His Lys Tyr Gln  
                                   180                                  185                                  190  
 Leu Arg Gln Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Pro Glu Leu Asn Asp Glu Ile  
                                   195                                  200                                  205  
 Asn Pro Pro Lys Lys Lys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Arg Val Ala Gln

10

20

30

40

210	215	220	
Leu Phe Asn Thr Tyr Lys	Leu His Tyr Ala Arg	Leu Met Asp Leu Val	
225	230	235	240
Arg Leu Val Glu Leu Arg	Asn Tyr Gln Val Lys Gly	His Arg Glu Leu	
	245	250	255
Ile Cys Phe Leu Tyr Arg	Tyr Trp Gln Cys Cys Tyr	Ser Asn Asp Pro	
	260	265	270
Ser Glu Ala Leu Asn Gln	Thr Met Thr Leu Asn Leu	Gln Phe Ser Ala	10
	275	280	285
Pro Leu Thr Leu Arg Glu	Val Glu Arg Ala Thr Arg	Ser Ala Glu Lys	
	290	295	300
Ala Trp Glu Ala Arg Asn	Asn Glu Glu Ala Asn Lys	Ile Ala Ile Asp	
305	310	315	320
Lys Gly Tyr Pro Gly Ala	Gly Tyr Asn Ile Ser Asn	Lys Lys Leu Ile	20
	325	330	335
Ser Trp Leu Asp Ile Ser	Ser Asp Glu Met Thr His	Leu Ser Thr Ile	
	340	345	350
Ile Asp Gly Leu Glu Lys	Asn Arg Arg Lys Arg Ile	Ala Asn Met Glu	
	355	360	365
Met Arg Arg Glu Gln Gly	Val Lys Pro Arg Glu Glu	Tyr Ile Lys Glu	
	370	375	380
Gln His Ala Lys Thr Asp	Asn Gln Leu Thr Asn Leu	Gln Gln Ala Leu	
385	390	395	400
Gln Glu Asn Pro Lys Ala	Lys Arg Lys Asp Leu Ala	Ala Ile Leu Gly	
	405	410	415
Val Ser Val Phe Arg Ile	Asp Gln Leu Lys Arg Gln	Leu Lys Ser Leu	
	420	425	430

10

20

30

40

(210)3

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>3

gaattcctgc aagaaaacga ttgtg 25

10

<210>4

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>4

aagatgagct ataagtccttg ttac 24

20

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>5

tgcaatgtgg aattgggaac gg 22

30

<210>6

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>6

cccttaacga tttagaaatc cc 22

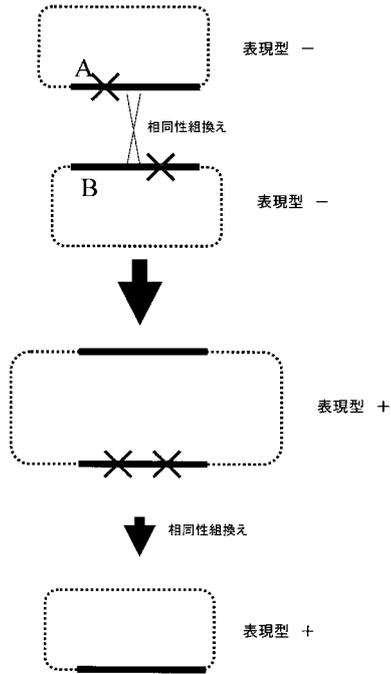
40

【図面の簡単な説明】

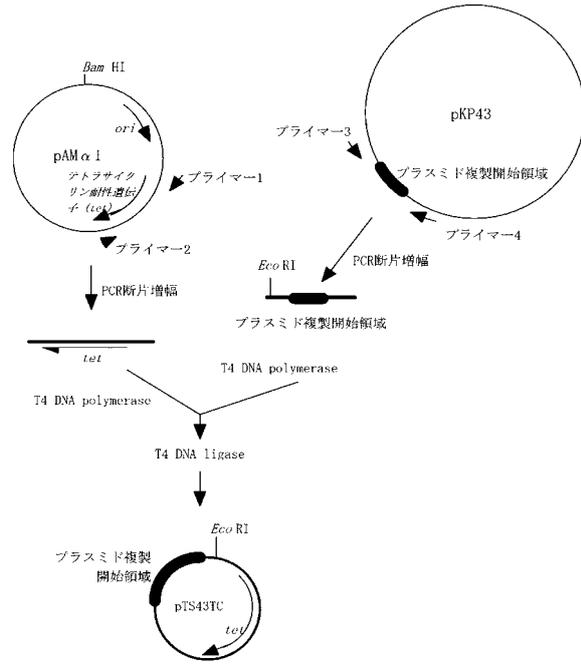
【図 1】本発明の組換え遺伝子の形成方法を示した概念図である。

【図 2】プラスミドベクター p T S 4 3 T C の構築の過程を示す図である。

【図1】



【図2】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100101317  
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100117156  
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028  
弁理士 山本 博人
- (72)発明者 秦田 勇二  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 小川 晃範  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 佐伯 勝久  
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 2 8 7 6 8 7 ( J P , A )  
特開平 1 0 - 2 2 9 8 7 9 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C12N 15/00-15/90
  - CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
  - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
  - GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
  - UniProt/GeneSeq
  - WPI