

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3937726号

(P3937726)

(45) 発行日 平成19年6月27日(2007.6.27)

(24) 登録日 平成19年4月6日(2007.4.6)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 13/14 (2006.01)

C 1 2 P 13/14 A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/06 (2006.01)

C 1 2 N 9/06

C 1 2 R 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 4 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-506337(P2000-506337)

(73) 特許権者 000000066

(86) (22) 出願日 平成10年8月7日(1998.8.7)

味の素株式会社

(86) 国際出願番号 PCT/JP1998/003535

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(87) 国際公開番号 W01999/007853

(74) 代理人 100089244

(87) 国際公開日 平成11年2月18日(1999.2.18)

弁理士 遠山 勉

審査請求日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(74) 代理人 100090516

(31) 優先権主張番号 特願平9-216906

弁理士 松倉 秀実

(32) 優先日 平成9年8月12日(1997.8.12)

(74) 代理人 100100549

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

弁理士 川口 嘉之

(72) 発明者 菅野 壮平

微生物の受託番号 FERM BP-5189

日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1

味の素株式会社 発酵技術研究

所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵法によるL-グルタミン酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L-グルタミン酸生産能を有するコリネバクテリウム属細菌の菌株を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを培養液から採取することを特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造法であって、

前記菌株は、前記菌株細胞内のグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、または前記菌株細胞内のグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子のプロモーターを改変することによって細胞中のグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ活性が増幅された菌株であることを特徴とする、L-グルタミン酸の製造法。

【請求項2】

グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である請求項1記載のL-グルタミン酸の製造法。

【請求項3】

グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子がコリネバクテリウム属細菌由来である請求項1記載のL-グルタミン酸の製造法。

【請求項4】

コリネバクテリウム属細菌由来のグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子が、配列番号7に示す塩基配列のうち、少なくとも塩基番号565~6614からなる塩基配列を有する請求項3記載のL-グルタミン酸の製造法。

10

20

## 【発明の詳細な説明】

## 技術分野

本発明は、発酵法によるL-グルタミン酸の製造法に関する。L-グルタミン酸は、食品、医薬品等として重要なアミノ酸である。

## 背景技術

従来、L-グルタミン酸は、主としてプレバクテリウム属、コリネバクテリウム属またはミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型L-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（アミノ酸発酵、学会出版センター、195～215頁、1986年）。その他の菌株を用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物を用いる方法（米国特許第3,220,929号）、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の微生物を用いる方法（米国特許第3,563,857号）等が知られている。従来の方法によりL-グルタミン酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なL-グルタミン酸の製造法の開発が求められている。

10

L-グルタミン酸は微生物菌体内でクエン酸回路の中間生成物である - ケトグルタル酸から生合成されるが、アンモニウムイオンを同化して - ケトグルタル酸からL-グルタミン酸を生成する生合成経路は2つ存在する。一つは、高濃度のアンモニウムイオン存在下でグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下「GDH」と略す）の触媒作用により合成される経路であり、もう一つは、L-グルタミン酸とアンモニウムイオンからグルタミンへの反応を触媒するグルタミンシンターゼ（以下「GS」と略す）およびGSによって生成したグルタミン1分子と - ケトグルタル酸1分子から2分子のL-グルタミン酸を生成する反応を触媒するグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（グルタミン酸シンターゼとも呼ばれる。以下「GOGAT」と略す）によって合成される経路（GS/GOGAT経路）である。これまでGDH活性の増強によりGDH経路を強化した菌株によるL-グルタミン酸生産は報告されているが、GS/GOGAT経路を強化した菌株によるL-グルタミン酸生産は知られていなかった。

20

## 発明の開示

本発明の目的は、L-グルタミン酸の需要の一層の増大に応えるために、高いL-グルタミン酸生産能を有する菌株を育種し、より安価かつ効率的なL-グルタミン酸の製造法を提供することにある。

30

本発明者らは、GS/GOGAT経路にかかわる酵素のうちL-グルタミン酸生成を触媒するGOGATを強化した菌株によるL-グルタミン酸の製造法についての研究を行った結果、コリネバクテリウム属細菌に属し、GOGAT活性が増幅され、かつL-グルタミン酸生産能を有する菌株が高いL-グルタミン酸生産能を持つことを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、コリネバクテリウム属細菌に属し、細胞中のGOGAT活性が増幅され、かつL-グルタミン酸生産能を有する菌株を提供するものである。前記グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ活性は、細胞内のグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって増幅することができる。また、グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ活性は、該酵素をコードする遺伝子の発現調節配列の改変によっても増幅することができる。グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼとしては、例えばエシェリヒア属細菌又はコリネバクテリウム属細菌由来のものが挙げられる。

40

本発明はまた、コリネバクテリウム属細菌由来のグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子であって、配列番号7に示す塩基配列のうち、少なくとも塩基番号565～6614からなる塩基配列を有することを特徴とする遺伝子を提供する。

また、本発明は、コリネバクテリウム属細菌に属し、GOGAT活性が増幅され、かつL-グルタミン酸生産能を有する菌株を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を

50

生成蓄積せしめ、これを培養液から採取することを特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造法を提供するものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) L-グルタミン酸生産能を有するコリネバクテリウム属細菌

本発明にいうコリネバクテリウム属細菌とは、バーヂーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたプレバクテリウム属細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)) を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌及びマイクロバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネバクテリウム属細菌のうち、以下に述べるようなL-グルタミン酸生産性細菌として知られているものが本発明においては、最も好ましいものである。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

プレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

プレバクテリウム・サッカロリティカム

プレバクテリウム・インマリオフィラム

プレバクテリウム・ロゼウム

プレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

プレバクテリウム・チオゲニタリス

具体的には、下記の菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ

ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム

ATCC 13032

コリネバクテリウム・グルタミカム

ATCC 13060

プレバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム

ATCC 13869

コリネバクテリウム・リリウム

ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ATCC 17965

プレバクテリウム・サッカロリティカム

ATCC 14066

プレバクテリウム・インマリオフィラム

ATCC 14068

プレバクテリウム・ロゼウム

ATCC 13825

プレバクテリウム・フラバム

ATCC 13826

プレバクテリウム・チオゲニタリス

ATCC 19240

これら入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各微生物ごとに対応する登録番号が付与されており、この登録番号を引用して分譲を受けることができる。各微生物に対応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。

上記のコリネバクテリウム属細菌を用いてL-グルタミン酸を生産するには次のいずれかの手段が有効である。

1. 培地中のピオチン濃度を最適以下 (suboptimal) にする。

奥村真二、都河竜一郎、角田俊直、北井淳夫：日本農芸化学会誌，36，197-203

10

20

30

40

50

(1962) 参照。

2. ビオチンが十分量存在する条件で培地に界面活性剤を添加する。

I. Shio, H. Otsuka, N. Atsuya: J. Biochem., 53, 333-340 (1963) 及び K. Takinami, H. Okada, T. Tsunoda: Agr. Biol. Chem., 27, 853-863 (1963) 参照。

3. ビオチンが十分量存在する条件で培地にペニシリンを添加する。

米国特許第3,080,297号、特公昭37-1695号及び 渋川満、栗間理夫、岡部節三、大沢岳義: Amino Acid and Nucleic Acid, 17, 61-65 (1968) 参照。

または、上記のコリネバクテリウム属細菌から誘導された変異株を用いる方法によっても L-グルタミン酸を生産することが可能である。このような変異株としては、例えば、

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12475 (FERM-BP2922、米国特許第5,272,067号公報)

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12476 (FERM-BP2923、米国特許第5,272,067号公報)

プレバクテリウム・フラバム AJ12477 (FERM-BP2924、米国特許第5,272,067号公報)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12478 (FERM-BP2925、米国特許第5,272,067号公報)

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC21492

等がある。

本発明では、上記に記載したような L-グルタミン酸生産性菌株を用いることに最も好ましいものである。

#### (2) GOGAT 活性の増幅

細菌細胞中の GOGAT 活性を増幅するには、GOGAT をコードする遺伝子断片を、コリネバクテリウム属細菌で機能するベクターと連結して組み換え DNA を作製し、これをコリネバクテリウム属細菌に属し、かつ L-グルタミン酸生産能を有する宿主に導入して形質転換すればよい。GOGAT は、大サブユニットと小サブユニットからなるヘテロオリゴマーであり、それぞれ gltB 遺伝子および gltD 遺伝子にコードされている。形質転換株の細胞内の GOGAT をコードする遺伝子（以下、「gltBD 遺伝子」と略する）のコピー数が上昇する結果、GOGAT 活性が増幅される。

gltBD 遺伝子は、コリネバクテリウム属細菌の遺伝子を用いることも、エシェリヒア・コリ等の他の生物由来の遺伝子を用いることも可能である。コリネバクテリウム属細菌の gltBD 遺伝子の塩基配列は明らかではなかったが、エシェリヒア・コリ K-12 (Gene, 第60巻、1~11頁、1987年) 及び酵母 (サッカロマイセス・セレビシエ、GenBank accession No. X89221) の gltBD 遺伝子は既に塩基配列が明らかにされていることから、これらの gltBD 遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリ K-12 及びプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 等の微生物の染色体 DNA を鋳型にして PCR 法により、これらの微生物の gltBD 遺伝子を取得することが可能である。このようなプライマーとして、配列表配列番号 3~6 に示す塩基配列を有するプライマーが挙げられる。後記実施例で単離されたプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 の gltBD 遺伝子の塩基配列を配列表配列番号 7 に示す。このプレバクテリウム・ラクトファーメンタムの gltBD 遺伝子は、新規な遺伝子である。

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19 等が挙げられる。

コリネバクテリウム属細菌で機能するベクターとは、例えばコリネバクテリウム属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的に例示すれば、以下のものが挙げられる。

pAM 330 特開昭58-67699号公報参照

10

20

30

40

50

p H M	1 5 1 9	特開昭 5 8 - 7 7 8 9 5 号公報参照
p A J	6 5 5	特開昭 5 8 - 1 9 2 9 0 0 号公報参照
p A J	6 1 1	同 上
p A J	1 8 4 4	同 上
p C G	1	特開昭 5 7 - 1 3 4 5 0 0 号公報参照
p C G	2	特開昭 5 8 - 3 5 1 9 7 号公報参照
p C G	4	特開昭 5 7 - 1 8 3 7 9 9 号公報参照
p C G	1 1	同 上

G O G A T をコードする *g l t B D* 遺伝子とコリネバクテリウム属細菌で機能するベクターを連結して組み換え DNA を調製するには、*g l t B D* 遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T 4 DNA リガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である

10

上記のように調製した組み換え DNA をコリネバクテリウム属細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K - 1 2 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理して DNA の透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製して DNA を導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母

20

G O G A T 活性の増幅は、*g l t B D* 遺伝子を上記宿主の染色体 DNA 上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネバクテリウム属細菌に属する微生物の染色体 DNA 上に *g l t B D* 遺伝子を多コピーで導入するには、染色体 DNA 上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体 DNA 上に多コピー存在する配列としては、レペッティブ DNA、転移因子の端部に存在するインパーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平 2 - 1 0 9 9 8 5 号公報に開示されているように、*g l t B D* 遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体 DNA 上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内の *g l t B D* 遺伝子のコピー数が上昇する結果、G O G A T 活性が増幅される。

30

G O G A T 活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、*g l t B D* 遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。たとえば、*l a c* プロモーター、*t r p* プロモーター、*t r c* プロモーター、*t a c* プロモーター、ラムダファージの  $P_R$  プロモーター、 $P_L$  プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、*g l t B D* 遺伝子の発現が強化されることによって G O G A T 活性が増幅される。

40

### (3) 本発明の菌株を用いた L - グルタミン酸の生産

コリネバクテリウム属細菌に属し、G O G A T 活性が増幅され、かつ L - グルタミン酸生産能を有する菌株を用いて L - グルタミン酸を生産させるには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源及び窒素源は、培養する菌株の利用可能なものならばい

50

れの種類を用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸等も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白分解物等が使用され、生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添する事が必要である。

10

無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

培養方法は、発酵温度 20 ~ 45、pH を 5 ~ 9 に制御しつつ通気培養を行う。培養中に pH が下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして 10 時間 ~ 4 日間程度培養することにより培養液中に著量の L - グルタミン酸が蓄積される。

培養終了後の培養液から L - グルタミン酸を採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって採取される。

20

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

##### 実施例 1

##### (1) エシェリヒア・コリ K - 12 の g l t B D 遺伝子のクローニング

エシェリヒア・コリ K - 12 の g l t B D 遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている (Gene、第 60 巻、1 ~ 11 頁、1987 年)。報告されている塩基配列に基づいて配列表配列番号 1 及び 2 に示すプライマーを合成し、エシェリヒア・コリ K - 12 由来 J M 109 株 (宝酒造社製) の染色体 DNA を鋳型にして PCR 法により g l t B D 遺伝子を増幅した。

合成したプライマーの内、配列番号 1 は、Gene、第 60 巻、6 頁、1987 年に記載されている g l t B D 遺伝子の塩基配列図の 57 番目から 96 番目の塩基に至る配列に相当するが、77 番目と 78 番目の塩基 A を G に変更し、制限酵素 BamHI の認識配列を挿入している。配列番号 2 は、Gene、第 60 巻、7 頁、1987 年に記載されている g l t B D 遺伝子の塩基配列図の 6261 番目から 6290 番目の塩基に至る配列に相当するが、6380 番目の塩基 T を G に、6282 番目の塩基 A を T に、6284 番目の A を C に変更し、制限酵素 BamHI の認識配列を挿入した。尚、配列番号 2 に記載した塩基配列は、Gene、第 60 巻、7 頁、1987 年に示された塩基配列図の 6261 番目から 6290 番目に至る塩基配列の逆ストランドを 5' 側から表記したものである。

30

エシェリヒア・コリ K - 12 の染色体 DNA の調製は常法によった (生物学実験書、日本生物工学会編、97 ~ 98 頁、培風館、1992 年)。また、PCR 反応は、PCR テクノロジー (ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989 年) 8 頁に記載されている標準反応条件を用いた。

40

生成した PCR 産物を常法により精製後、制限酵素 BamHI を反応させ、BamHI で切断した pMW219 (ニッポンジーン製) とライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結した後、エシェリヒア・コリ J M 109 のコンピテントセル (宝酒造社製) を用いて形質転換を行い、IPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) 10  $\mu$ g / ml、X - Gal (5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトシド) 40  $\mu$ g / ml 及びカナマイシン 25  $\mu$ g / ml を含む L 培地 (バクトトリプトン 10 g / l、バクトイーストエキストラクト 5 g / l、NaCl 5 g / l、寒天 15 g / l、pH 7.2) に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニ

50

一分離し、形質転換株を得た。

形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製した後、ベクターに挿入されたDNA断片の制限酵素地図を作成し、報告されているgltBD遺伝子の制限酵素地図と比較し、同一制限酵素地図を有するDNA断片が挿入されているプラスミドをpMWGOGAT35と名づけた。

さらにgltBD遺伝子が発現していることを確認するため、pMWGOGAT35をgdhとgltBの欠損株でL-グルタミン酸要求性を示すエシェリヒア・コリPA340株（*E. coli Genetic stock center* (Yale University, U.S.A.))にエレクトロポレーション法により導入したところ、pMWGOGAT35を導入した形質転換株は、L-グルタミン酸要求性を示さなくなったことから、gltBD遺伝子が発現していることを確認した。

(2) エシェリヒア・コリK-12株のgltBD遺伝子およびコリネバクテリウム属細菌の複製起点を有するプラスミドの作成

エシェリヒア・コリK-12株のgltBD遺伝子およびコリネバクテリウム属細菌の複製起点を有するプラスミドpBD35-43の構築過程を図1に示した。具体的には、既取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519（*Agric. Biol. Chem.*, 48, 2901-2903 (1984))由来の複製起点（特開平5-7491号）を持つプラスミドpHK4（特開平5-7491号）を制限酵素BamHI及びKpnIで消化して、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット（宝酒造社製、Blunting kit）を用い平滑末端化した後、XbaIリンカー（宝酒造社製）を用いて、クローニングしたエシェリヒア・コリK-12株のgltBD遺伝子を挿入したプラスミドpMWGOGAT35のXbaIサイトに挿入した。本プラスミドをpBD35-43と名付けた。(3) コリネバクテリウム属細菌野生型株AJ12036及びAJ13029へのpBD35-43の導入と培養評価

コリネバクテリウム属細菌野生型株AJ12036（*Agric. Biol. Chem.*, 51, 93-100 (1987))及びAJ13029を電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）によりプラスミドpBD35-43で形質転換し、形質転換株を得た。野生型株のAJ12036にプラスミドpBD35-43を導入して得られた形質転換株AJ12036/pBD35-43は、ビオチン制限法によるL-グルタミン酸生産のための培養を以下のように行った。25μg/mLのカナマイシンを含むCM2Bプレート培地にて培養して得たAJ12036/pBD35-43株の菌体を、グルコース80g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.4g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、MnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、大豆加水分解液15ml、サイアミン塩酸塩200μg、ビオチン60μg、カナマイシン25mg及びCaCO<sub>3</sub> 50gを純水1L中に含む培地（KOHを用いてpH8.0に調整されている）に接種し31.5にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。得られた培養物を、ビオチンおよびカナマイシンを添加していないこと以外は同じ組成の培地（以下、「ビオチン制限培地」という）に5%量接種し、31.5にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとしてAJ12036株を上記と同様にして培養した。培養終了後、培養液中のL-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザーAS-210により測定した。このときの結果を表1に示した。

10

20

30

40

表 1

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 (g/L)
A J 1 2 0 3 6	3 4 . 3
A J 1 2 0 3 6 / pBD35-43	3 6 . 8

また、A J 1 3 0 2 9 にプラスミド p B D 3 5 - 4 3 を導入して得られた形質転換株 A J 1 3 0 2 9 / p B D 3 5 - 4 3 を用いて L - グルタミン酸生産のための培養を以下のように行った。2.5 μg / mL のカナマイシンを含む C M 2 B プレート培地にて培養して得た A J 1 3 0 2 9 / p B D 3 5 - 4 3 株の菌体を、グルコース 30 g、K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> 1 g、M g S O <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.4 g、( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 30 g、F e S O <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.01 g、M n S O <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.01 g、大豆加水分解液 15 mL、サイアミン塩酸塩 200 μg、ビオチン 60 μg、カナマイシン 25 mg 及び C a C O <sub>3</sub> 50 g を純水 1 L 中に含む培地 ( K O H を用いて p H 8 . 0 に調整されている ) に接種し 3 1 . 5 にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとして A J 1 2 0 2 9 株を上記と同様にして培養した。培養終了後、培養液中の L - グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザー A S - 2 1 0 により測定した。このときの結果を表 2 に示した。なお、A J 1 2 0 2 9 株は W O 9 6 / 0 6 1 8 0 に記載される、ビオチン活性抑制物質への温度感受性を示す株である。同株は 1 9 9 5 年 8 月 1 日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 ( 郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6 日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番 3 号 ) にプタベスト条約に基づいて寄託された。同株の受託番号は F E R M B P - 5 1 8 9 である。

表 2

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 (g/L)
A J 1 3 0 2 9	1 6 . 5
A J 1 3 0 2 9 / pBD35-43	1 7 . 7

以上の結果から、g l t B D 遺伝子の導入して G O G A T 活性を増強したコリネバクテリウム属細菌に属する L - グルタミン酸生産菌は、L - グルタミン酸収率が向上することが判明した。

#### 実施例 2

( 1 ) プレバクテリウム・ラクトファーマンタム A T C C 1 3 8 6 9 の g l t B D 遺伝子のクローニング

コリネバクテリウム属細菌を用いてグルタミン酸を製造するにあたり、g l t B D 遺伝子を増幅する際に、その g l t B D 遺伝子はコリネバクテリウム属細菌由来であることが好ましい。

大腸菌と酵母の g l t B 遺伝子産物間でアミノ酸配列の相同性の高い領域を選び、その配列から塩基配列を推定し、配列番号 3 および配列番号 4 に示すオリゴヌクレオチドを合成した。一方、Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp. 製) を用いて、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム A T C C 1 3 8 6 9 の染色体 DNA を調製した。この染色体 DNA を鋳型とし、前記オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、PCR テクノロジー (ヘンリー・エーリッヒ編、ストックトンプレス、1989 年) 8 頁に記載されている標準反応条件で PCR を行った。PCR 産物をアガロース

ゲル電気泳動したところ、約1.4キロベースのDNA断片が増幅されていることが判明した。

得られたDNAは、配列番号3および配列番号4に示すオリゴヌクレオチドを用いて両端の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いてSangerの方法(J. Mol. Biol., 143, 161 (1980))に従って行った。決定された塩基配列をアミノ酸配列に翻訳して、大腸菌と酵母のgl t B遺伝子から予想されるアミノ酸配列と比較したところ、相同性が高かったので、PCRにより増幅したDNA断片はブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869のgl t B遺伝子の一部であると判断した。このPCR増幅DNA断片をプローブとし、上記の方法で調製したブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869の染色体DNAを定法によりEcoRI、BamHI、HindIII、PstI、SalI(宝酒造社製)で切断した断片について、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、HindIIIで切断された約1.4キロベースの切断断片がプローブDNAとハイブリダイズすることが判明した。

10

そこで、定法により調製したブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869染色体DNAのHindIII断片をアガロース電気泳動し、約10キロベース以上のDNA断片をガラスパウダーを用いて回収し、回収されたDNA断片と制限酵素HindIII(宝酒造社製)で切断したベクターpMW219(ニッポンジーン製)はライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結し、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造社製)を用いて形質転換を行った。形質転換株をIPTG(イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド)10μg/ml、X-Gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトシド)40μg/ml及びカナマイシン25μg/mlを含むL培地(バクトトリプトン10g/l、バクトイーストエキストラクト5g/l、NaCl5g/l、寒天15g/l、pH7.2)に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、約1,000個の形質転換体を得た。

20

得られた形質転換体は、アルカリ法(生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年)を用いてプラスミドを調製した。プローブとして用いたDNA配列の中で塩基配列が決定している部分をもとに作製した配列番号5および配列番号6に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、上記プラスミドを鋳型として上記の条件でPCRを行い、このプライマーを用いてブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869の染色体を鋳型としてPCRを行った時に増幅されるDNA断片と同じ約1.3キロベースの大きさの増幅断片が得られるプラスミドを保持する形質転換体を選択した。

30

(2)ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869 gl t B D 遺伝子の塩基配列の決定

上記(1)により得られた形質転換体からアルカリ法により調製したプラスミドDNAは、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869染色体由来の約1.4

40

キロベースのDNA断片を含んでいた。上記の方法と同様にして、得られたプラスミドのブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869染色体由来の約1.4キロベースのDNA断片に含まれるgl t B D 遺伝子の塩基配列決定を行った。こうして決定された塩基配列のうち、gl t B D 遺伝子を含むAatII断片の塩基配列を、配列表配列番号7に示す。この塩基配列から、2つのオープン・リーディング・フレームが推定された。これらの塩基配列により推定される翻訳産物のアミノ酸配列も配列表配列番号7に示した。すなわち、配列表配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる2つのタンパク質をコードする遺伝子が、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869のgl t B D 遺伝子である。このうち、塩基番号565~5094がgl t B 遺伝子で、5097~6614がgl t D 遺伝子である。gl t B 遺伝子及びgl t

50

D 遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を、それぞれ順に配列番号 8 及び配列番号 9 に示す。なお、タンパク質の N 末端にあるメチオニン残基は開始コドンである A T G に由来するため、タンパク質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記タンパク質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。

塩基配列、アミノ酸配列おのこのについて既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースは E M B L および S W I S S - P R O T である。その結果、配列表配列番号 7 に示される DNA は、すでに報告されている大腸菌および酵母等の g l t B D 遺伝子と相同性を持つコリネバクテリウム属細菌では新規な遺伝子であることが判明した。

( 3 ) プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 の g l t B D 遺伝子およびコリネバクテリウム属細菌の複製起点を有するプラスミドの作成 10

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 の g l t B D 遺伝子の増幅効果を調べるために、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 の g l t B D 遺伝子およびコリネバクテリウム属細菌の複製起点を有するプラスミドの構築を行った。具体的には、( 1 ) により得られた形質転換体からアルカリ法により調製したプレバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 染色体由来の約 1 4 キロベースの DNA 断片含むプラスミド DNA を制限酵素 A a t I I で切断し、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 の g l t B D 遺伝子を含む DNA 断片を取得し、取得された断片を DNA 平滑末端化キット ( 宝酒造社製、B l u n t t i n g k i t ) を用い平滑末端化した後、既を取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミド p A M 3 3 0 由来の複製起点 ( 特開昭 5 8 - 6 7 6 9 9 号 ) を持つプラスミド p V C 7 の制限酵素 S m a I サイトに挿入した。本プラスミドを p V C G O G A T と名付けた。尚、p V C 7 は、以下のようにして、E . c o l i 用ベクターである p H S G 3 9 9 ( C m<sup>r</sup> ; T a k e s h i t a , S . e t a l . , G e n e , 6 1 , 6 3 - 7 4 , ( 1 9 8 7 ) 参照 ) にプレバクテリウム・ラクトファーメンタムのクリプティックプラスミドである p A M 3 3 0 を結合することによって構築した。p A M 3 3 0 は、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 から調製した。p H S G 3 9 9 を一箇所切断酵素である A v a I I ( 宝酒造 ( 株 ) 製 ) にて切断し、T 4 DNA ポリメラーゼにて平滑末端化したのち、H i n d I I I ( 宝酒造 ( 株 ) 製 ) にて切断し、T 4 DNA ポリメラーゼにて平滑末端化した p A M 3 3 0 と接続した。p V K 7 は、E . c o l i 及びプレバクテリウム・ラクトファーメンタムの細胞中で自律複製可能であり、かつ、p H S G 3 9 9 由来のマルチプルクロニングサイトと l a c Z ' を保持している。 20

さらに g l t B D 遺伝子が発現していることを確認するため、p V C G O G A T を g d h と g l t B の欠損株で L - グルタミン酸要求性を示すエシェリヒア・コリ P A 3 4 0 株 ( E . c o l i G e n e t i c s t o c k c e n t e r ( Y a l e U n i v e r s i t y , U . S . A . ) ) にエレクトロポレーション法により導入したところ、p V C G O G A T を導入した形質転換株は、L - グルタミン酸要求性を示さなくなったことから、g l t B D 遺伝子が発現していることを確認した。

( 4 ) コリネバクテリウム属細菌野生型株 A J 1 2 0 3 6 への p V C G O G A T の導入と培養評価 40

コリネバクテリウム属細菌野生型株 A J 1 2 0 3 6 ( A g r i c . B i o l . C h e m . , 5 1 , 9 3 - 1 0 0 ( 1 9 8 7 ) ) を電気パルス法 ( 特開平 2 - 2 0 7 7 9 1 号公報参照 ) によりプラスミド p V C G O G A T で形質転換し、形質転換株を得た。野生型株の A J 1 2 0 3 6 にプラスミド p V C G O G A T を導入して得られた形質転換株 A J 1 2 0 3 6 / p V C G O G A T は、ピオチン制限法による L - グルタミン酸生産のための培養を以下のように行った。5 μ g / m L のクロラムフェニコールを含む C M 2 B プレート培地にて培養して得た A J 1 2 0 3 6 / p V C G O G A T 株の菌体を、グルコース 8 0 g、K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub> 1 g、M g S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub> O 0 . 4 g、( N H<sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 3 0 g、F e S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub> O 0 . 0 1 g、M n S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub> O 0 . 0 1 g、大豆加水分解液 50

15 ml、サイアミン塩酸塩 200  $\mu$ g、ビオチン 60  $\mu$ g、クロラムフェニコール 10 mg 及び  $\text{CaCO}_3$  50 g を純水 1 L 中に含む培地 (KOH を用いて pH 8.0 に調整されている) に接種し 31.5 にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。得られた培養物を、ビオチンおよびクロラムフェニコールを添加していないこと以外は同じ組成の培地 (以下、「ビオチン制限培地」という) に 5% 量接種し、31.5 にて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとして AJ12036 株に pVC7 を上記の方法で導入した菌株を、上記と同様にして培養した。培養終了後、培養液中の L-グルタミン酸蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザー AS-210 により測定した。このときの結果を表 3 に示した。

表 3

10

菌株	L-グルタミン酸蓄積量 (g/L)
AJ12036 / pVC7	33.6
AJ12036 / pVCGOGAT	37.0

#### 産業上の利用の可能性

本発明の方法により、コリネバクテリウム属細菌に属し、GOGAT 活性が増幅され、かつ L-グルタミン酸生産能を有する菌株の L-グルタミン酸生産能を高めることができ、L-グルタミン酸を安価かつ効率的に製造することができる。さらに、コリネバクテリウム属細菌由来の *gltB* 遺伝子が得られ、該遺伝子はコリネバクテリウム属細菌によるグルタミン酸の製造に用いることが可能となった。

20

【配列表】

## Sequence Listing

- <110> 味の素株式会社(Ajinomoto Co., Inc.)  
 <120> 発酵法によるL-グルタミン酸の製造法  
 <130> OP778  
 <141> 1998-08-07  
 <160> 9 10  
 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 20  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer for  
 amplifying Escherichia coli gltBD gene  
 <400> 1  
 agccttaaag ataggatcca ttttaatttc 30
- <210> 2 30  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer for  
 amplifying Escherichia coli gltBD gene 40  
 <400> 2

attcatggat ccctcgctta aacttccagc

30

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<221> UNSURE

<222> (3, 9, 12)

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for

amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

20

<400> 3

ggngarggng gngarga

17

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<221> UNSURE

<222> (1, 4, 7, )

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for

amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

40

<400> 4

ncncncngtc atrtaytc

18

<210> 5  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer for  
           amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene 10  
 <400> 5  
 aatccacgtg aagctagtgg cagaacaagg cg 32

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA 20  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer for  
           amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene  
 <400> 6  
 acgaatgaac aattcaccac tggttgcgcc 30 30

<210> 7  
 <211> 8734  
 <212> DNA  
 <213> Brevibacterium lactofermentum  
 <220> 40  
 <221> CDS  
 <222> (565)..(5094)  
 <220>

<221> CDS

<222> (5097)..(6614)

<400> 7

gacgtcgcgg aggaatgctg ccacgccttc gatttttccg gaatcgtctt tcaggatcgt 60  
gatggagaat tccagggaca ttttagatcc gtctgcacgc actcccggaa cattgagggg 120  
ctcggagccg tagcgggttt caccggattc catgacgtga tcccatccgt cccagtgtgc 180  
cttgcggtgt ttttcgggga tgatgatgtc gagggatttt ccgagtgcct cgcggccgt 240  
gtatccaaag agtttctcgg agccgccgtt ccagagtctg attattccat cgcgggtggc 300  
gtagatgatt gcttcttctg ttcgggtgac aagtcgggct gcgatgggtg caaaatcgac 360  
catttttate ttctttcagc ggggtgatag gcgaacatct tctaccatat cctgtgatgl 420  
gtaacacagg agcgtaatct gacctccgt tttctatag attgatcgaa agtaaccctt 480  
ttgttacttg cgttgcaggt agtgcgcctg attttcttat tctgaacga ttgatagaaa 540  
caggattaa gtaggtatc ccgc atg aaa cca caa gga ctc tac aac cct 591

10  
20

Met Lys Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Pro

1 5

gcg cat gaa cat gac gcc tgc ggt gtg gcg ttt att gcg gat atc cac 639  
Ala His Glu His Asp Ala Cys Gly Val Ala Phe Ile Ala Asp Ile His  
10 15 20 25  
ggc cga ccc agc cgc agc att gtt gat cgt gca ctt gag gcg ctt cgc 687  
Gly Arg Pro Ser Arg Ser Ile Val Asp Arg Ala Leu Glu Ala Leu Arg  
30 35 40  
aac att gac cac cgt ggc gca gcc ggt gca gag aag aac act ggc gat 735  
Asn Ile Asp His Arg Gly Ala Ala Gly Ala Glu Lys Asn Thr Gly Asp  
45 50 55  
ggc gcg ggc atc ctc atg cag att ccg gac ggc ttt tat cgt gaa gta 783  
Gly Ala Gly Ile Leu Met Gln Ile Pro Asp Gly Phe Tyr Arg Glu Val  
60 65 70  
tct ggc att gag ctt cct gag gca ggg gag tat gcc act ggt att gcg 831  
Ser Gly Ile Glu Leu Pro Glu Ala Gly Glu Tyr Ala Thr Gly Ile Ala

30  
40

75	80	85	
ttc ttg cct cgc ggt cgc atg gcg atg atg gat gct cag aag gaa att	879		
Phe Leu Pro Arg Gly Arg Met Ala Met Met Asp Ala Gln Lys Glu Ile			
90	95	100	105
gag cgc atc gca aag caa gaa ggt gcc gat gtg ctt ggt tgg cgc atg	927		
Glu Arg Ile Ala Lys Gln Glu Gly Ala Asp Val Leu Gly Trp Arg Met			
	110	115	120
gtt cct ttt gat tcc cgt gag ctg ggt tcc atg gct gag gag gcg atg	975		
Val Pro Phe Asp Ser Arg Glu Leu Gly Ser Met Ala Glu Glu Ala Met			10
	125	130	135
cct agt ttc gcg cag att ttc ctt act gtg cct gga aaa tct ggt gaa	1023		
Pro Ser Phe Ala Gln Ile Phe Leu Thr Val Pro Gly Lys Ser Gly Glu			
	140	145	150
gat ctt gac cgt gtg atg ttc ttt atc cgt aag cgt tgt gag cgt gag	1071		
Asp Leu Asp Arg Val Met Phe Phe Ile Arg Lys Arg Cys Glu Arg Glu			20
	155	160	165
ctg ggc acc acc aat ggt cgc gat acg gtg tat ttc ccg tcg cta tct	1119		
Leu Gly Thr Thr Asn Gly Arg Asp Thr Val Tyr Phe Pro Ser Leu Ser			
170	175	180	185
tca cgc acc atc att tac aaa ggc atg ttg acc act ctg cag ctt gag	1167		
Ser Arg Thr Ile Ile Tyr Lys Gly Met Leu Thr Thr Leu Gln Leu Glu			30
	190	195	200
ggc ttc ttt gag gat ctg ggt gat gct cgc ctg gag tcg gcc att gct	1215		
Gly Phe Phe Glu Asp Leu Gly Asp Ala Arg Leu Glu Ser Ala Ile Ala			
	205	210	215
att gtg cac tcg cgt ttc tcc acg aac act ttc cca agc tgg ccg ctg	1263		
Ile Val His Ser Arg Phe Ser Thr Asn Thr Phe Pro Ser Trp Pro Leu			40
	220	225	230
gcg cac ccg tac cgt ttc gtt gcc cac aac ggt gag atc aac act gtg	1311		

Ala His Pro Tyr Arg Phe Val Ala His Asn Gly Glu Ile Asn Thr Val	
235	240
cgt ggc aat gaa aac tgg atg cgc gcc cgc gag gcg ctt atc aaa aac	1359
Arg Gly Asn Glu Asn Trp Met Arg Ala Arg Glu Ala Leu Ile Lys Asn	
250	255
gac aag ctg ggc aat ttg agc agc gtg ctg cct atc tgc acc ccg gag	1407
Asp Lys Leu Gly Asn Leu Ser Ser Val Leu Pro Ile Cys Thr Pro Glu	10
270	275
ggc tcg gat acc gcg cgt ttc gac gag gct ttg gag ctt ttg cac ctg	1455
Gly Ser Asp Thr Ala Arg Phe Asp Glu Ala Leu Glu Leu Leu His Leu	
285	290
ggc gga tac tca ctt ccg cat gct gtt gcg atg atg atc cct cag gcg	1503
Gly Gly Tyr Ser Leu Pro His Ala Val Ala Met Met Ile Pro Gln Ala	20
300	305
tgg gaa cac aac aag acg ctg agc cct gag ctg cgt gat ttc tac gaa	1551
Trp Glu His Asn Lys Thr Leu Ser Pro Glu Leu Arg Asp Phe Tyr Glu	
315	320
tac cac tct tgt ctg atg gag cca tgg gat ggt cct gca gcg ctg gca	1599
Tyr His Ser Cys Leu Met Glu Pro Trp Asp Gly Pro Ala Ala Leu Ala	30
330	335
ttt act gac ggt cgt ttt gtg ggt gcc gtg ctg gac cgt aat ggc ctg	1647
Phe Thr Asp Gly Arg Phe Val Gly Ala Val Leu Asp Arg Asn Gly Leu	
350	355
cga cct ggg cga atc acc att act gat tcg ggt ttg gtt gtg atg gct	1695
Arg Pro Gly Arg Ile Thr Ile Thr Asp Ser Gly Leu Val Val Met Ala	40
365	370
tct gaa tcg gga gtg ttg gac ttg agg gag gag agc gtc gta aag cgt	1743
Ser Glu Ser Gly Val Leu Asp Leu Arg Glu Glu Ser Val Val Lys Arg	
380	385
	390

act cgc gta cag cct gga cgc atg ttc ctt gtt gac acg gcc gag ggt	1791	
Thr Arg Val Gln Pro Gly Arg Met Phe Leu Val Asp Thr Ala Glu Gly		
395 400 405		
cgc atc gtt gaa gac gag gaa atc aag cag aaa tta agc gaa gcg cag	1839	
Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Ile Lys Gln Lys Leu Ser Glu Ala Gln		
410 415 420 425		
cca tat ggt gag tgg att cgc gat aat ttt gtg cat ctg gat cgt ctg	1887	10
Pro Tyr Gly Glu Trp Ile Arg Asp Asn Phe Val His Leu Asp Arg Leu		
430 435 440		
cct cag aca cgc tac aac tac atg gcg cac tct cgt gct gtg ttg cgt	1935	
Pro Gln Thr Arg Tyr Asn Tyr Met Ala His Ser Arg Ala Val Leu Arg		
445 450 455		
cag cgt gtt ttc gga atc act gaa gaa gat gtg gat ttg ttg ctg ctg	1983	20
Gln Arg Val Phe Gly Ile Thr Glu Glu Asp Val Asp Leu Leu Leu Leu		
460 465 470		
ccg atg gcc cgc cag ggt gct gag gcg att ggt tcc atg ggt tcg gat	2031	
Pro Met Ala Arg Gln Gly Ala Glu Ala Ile Gly Ser Met Gly Ser Asp		
475 480 485		
acg cca att gcg gcg cta tcc cag cga cca cgc atg ctt tat gat ttc	2079	30
Thr Pro Ile Ala Ala Leu Ser Gln Arg Pro Arg Met Leu Tyr Asp Phe		
490 495 500 505		
ttc gcg cag cgc ttt gct cag gtg aca aac cca ccg ttg gac tct atc	2127	
Phe Ala Gln Arg Phe Ala Gln Val Thr Asn Pro Pro Leu Asp Ser Ile		
510 515 520		
cgc gaa aag cct gtg acc agc atg ttc act tlg ttg ggt gcg cag tct	2175	40
Arg Glu Lys Pro Val Thr Ser Met Phe Thr Leu Leu Gly Ala Gln Ser		
525 530 535		
gac gtg ctc aat ccg ggt cct gat gcg gcg cga cgt atc cgt ttg gaa	2223	
Asp Val Leu Asn Pro Gly Pro Asp Ala Ala Arg Arg Ile Arg Leu Glu		

540	545	550	
tcg ccg atc att gat aac cat gag ctg gcc acc ttg atc aat gcc aac	2271		
Ser Pro Ile Ile Asp Asn His Glu Leu Ala Thr Leu Ile Asn Ala Asn			
555	560	565	
gcg cat ggt gag tgg gat tcc ttt ggt gct gct gta att tct ggt ttg	2319		
Ala His Gly Glu Trp Asp Ser Phe Gly Ala Ala Val Ile Ser Gly Leu			
570	575	580	585
tac cca gtg gct cac cat ggt gcc gcc atg aag gct gcg att gct cgt	2367		
Tyr Pro Val Ala His His Gly Ala Gly Met Lys Ala Ala Ile Ala Arg			10
590	595	600	
gtg cgc cgc gag gtt tct gaa gca atc cgc aat gcc aag acg ttg atc	2415		
Val Arg Arg Glu Val Ser Glu Ala Ile Arg Asn Gly Lys Thr Leu Ile			
605	610	615	
gtg ctg tcg gat cgt gaa tct gat gag cgc atg gca cct atc cct gcg	2463		
Val Leu Ser Asp Arg Glu Ser Asp Glu Arg Met Ala Pro Ile Pro Ala			20
620	625	630	
ctg ctg ctg act tcc gct gtg cat cag tac ttg gtg cag caa cgt acc	2511		
Leu Leu Leu Thr Ser Ala Val His Gln Tyr Leu Val Gln Gln Arg Thr			
635	640	645	
cgt acc cag tgc tcc ctg gtg gtg gaa tcc gcc gat gcc cgc gag gtt	2559		
Arg Thr Gln Cys Ser Leu Val Val Glu Ser Gly Asp Ala Arg Glu Val			30
650	655	660	665
cat cac ctg gcg atg ctc att ggt ttt ggt gcc gat gcg atc aac ccg	2607		
His His Leu Ala Met Leu Ile Gly Phe Gly Ala Asp Ala Ile Asn Pro			
670	675	680	
tac atg gca ttt gaa acc atc gat gag ctg cgc atg aag ggt cag ttg	2655		
Tyr Met Ala Phe Glu Thr Ile Asp Glu Leu Arg Met Lys Gly Gln Leu			40
685	690	695	
ggt gat ctt tct ttg gat gag gca tcc cga aac tac atc aag gca gcc	2703		

Gly Asp Leu Ser Leu Asp Glu Ala Ser Arg Asn Tyr Ile Lys Ala Ala	
700	705
acc act ggt gtg ctg aag gtg atg tcc aag atg ggc att gca acg gtg	2751
Thr Thr Gly Val Leu Lys Val Met Ser Lys Met Gly Ile Ala Thr Val	
715	720
tct tcg tac cgt ggc gcg cag ctt gct gat gtc acc ggt ctg cat cag	2799
Ser Ser Tyr Arg Gly Ala Gln Leu Ala Asp Val Thr Gly Leu His Gln	10
730	735
gat ctc ctg gac aac tac ttc ggt ggc att gct tca cca att tct ggt	2847
Asp Leu Leu Asp Asn Tyr Phe Gly Gly Ile Ala Ser Pro Ile Ser Gly	
750	755
atc ggt ctg gat gag gtt gca gct gat gtg gaa gct cgt cac cgc agc	2895
Ile Gly Leu Asp Glu Val Ala Ala Asp Val Glu Ala Arg His Arg Ser	20
765	770
gca ttt ttg cca cgc cca gaa gag cac gct cac cgc gaa ttg gat ttg	2943
Ala Phe Leu Pro Arg Pro Glu Glu His Ala His Arg Glu Leu Asp Leu	
780	785
ggt ggt gaa tac aag tgg cgc cgc gaa ggt gaa tat cac ctg ttc aac	2991
Gly Gly Glu Tyr Lys Trp Arg Arg Glu Gly Glu Tyr His Leu Phe Asn	30
795	800
cca gaa acc atc ttc aag ctg cag cat gca act cgt tct ggc agc tac	3039
Pro Glu Thr Ile Phe Lys Leu Gln His Ala Thr Arg Ser Gly Ser Tyr	
810	815
gag att ttc aag gat tac acc cgc aag gtt gat gat caa tcc act cgc	3087
Glu Ile Phe Lys Asp Tyr Thr Arg Lys Val Asp Asp Gln Ser Thr Arg	
830	835
ttg ggt act att cgt gga ctg ttt gag ttc agc acg gat cgc aag cca	3135
Leu Gly Thr Ile Arg Gly Leu Phe Glu Phe Ser Thr Asp Arg Lys Pro	
845	850
	855

att tcg gtg tct gag gtg gag ccg gtc agt gag atc gtg aag cgt ttc	3183		
Ile Ser Val Ser Glu Val Glu Pro Val Ser Glu Ile Val Lys Arg Phe			
860	865	870	
tcc act ggt gcg atg tct tat ggc tcg att tct gct gaa gcc cat gag	3231		
Ser Thr Gly Ala Met Ser Tyr Gly Ser Ile Ser Ala Glu Ala His Glu			
875	880	885	
gtc ttg gcc atc gcc atg aac cga ctg ggc ggt atg tcc aac tcc ggc	3279	10	
Val Leu Ala Ile Ala Met Asn Arg Leu Gly Gly Met Ser Asn Ser Gly			
890	895	900	905
gaa ggt ggc gag gac gcc cgc cga ttc gat gtg gaa ccc aac ggt gac	3327		
Glu Gly Gly Glu Asp Ala Arg Arg Phe Asp Val Glu Pro Asn Gly Asp			
910	915	920	
tgg aag cgc tct gcc att aag cag gtg gcc tcg gga cgt ttc ggc gtg	3375	20	
Trp Lys Arg Ser Ala Ile Lys Gln Val Ala Ser Gly Arg Phe Gly Val			
925	930	935	
acc agc cac tac ttg aac aac tgc acc gat att cag atc aag atg gca	3423		
Thr Ser His Tyr Leu Asn Asn Cys Thr Asp Ile Gln Ile Lys Met Ala			
940	945	950	
cag ggc gca aag ccc ggt gaa ggt ggc cag ctg cca cca aac aag gtg	3471	30	
Gln Gly Ala Lys Pro Gly Glu Gly Gly Gln Leu Pro Pro Asn Lys Val			
955	960	965	
tac cca tgg gtt gca gaa gtc cgc atc acc acc cca ggc gtt ggt ctg	3519		
Tyr Pro Trp Val Ala Glu Val Arg Ile Thr Thr Pro Gly Val Gly Leu			
970	975	980	985
att tcc cct cca cca cac cac gat att tac tcc att gag gat ctg gct	3567	40	
Ile Ser Pro Pro Pro His His Asp Ile Tyr Ser Ile Glu Asp Leu Ala			
990	995	1000	
cag ctg atc cac gac ctg aag aac gct aac cca cgc gca cga atc cac	3615		
Gln Leu Ile His Asp Leu Lys Asn Ala Asn Pro Arg Ala Arg Ile His			

1005	1010	1015	
gtg aag cta gtg gca gaa caa ggc gtg ggc acc gtt gcc gca ggt gtg			3663
Val Lys Leu Val Ala Glu Gln Gly Val Gly Thr Val Ala Ala Gly Val			
1020	1025	1030	
tcc aaa gca cac gct gat gtg gtg ctt att tcc ggc cac gac ggc gga			3711
Ser Lys Ala His Ala Asp Val Val Leu Ile Ser Gly His Asp Gly Gly			
1035	1040	1045	10
act ggc gca tet cct ttg acc tcc ctg aag cat gcc ggt ggt cca tgg			3759
Thr Gly Ala Ser Pro Leu Thr Ser Leu Lys His Ala Gly Gly Pro Trp			
1050	1055	1060	1065
gag ttg ggc ttg gct gaa acc cag caa acg ttg ctg ctc aac ggc ctg			3807
Glu Leu Gly Leu Ala Glu Thr Gln Gln Thr Leu Leu Leu Asn Gly Leu			
1070	1075	1080	20
cgt gat cgt att cgc gtg cag tgc gat ggt cag ctg aaa act ggc cga			3855
Arg Asp Arg Ile Arg Val Gln Cys Asp Gly Gln Leu Lys Thr Gly Arg			
1085	1090	1095	
gac gta gtt atc gca gct ctg ctc ggt gcc gaa gaa ttc ggt ttc gcc			3903
Asp Val Val Ile Ala Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Phe Gly Phe Ala			
1100	1105	1110	30
acc gca ccg ctg gtg gtt gaa ggc tgc atc atg atg cgc gtc tgc cac			3951
Thr Ala Pro Leu Val Val Glu Gly Cys Ile Met Met Arg Val Cys His			
1115	1120	1125	
ctg gac acc tgc ccg gtg ggt atc gct acc cag aac ccg gat ttg cgt			3999
Leu Asp Thr Cys Pro Val Gly Ile Ala Thr Gln Asn Pro Asp Leu Arg			
1130	1135	1140	1145
tcc aag ttc acc ggc aag gct gaa cac gtg gtc aac ttc ttc acc ttc			4047
Ser Lys Phe Thr Gly Lys Ala Glu His Val Val Asn Phe Phe Thr Phe			
1150	1155	1160	
atc gcc cag gaa gtc cgt gag tac ttg gca cag ctt ggt ttc cgc tct			4095
			40

Ile Ala Gln Glu Val Arg Glu Tyr Leu Ala Gln Leu Gly Phe Arg Ser	
1165	1170
1175	
att gat gaa gcc gta gga caa gcc cag gtg ctg cgt aag cgt tcc gga	4143
Ile Asp Glu Ala Val Gly Gln Ala Gln Val Leu Arg Lys Arg Ser Gly	
1180	1185
1190	
atc cca gct gat tcc cgc gca gca cac ctg gat ttg agc cca att ttc	4191
Ile Pro Ala Asp Ser Arg Ala Ala His Leu Asp Leu Ser Pro Ile Phe	10
1195	1200
1205	
cat cgc cca gaa act cca cac ttc cca act cag gat gtg cgt tgc acc	4239
His Arg Pro Glu Thr Pro His Phe Pro Thr Gln Asp Val Arg Cys Thr	
1210	1215
1220	1225
aag acc cag gaa cac agc cta gaa aaa gcc ctg gac aac gca ttt att	4287
Lys Thr Gln Glu His Ser Leu Glu Lys Ala Leu Asp Asn Ala Phe Ile	20
1230	1235
1240	
gat aag gct tcg gac aca atc acc cgt gcc gca gcg ggt gtg gaa acc	4335
Asp Lys Ala Ser Asp Thr Ile Thr Arg Ala Ala Ala Gly Val Glu Thr	
1245	1250
1255	
agc att gtt att gat agc tcc atc agc aac gtc aac cgt tca gtt ggc	4383
Ser Ile Val Ile Asp Ser Ser Ile Ser Asn Val Asn Arg Ser Val Gly	30
1260	1265
1270	
acg atg ctg ggt tet gca gtc agc cgc gtg gct ggt gcc caa ggt ttg	4431
Thr Met Leu Gly Ser Ala Val Ser Arg Val Ala Gly Ala Gln Gly Leu	
1275	1280
1285	
cca gac ggc acc atc acc ttg aat ctt caa ggc tgc gcc ggt aac tcc	4479
Pro Asp Gly Thr Ile Thr Leu Asn Leu Gln Gly Cys Ala Gly Asn Ser	40
1290	1295
1300	1305
ttt ggc gcg ttc atc cca cga ggc atc acc atc aac ctc acc ggc gat	4527
Phe Gly Ala Phe Ile Pro Arg Gly Ile Thr Ile Asn Leu Thr Gly Asp	
1310	1315
1320	

gcc aat gac ttt gtg ggc aag gga tta tct ggc gga aag att gtg atc 4575  
 Ala Asn Asp Phe Val Gly Lys Gly Leu Ser Gly Gly Lys Ile Val Ile  
           1325                          1330                          1335  
 aag cct tcc gct cag gct ccg aag cag ctg aag aac aat cca aat atc 4623  
 Lys Pro Ser Ala Gln Ala Pro Lys Gln Leu Lys Asn Asn Pro Asn Ile  
           1340                          1345                          1350  
 att gcc gga aac gtg ctt gga tac ggc gca acc agt ggt gaa ttg ttc 4671  
 Ile Ala Gly Asn Val Leu Gly Tyr Gly Ala Thr Ser Gly Glu Leu Phe  
           1355                          1360                          1365  
 att cgt ggc cag gtc ggc gaa cgt ttc tgc gtc cgt aac tct ggc gcc 4719  
 Ile Arg Gly Gln Val Gly Glu Arg Phe Cys Val Arg Asn Ser Gly Ala  
 1370                          1375                          1380                          1385  
 acc gca gtg gtt gaa ggt atc gga aac cac ggt tgt gag tac atg act 4767  
 Thr Ala Val Val Glu Gly Ile Gly Asn His Gly Cys Glu Tyr Met Thr  
           1390                          1395                          1400  
 ggc ggc cga gtc ctg gtt ttg ggc ccg gtt ggt gag aac ttt ggt gcc 4815  
 Gly Gly Arg Val Leu Val Leu Gly Pro Val Gly Glu Asn Phe Gly Ala  
           1405                          1410                          1415  
 ggc atg tct ggt ggc att gca tac ctg gct aat tcc ccg gac cta aac 4863  
 Gly Met Ser Gly Gly Ile Ala Tyr Leu Ala Asn Ser Pro Asp Leu Asn  
           1420                          1425                          1430  
 cag aag atc aat ggc gaa ttg gtg gat gtt gtt cca ctg agc gct gac 4911  
 Gln Lys Ile Asn Gly Glu Leu Val Asp Val Val Pro Leu Ser Ala Asp  
           1435                          1440                          1445  
 gat ctg acg tgg gct gat gag ctc att gct cgc cac cgc gaa ctc acc 4959  
 Asp Leu Thr Trp Ala Asp Glu Leu Ile Ala Arg His Arg Glu Leu Thr  
 1450                          1455                          1460                          1465  
 gga tcc gag acc aag ctg cgt gca caa gat ttg gtg aaa atc atg ccg 5007  
 Gly Ser Glu Thr Lys Leu Arg Ala Gln Asp Leu Val Lys Ile Met Pro

10

20

30

40

	1470	1475	1480	
cgc gat ttc caa aaa gta ctc aac atc atc gaa acg gcc cac gct gag				5055
Arg Asp Phe Gln Lys Val Leu Asn Ile Ile Glu Thr Ala His Ala Glu				
	1485	1490	1495	
ggc caa gac cca gca atc aag atc atg gag gca gtg agc ta atg gcc				5102
Gly Gln Asp Pro Ala Ile Lys Ile Met Glu Ala Val Ser Met Ala				
	1500	1505	1510	1
gac cca caa gga ttc atc aaa tac tcc cga cgc gag cct gca cac cgc				5150
Asp Pro Gln Gly Phe Ile Lys Tyr Ser Arg Arg Glu Pro Ala His Arg				
	5	10	15	
ccg gtc ccg ctg cgc ctc atg gac tac tcc gag gtc tac gaa aag gca				5198
Pro Val Pro Leu Arg Leu Met Asp Tyr Ser Glu Val Tyr Glu Lys Ala				
	20	25	30	
ccg gca ggt cag atc gag gaa cag gct gcc cgc tgc atg gat tgc ggt				5246
Pro Ala Gly Gln Ile Glu Glu Gln Ala Ala Arg Cys Met Asp Cys Gly				
	35	40	45	50
gtc ccg ttc tgc cac gaa ggc tgc cca ctg ggc aac atc atc cct gag				5294
Val Pro Phe Cys His Glu Gly Cys Pro Leu Gly Asn Ile Ile Pro Glu				
	55	60	65	
tgg aat gat ctg gta cgc caa ggt cgg tgg aag gaa gcc tac gat cgc				5342
Trp Asn Asp Leu Val Arg Gln Gly Arg Trp Lys Glu Ala Tyr Asp Arg				
	70	75	80	
ctg cac gcg acc aac aat ttc ccc gag ttc acc ggc cgt ttg tgc ccc				5390
Leu His Ala Thr Asn Asn Phe Pro Glu Phe Thr Gly Arg Leu Cys Pro				
	85	90	95	
gca ccc tgc gaa ggc gcc tgc gtg ctc ggc atc aac gat gat tct gtc				5438
Ala Pro Cys Glu Gly Ala Cys Val Leu Gly Ile Asn Asp Asp Ser Val				
	100	105	110	
acc atc aaa aac gtt gag ctg gaa atc gtc gaa aaa gca ttc cgc gaa				5486

10

20

30

40

Thr Ile Lys Asn Val Glu Leu Glu Ile Val Glu Lys Ala Phe Arg Glu	
115	120
ggc tgg gtt cag cct gtc gtc gca tcc atg tcc acc ggc ctg tcc gta	5534
Gly Trp Val Gln Pro Val Val Ala Ser Met Ser Thr Gly Leu Ser Val	
	135
	140
	145
gcc gtc gtc ggc tcc ggt ccc gct ggc ctt gcc gcc gcg cag cag ctc	5582
Ala Val Val Gly Ser Gly Pro Ala Gly Leu Ala Ala Ala Gln Gln Leu	10
	150
	155
	160
acc cgc gca ggt cac agc gtg acc gtc ttc gaa cgc gac gac cgc ctc	5630
Thr Arg Ala Gly His Ser Val Thr Val Phe Glu Arg Asp Asp Arg Leu	
	165
	170
	175
ggc ggc ctc atg cgc tac ggc gtg cca gaa tac aaa atg gaa aac cgc	5678
Gly Gly Leu Met Arg Tyr Gly Val Pro Glu Tyr Lys Met Glu Asn Arg	20
	180
	185
	190
tgg atc gac cgc cgc atc gag caa atg gaa gca gag ggc aca act ttc	5726
Trp Ile Asp Arg Arg Ile Glu Gln Met Glu Ala Glu Gly Thr Thr Phe	
195	200
	205
	210
cag gta ggc acc tcg cca cgc gcc gct gaa cta gcg ctt ttc gac gcg	5774
Gln Val Gly Thr Ser Pro Arg Ala Ala Glu Leu Ala Leu Phe Asp Ala	30
	215
	220
	225
atc ctc ctc gca acc ggc acc cca gtg gcc cgc gaa ctc tca gtt cca	5822
Ile Leu Leu Ala Thr Gly Thr Pro Val Ala Arg Glu Leu Ser Val Pro	
	230
	235
	240
ggc cac gat ctc aac ggc atc cat gcg gca atg gat tac ctc acc gcc	5870
Gly His Asp Leu Asn Gly Ile His Ala Ala Met Asp Tyr Leu Thr Ala	
	245
	250
	255
caa aac cgc atc aat gaa ggc gac ggt gaa gtc tct cca atc aac gcc	5918
Gln Asn Arg Ile Asn Glu Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro Ile Asn Ala	
	260
	265
	270



420	425	430	
ggt ttc gac gac cga gga cgc atc ctc cgc gat tcc gaa tac cgc agc			6446
Gly Phe Asp Asp Arg Gly Arg Ile Leu Arg Asp Ser Glu Tyr Arg Ser			
435	440	445	450
ccc acc aac tcc cgc gtt tac atc gca ggc gac aac ggc cgt ggc caa			6494
Pro Thr Asn Ser Arg Val Tyr Ile Ala Gly Asp Asn Gly Arg Gly Gln			
	455	460	465
tcc ctg atc gtg tgg gca atc gcc gaa ggc cgc gca tgc gcc gca gct			6542
Ser Leu Ile Val Trp Ala Ile Ala Glu Gly Arg Ala Cys Ala Ala Ala			
	470	475	480
atc gac gcc gac ctc atg ggt gaa act gca ctt cca gta gca gtt gca			6590
Ile Asp Ala Asp Leu Met Gly Glu Thr Ala Leu Pro Val Ala Val Ala			
	485	490	495
cca cag gac gtg ccg ctg gct gtc taggaggatt ggcgccaaga accactcgaa			6644
Pro Gln Asp Val Pro Leu Ala Val			
500	505		
actgcaattt cgagtggttt tgcgtattca gaatttaagg aaatgcttca aaactatcca			6704
tatTTTTgaa gcgtactaag gccgagtTtc aattagttgc cgatgctcca cgtatgcaca			6764
ggttgccac tttcttgatt ctgtaaatac tgttgcaaca ttgctgcaag acctgctttt			6824
cgagcatcgg aaccggcat gcttccgtgt gcttccagct tgttgaggct acgcaactgc			6884
caggTggcac cgttttggcg ggacttcgcg cgttcggtga tgatgccgag gtattggteg			6944
ataaggtctt tatttacttc aagtcgttcc agtccgattc tggttgagg gatgaggtgc			7004
tcttgacca gattcgcaac gttgacttgt ccgagggttg gccaggtcat gcgggcgaac			7064
agccctgaac gtgcaccgga ttggaagttc tttccgcat cagggaatag gagacgtgac			7124
cagacagggc ggttttctc ggcaagatat ttgaccaaac cgtaatagaa agcggcatcg			7184
gcagtgatgt cgatgggggt gggacctgca ggtaggagac ggttttccag gcgcaggtgg			7244
gagcgtctt cgcgccgtga gtaaatgggt cggttccagc gccacaccgt tccgttgtgc			7304
aggttgaggt agtggagtgc gggggatttt ccttcatca ttggtgtgcc agacagtgcg			7364
cgggattctg cgatgagagg ggagaagtag cgtacgtttt cttcgaaaag atcaaaaaca			7424

10

20

30

40

ctggtgatcc atcgttcgcc gaaccatact ctggggcgga ctcttgatt cacaagttca 7484  
 ggagtacgcg tatcgaatgc ttgttgaaac actggaatgc ggctttcatg ccacacccga 7544  
 cggcctagga aaagtgggga gttggcgga agagctgctt gaacaccagc tattgcttgc 7604  
 gacgcattcc acgctgcagc aaacttattg ggcgctaatt gcaggtgcaa ctgaatagac 7664  
 glgcaagttg attcgggggc gagatcagtg aaatcgtgga tgatttgttc acggtcggcg 7724  
 atgttgatgt gactaactc gccacgcgat tccatcaccg cattgctcag cgcacggtag 7784  
 cggttttctt gggatcatca tgccggatct tcaagaaatt ccggagtgat ggtgggcagc 7844 10  
 gtgccgatca tcgccacgtt cacattctcc gatgtggcgg ccgcgcgcac gcgacctaga 7904  
 cgcgaggtga tgcccttctc gaggcgtcgt aaagcatcgc ctttaacgga tagtggcggg 7964  
 tggttcattt caacattaaa gttaccgatc tccgactggt actcatcgtc taaatgggaa 8024  
 agcaccgctt ggccctgcaa agcaggttgc atatgcttat ccacgaggtt gagttccaac 8084  
 tcgaggccga tggaaccctg atcctcaaaa tcggaatgct gcaaatgccg atcaaaaatc 8144  
 tcaagatctt ccatgagcag ctggcgataa cgcgtgcgct gctgcggagt gtacctgtca 8204 20  
 gtacttactg attcgccccat aacttagagc aaaccacaaa aaatggtgct gggtaaggat 8264  
 accaatcagg aatfttccac gcgataaacc tgagccacca attgggtacg cgacctgact 8324  
 ttgaaaatat ccaacaattg ggacactgtc ttcttactg tcgctatcgt gaggcctgtg 8384  
 gctttggcaa tttggcggtt ggaattgcc cgcgcaaaa gtttcatcac tcgctgctga 8444  
 gtcgccgtta attgttcagg aatctgcgtg gttctgggaa gcatggcacg cagacgagtc 8504  
 atggccaacg gggaaagcgt ggtgccaccg gacacagcaa tgcggatgat atcgcgaatg 8564 30  
 tcctgggcac ggtcgtcttt gacaatgtat gcagctgcac cattggagag catttcaacc 8624  
 agagtttcat ctgtagaaaa agcagtcata gtgacaaaag ctggtggctc ggaaagtttg 8684  
 cgtacctcag tgagcagctg cctgccgtcc atglgaggca tttcgacgtc 8734

<210> 8

<211> 1510

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 8

Met Lys Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Pro Ala His Glu His Asp Ala Cys

10

20

30

40

1	5	10	15	
Gly Val Ala Phe Ile Ala Asp Ile His Gly Arg Pro Ser Arg Ser Ile				
	20	25	30	
Val Asp Arg Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ile Asp His Arg Gly Ala				
	35	40	45	
Ala Gly Ala Glu Lys Asn Thr Gly Asp Gly Ala Gly Ile Leu Met Gln				10
	50	55	60	
Ile Pro Asp Gly Phe Tyr Arg Glu Val Ser Gly Ile Glu Leu Pro Glu				
65	70	75	80	
Ala Gly Glu Tyr Ala Thr Gly Ile Ala Phe Leu Pro Arg Gly Arg Met				
	85	90	95	
Ala Met Met Asp Ala Gln Lys Glu Ile Glu Arg Ile Ala Lys Gln Glu				20
	100	105	110	
Gly Ala Asp Val Leu Gly Trp Arg Met Val Pro Phe Asp Ser Arg Glu				
	115	120	125	
Leu Gly Ser Met Ala Glu Glu Ala Met Pro Ser Phe Ala Gln Ile Phe				
130	135	140		
Leu Thr Val Pro Gly Lys Ser Gly Glu Asp Leu Asp Arg Val Met Phe				
145	150	155	160	30
Phe Ile Arg Lys Arg Cys Glu Arg Glu Leu Gly Thr Thr Asn Gly Arg				
	165	170	175	
Asp Thr Val Tyr Phe Pro Ser Leu Ser Ser Arg Thr Ile Ile Tyr Lys				
	180	185	190	
Gly Met Leu Thr Thr Leu Gln Leu Glu Gly Phe Phe Glu Asp Leu Gly				
	195	200	205	40
Asp Ala Arg Leu Glu Ser Ala Ile Ala Ile Val His Ser Arg Phe Ser				
210	215	220		
Thr Asn Thr Phe Pro Ser Trp Pro Leu Ala His Pro Tyr Arg Phe Val				
225	230	235	240	

Ala His Asn Gly Glu Ile Asn Thr Val Arg Gly Asn Glu Asn Trp Met  
 245 250 255

Arg Ala Arg Glu Ala Leu Ile Lys Asn Asp Lys Leu Gly Asn Leu Ser  
 260 265 270

Ser Val Leu Pro Ile Cys Thr Pro Glu Gly Ser Asp Thr Ala Arg Phe  
 275 280 285

Asp Glu Ala Leu Glu Leu Leu His Leu Gly Gly Tyr Ser Leu Pro His  
 290 295 300

Ala Val Ala Met Met Ile Pro Gln Ala Trp Glu His Asn Lys Thr Leu  
 305 310 315 320

Ser Pro Glu Leu Arg Asp Phe Tyr Glu Tyr His Ser Cys Leu Met Glu  
 325 330 335

Pro Trp Asp Gly Pro Ala Ala Leu Ala Phe Thr Asp Gly Arg Phe Val  
 340 345 350

Gly Ala Val Leu Asp Arg Asn Gly Leu Arg Pro Gly Arg Ile Thr Ile  
 355 360 365

Thr Asp Ser Gly Leu Val Val Met Ala Ser Glu Ser Gly Val Leu Asp  
 370 375 380

Leu Arg Glu Glu Ser Val Val Lys Arg Thr Arg Val Gln Pro Gly Arg  
 385 390 395 400

Met Phe Leu Val Asp Thr Ala Glu Gly Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu  
 405 410 415

Ile Lys Gln Lys Leu Ser Glu Ala Gln Pro Tyr Gly Glu Trp Ile Arg  
 420 425 430

Asp Asn Phe Val His Leu Asp Arg Leu Pro Gln Thr Arg Tyr Asn Tyr  
 435 440 445

Met Ala His Ser Arg Ala Val Leu Arg Gln Arg Val Phe Gly Ile Thr  
 450 455 460

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

10

20

30

40

465		470		475		480									
Glu	Ala	Ile	Gly	Ser	Met	Gly	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Ser
				485				490						495	
Gln	Arg	Pro	Arg	Met	Leu	Tyr	Asp	Phe	Phe	Ala	Gln	Arg	Phe	Ala	Gln
				500				505						510	
Val	Thr	Asn	Pro	Pro	Leu	Asp	Ser	Ile	Arg	Glu	Lys	Pro	Val	Thr	Ser
				515				520						525	10
Met	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Ala	Gln	Ser	Asp	Val	Leu	Asn	Pro	Gly	Pro
				530				535						540	
Asp	Ala	Ala	Arg	Arg	Ile	Arg	Leu	Glu	Ser	Pro	Ile	Ile	Asp	Asn	His
545					550					555					560
Glu	Leu	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Ala	Asn	Ala	His	Gly	Glu	Trp	Asp	Ser
					565					570					575
Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	His	His	Gly
					580					585					590
Ala	Gly	Met	Lys	Ala	Ala	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Arg	Glu	Val	Ser	Glu
					595					600					605
Ala	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Ile	Val	Leu	Ser	Asp	Arg	Glu	Ser
					610					615					620
Asp	Glu	Arg	Met	Ala	Pro	Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Ser	Ala	Val
625					630					635					640
His	Gln	Tyr	Leu	Val	Gln	Gln	Arg	Thr	Arg	Thr	Gln	Cys	Ser	Leu	Val
					645					650					655
Val	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Arg	Glu	Val	His	His	Leu	Ala	Met	Leu	Ile
					660					665					670
Gly	Phe	Gly	Ala	Asp	Ala	Ile	Asn	Pro	Tyr	Met	Ala	Phe	Glu	Thr	Ile
					675					680					685
Asp	Glu	Leu	Arg	Met	Lys	Gly	Gln	Leu	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu
					690					695					700

Ala Ser Arg Asn Tyr Ile Lys Ala Ala Thr Thr Gly Val Leu Lys Val	
705	710 715 720
Met Ser Lys Met Gly Ile Ala Thr Val Ser Scr Tyr Arg Gly Ala Gln	
	725 730 735
Leu Ala Asp Val Thr Gly Leu His Gln Asp Leu Leu Asp Asn Tyr Phe	
	740 745 750
Gly Gly Ile Ala Ser Pro Ile Ser Gly Ile Gly Leu Asp Glu Val Ala	10
	755 760 765
Ala Asp Val Glu Ala Arg His Arg Ser Ala Phe Leu Pro Arg Pro Glu	
	770 775 780
Glu His Ala His Arg Glu Leu Asp Leu Gly Gly Glu Tyr Lys Trp Arg	
785	790 795 800
Arg Glu Gly Glu Tyr His Leu Phe Asn Pro Glu Thr Ile Phe Lys Leu	20
	805 810 815
Gln His Ala Thr Arg Ser Gly Ser Tyr Glu Ile Phe Lys Asp Tyr Thr	
	820 825 830
Arg Lys Val Asp Asp Gln Ser Thr Arg Leu Gly Thr Ile Arg Gly Leu	
	835 840 845
Phe Glu Phe Ser Thr Asp Arg Lys Pro Ile Ser Val Ser Glu Val Glu	30
	850 855 860
Pro Val Ser Glu Ile Val Lys Arg Phe Ser Thr Gly Ala Met Ser Tyr	
865	870 875 880
Gly Ser Ile Ser Ala Glu Ala His Glu Val Leu Ala Ile Ala Met Asn	
	885 890 895
Arg Leu Gly Gly Met Ser Asn Ser Gly Glu Gly Gly Glu Asp Ala Arg	40
	900 905 910
Arg Phe Asp Val Glu Pro Asn Gly Asp Trp Lys Arg Ser Ala Ile Lys	
	915 920 925
Gln Val Ala Ser Gly Arg Phe Gly Val Thr Ser His Tyr Leu Asn Asn	

930		935		940	
Cys Thr Asp Ile Gln Ile Lys Met Ala Gln Gly Ala Lys Pro Gly Glu					
945		950		955	960
Gly Gly Gln Leu Pro Pro Asn Lys Val Tyr Pro Trp Val Ala Glu Val					
		965		970	975
Arg Ile Thr Thr Pro Gly Val Gly Leu Ile Ser Pro Pro Pro His His					
		980		985	990
Asp Ile Tyr Ser Ile Glu Asp Leu Ala Gln Leu Ile His Asp Leu Lys					10
		995		1000	1005
Asn Ala Asn Pro Arg Ala Arg Ile His Val Lys Leu Val Ala Glu Gln					
		1010		1015	1020
Gly Val Gly Thr Val Ala Ala Gly Val Ser Lys Ala His Ala Asp Val					
025		1030		1035	1040
Val Leu Ile Ser Gly His Asp Gly Gly Thr Gly Ala Ser Pro Leu Thr					20
		1045		1050	1055
Ser Leu Lys His Ala Gly Gly Pro Trp Glu Leu Gly Leu Ala Glu Thr					
		1060		1065	1070
Gln Gln Thr Leu Leu Leu Asn Gly Leu Arg Asp Arg Ile Arg Val Gln					
		1075		1080	1085
Cys Asp Gly Gln Leu Lys Thr Gly Arg Asp Val Val Ile Ala Ala Leu					30
		1090		1095	1100
Leu Gly Ala Glu Glu Phe Gly Phe Ala Thr Ala Pro Leu Val Val Glu					
105		1110		1115	1120
Gly Cys Ile Met Met Arg Val Cys His Leu Asp Thr Cys Pro Val Gly					
		1125		1130	1135
Ile Ala Thr Gln Asn Pro Asp Leu Arg Ser Lys Phe Thr Gly Lys Ala					40
		1140		1145	1150
Glu His Val Val Asn Phe Phe Thr Phe Ile Ala Gln Glu Val Arg Glu					
		1155		1160	1165



	1395	1400	1405	
	Gly Pro Val Gly Glu Asn Phe Gly Ala Gly Met Ser Gly Gly Ile Ala			
	1410	1415	1420	
	Tyr Leu Ala Asn Ser Pro Asp Leu Asn Gln Lys Ile Asn Gly Glu Leu			
	425	1430	1435	1440
	Val Asp Val Val Pro Leu Ser Ala Asp Asp Leu Thr Trp Ala Asp Glu			
		1445	1450	1455
	Leu Ile Ala Arg His Arg Glu Leu Thr Gly Ser Glu Thr Lys Leu Arg			10
	1460	1465	1470	
	Ala Gln Asp Leu Val Lys Ile Met Pro Arg Asp Phe Gln Lys Val Leu			
	1475	1480	1485	
	Asn Ile Ile Glu Thr Ala His Ala Glu Gly Gln Asp Pro Ala Ile Lys			
	1490	1495	1500	20
	Ile Met Glu Ala Val Ser			
	505	1510		
	<210> 9			
	<211> 506			
	<212> PRT			
	<213> Brevibacterium lactofermentum			30
	<400> 9			
	Met Ala Asp Pro Gln Gly Phe Ile Lys Tyr Ser Arg Arg Glu Pro Ala			
	1	5	10	15
	His Arg Pro Val Pro Leu Arg Leu Met Asp Tyr Ser Glu Val Tyr Glu			
		20	25	30
	Lys Ala Pro Ala Gly Gln Ile Glu Glu Gln Ala Ala Arg Cys Met Asp			40
	35	40	45	
	Cys Gly Val Pro Phe Cys His Glu Gly Cys Pro Leu Gly Asn Ile Ile			
	50	55	60	

Pro	Glu	Trp	Asn	Asp	Leu	Val	Arg	Gln	Gly	Arg	Trp	Lys	Glu	Ala	Tyr			
65					70					75					80			
Asp	Arg	Leu	His	Ala	Thr	Asn	Asn	Phe	Pro	Glu	Phe	Thr	Gly	Arg	Leu			
				85					90						95			
Cys	Pro	Ala	Pro	Cys	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Leu	Gly	Ile	Asn	Asp	Asp			
			100					105						110				
Ser	Val	Thr	Ile	Lys	Asn	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Lys	Ala	Phe	10		
			115				120						125					
Arg	Glu	Gly	Trp	Val	Gln	Pro	Val	Val	Ala	Ser	Met	Ser	Thr	Gly	Leu			
							130							135	140			
Ser	Val	Ala	Val	Val	Gly	Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Gln			
145					150						155				160			
Gln	Leu	Thr	Arg	Ala	Gly	His	Ser	Val	Thr	Val	Phe	Glu	Arg	Asp	Asp	20		
					165						170				175			
Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Met	Arg	Tyr	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Lys	Met	Glu			
					180										185	190		
Asn	Arg	Trp	Ile	Asp	Arg	Arg	Ile	Glu	Gln	Met	Glu	Ala	Glu	Gly	Thr			
															195	200	205	
Thr	Phe	Gln	Val	Gly	Thr	Ser	Pro	Arg	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Phe	30		
															210	215	220	
Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Thr	Pro	Val	Ala	Arg	Glu	Leu	Ser			
225															230	235	240	
Val	Pro	Gly	His	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	His	Ala	Ala	Met	Asp	Tyr	Leu			
															245	250	255	
Thr	Ala	Gln	Asn	Arg	Ile	Asn	Glu	Gly	Asp	Gly	Glu	Val	Ser	Pro	Ile	40		
															260	265	270	
Asn	Ala	Lys	Gly	Lys	Lys	Val	Val	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Gly			
															275	280	285	
Thr	Asp	Cys	Phe	Gly	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Ser	Val	Thr			

290	295	300	
Gln Phe Asp Ile Arg Pro Arg Ala Pro Phe Gln Arg Ala Asp Ser Thr			
305	310	315	320
Pro Trp Pro Met Tyr Pro Asn Leu Phe Arg Thr Ala Thr Ala His Glu			
	325	330	335
Glu Gly Glu Tyr Ile Ile Thr Gly Asp Glu Ser Ala Asp Glu Ile Ala			
	340	345	350
Ala Leu Gly Leu Ala Glu Arg Ala Ala Gly Ser Thr Leu Gly Glu Arg			10
	355	360	365
Lys Phe Ala Val Asn Thr Val Glu Phe His Gly Asn Asn Gly His Val			
	370	375	380
Thr Gly Leu Thr Gly Asn Gln Ile Arg Val Val Asn Gly Lys Arg Glu			
385	390	395	400
Pro Ile Glu Gly Thr Glu Phe Pro Phe Glu Ala Asp Leu Val Leu Val			20
	405	410	415
Ala Leu Gly Phe Thr Gly Ala Glu Gln Gly Gly Leu Ala His Glu Leu			
	420	425	430
Gly Val Gly Phe Asp Asp Arg Gly Arg Ile Leu Arg Asp Ser Glu Tyr			
	435	440	445
Arg Ser Pro Thr Asn Ser Arg Val Tyr Ile Ala Gly Asp Asn Gly Arg			30
	450	455	460
Gly Gln Ser Leu Ile Val Trp Ala Ile Ala Glu Gly Arg Ala Cys Ala			
465	470	475	480
Ala Ala Ile Asp Ala Asp Leu Met Gly Glu Thr Ala Leu Pro Val Ala			
	485	490	495
Val Ala Pro Gln Asp Val Pro Leu Ala Val			40
	500	505	

## 【図面の簡単な説明】

図1は、プラスミド p B D 3 5 - 4 3 の構築過程を示す図である。

【 図 1 】

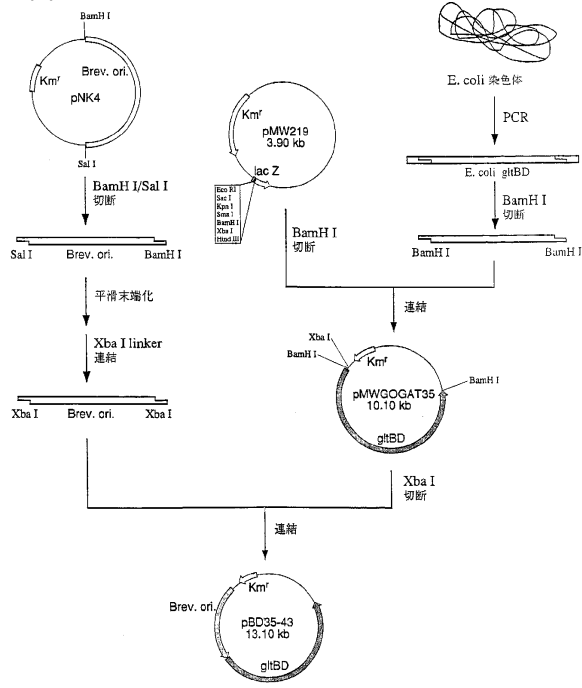


図 1

## フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I  
 C 1 2 R 1:15  
 C 1 2 N 9/06  
 C 1 2 R 1:15
- (72) 発明者 木村 英一郎  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味  
 の素株式会社 発酵技術研究所内
- (72) 発明者 松井 和彦  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味  
 の素株式会社 発酵技術研究所内
- (72) 発明者 大住 剛  
 日本国東京都中央区京橋一丁目 1 5 番 1 号 味  
 の素株式会社内
- (72) 発明者 中松 亘  
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味  
 の素株式会社 発酵技術研究所内

審査官 光本 美奈子

- (56) 参考文献 特開昭 6 1 - 2 6 8 1 8 5 ( J P , A )  
 J Ferment Technol 62(4) p.371-376 (1984)  
 Korean J Appl Microbiol Bioeng 14(5) p.427-432 (1986)  
 Yeast 12 p.1359-1366 (1996)  
 Gene 177 p.261-263 (1996)  
 Plant Cell 5 p.215-226 (1993)  
 Mol Gen Genet 254 p.635-642 (1997)

- (58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 C12N 15/00-15/90  
 C12P 13/14  
 C12N 9/06  
 SwissProt/PIR/Geneseq  
 PubMed