世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 **C12N 9/10, 15/54, 1/19, C12P 19/00**	**A1**	(11) 国際公開番号 **WO99/13059** (43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04087

(22) 国際出願日 1998年9月10日(10.09.98)

(30) 優先権データ
特願平9/245154 1997年9月10日(10.09.97) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
明治製菓株式会社
(MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.)[JP/JP]
〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
矢内耕二(YANAI, Koji)[JP/JP]
中根公隆(NAKANE, Akitaka)[JP/JP]
河野敏明(KONO, Toshiaki)[JP/JP]
〒350-0289 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号
明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)
(74) 代理人
弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.)
〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号
富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

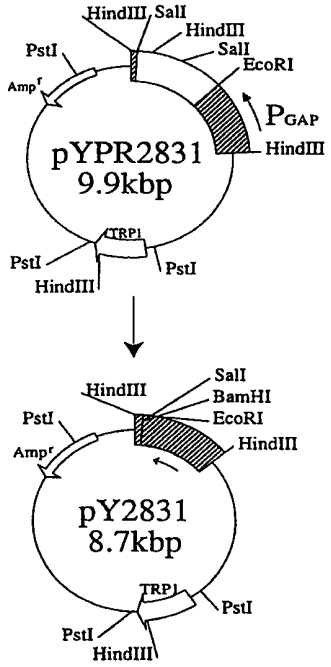
添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: β-FRUCTOFURANOSIDASE AND GENE THEREOF

(54)発明の名称 β－フルクトフラノシダーゼおよびその遺伝子

(57) Abstract

A novel β-fructofuranosidase and a gene thereof. A polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID No: 1 or 3 in the Sequence Listing is an enzyme having a β-fructofuranosidase activity, has a high transfer activity, and can efficiently yield fructooligosaccharides.



(57)要約

新規なβ－フルクトフラノシダーゼおよびその遺伝子が開示されている。配列表の配列番号１または３に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドは、β－フルクトフラノシダーゼ作用を有する酵素であり、その転移活性が高く、フラクトオリゴ糖を効率よく生成することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZW ジンバブエ

明　細　書

β－フルクトフラノシダーゼおよびその遺伝子

〔発明の背景〕

発明の分野

本発明は、フラクトオリゴ糖製造に利用可能なフルクトース転移活性を有するβ－フルクトフラノシダーゼおよびその遺伝子ならびにその利用に関する。

背景技術

一般にフラクトオリゴ糖は、ショ糖のフルクトースに１～３分子のフルクトースがＣ１とＣ２の位置でβ結合しているものであり、難消化性の糖で、腸内のビフィズス菌増殖促進作用、コレステロールなどの脂質代謝改善効果、難う蝕性などの優れた生理効果を有することが見いだされている。

フラクトオリゴ糖は、自然界では広く植物に分布しており、例えばアスパラガス、タマネギ、キクイモ、蜂蜜などに含まれていることが知られているが、最近では、微生物由来のβ－フルクトフラノシダーゼの転移反応を利用してショ糖からフラクトオリゴ糖混合物を大量に製造する技術が確立され、工業的に生産されている。

一方、１－ケストースおよびニストースはショ糖のフルクトースにそれぞれ１および２分子のフルクトースが結合したもので、現在工業的に製造されているフラクトオリゴ糖混合物の一成分である。これらをそれぞれ高純度に調製し結晶化させることによって、フラクトオリゴ糖としての生理効果を保持したまま、物性および食品加工上、新たな優れた特性が現れることが最近見いだされており（特願平７－２２２９２３、特開平６－３１１６０）、これらは新しい特徴を有するフラクトオリゴ糖と言える。

このような状況の下、本発明者らの一部は、ショ糖を原料とした結晶１－ケストースの工業的製造法を既に出願している（特願平８－６４６８２、特願平８－７７５３４、特願平８－７７５３９）。すなわち、フルクトース転移活性を有する酵素をショ糖に作用させて１－ケストースに変換し、クロマト分離法により１－ケストースを純度８０％以上に分画した後、これを結晶化原液として純度が９５％以上の結晶１－ケストースを得る方法である。この方法において使用されるフルクトース転移活性を有する酵素には、その性質として、ショ糖から１－ケストースへの変換率が高いことは勿論のこと、クロマト分離および結晶化の各工程において阻害的に作用するニストースの生成が低いことが求められている。現在フラクトオリゴ糖混合物の工業的製造に利用しているアスペルギルス・ニガー由来の酵素を利用した場合のショ糖から１－ケストースへの変換率は４４％であり、この時のニストースの生成率は７％であった（特願平８－６４６８２）。この酵素の性質は、結晶１－ケストースの工業生産という観点からは改善の余地をのこすものであるといえる。

そこで更に本発明者らの一部は、より優れた性質の酵素のスクリーニングを行い、ペニシリウム・ロックフォルティーとスコプラリオプシス・ブレビカウリスよりそれぞれ新たな酵素を見出した。これらの酵素の性質は、ショ糖から１－ケストースへの変換率がそれぞれ最大で４７％および５５％であり、その際のニストースの生成率はそれぞれ７％および４％であった（特願平８－７７５３４、特願平８－７７５３９）。しかし、これら酵素の生産性や安定性は、アスペルギルス・ニガー由来の酵素と比較して低く、結晶１－ケストースの工業生産という観点からは改善の余地を残すものであった。

そこで、本発明者らの一部は、酵素の生産性などを改良するための方法として遺伝子工学的手法に着目し、ペニシリウム・ロックフォルティーとスコプラリオプシス・ブレビカウリスよりそれぞれβ－フルクトフラノシダーゼをコードする

遺伝子を単離し、その構造解析を行った（ＰＣＴ／ＪＰ９７／００７５７）。その結果、アスペルギルス・ニガーのβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子（L. M. Boddy et al. Curr. Genet., 24, 60-66 (1993)）と同様に、ペニシリウム・ロックフォルティーおよびスコプラリオプシス・ブレビカウリスのβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子には、成熟蛋白質としてそれぞれ５６５および５７４アミノ酸をコードする翻訳領域を推定することができ、かつその発現産物のβ－フルクトフラノシダーゼ活性を確認した。

〔発 明 の 概 要〕

本発明者らは、今般、先に本発明者らの一部によって見出されたペニシリウム・ロックフォルティーおよびスコプラリオプシス・ブレビカウリス由来のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子のＣ末端に３８および３９アミノ酸が付加されることで、その活性が向上することを見出した。

よって本発明は、新規なβ－フルクトフラノシダーゼおよびその遺伝子の提供をその目的としている。

そして、本発明による新規なβ－フルクトフラノシダーゼは、配列表の配列番号１または３に記載のアミノ酸配列またはその相同体を含んでなるポリペプチドである。

また、本発明によるその遺伝子は上記ポリペプチドをコードするＤＮＡである。

本発明による配列番号１および３に示されるアミノ酸配列は、上記したように先に本発明者らの一部によって見出されたペニシリウム・ロックフォルティーおよびスコプラリオプシス・ブレビカウリス由来のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子のＣ末端に３８および３９アミノ酸が付加されて構成される。先に本発明者らの一部が、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子のＣ末端アミノ酸をコードしていると推定していた位置に、実際にはイントロンが存在し、これら遺伝子がＣ末端にさらに３８および３９アミノ酸をそれぞれコードしていることが見出された。

これらC末端アミノ酸の付加によりβ－フラクトフラノシダーゼ活性は、これら配列の付加のないときと比較して意外にも大きく向上していた。

〔図面の簡単な説明〕

図１A、B、C、およびDは、配列表の配列番号１に示されているアミノ酸配列からなる酵素蛋白質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターｐＹＰＥＮ０２、および配列表の配列番号１に示されているアミノ酸配列の内１番目から５６５番目までのアミノ酸配列からなる酵素蛋白質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクター　ｐＹＰＥＮ０１の作製法を示した図である。

図２ＡおよびＢは、配列表の配列番号３に示されているアミノ酸配列からなる酵素蛋白質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターｐＹＳＣＯＰ０２、および配列表の配列番号３に示されているアミノ酸配列の内１番目から５７４番目までのアミノ酸配列からなる酵素蛋白質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターｐＹＳＣＯＰ０１の作製法を示した図である。

〔発明の具体的説明〕

β- フルクトフラノシダーゼ

本発明によるポリペプチドは、配列表の配列番号１または３に示されるアミノ酸配列を有するものである。この配列番号１または３に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドはβ－フルクトフラノシダーゼ作用を有する酵素として作用する。また、本発明によるポリペプチドには、配列表の配列番号１または３に示されるアミノ酸配列の相同体が含まれる。ここで「その相同体」とは、配列番号１および３に示されるアミノ酸配列において、幾つかの（例えば、１～数個の）アミノ酸の挿入、置換または欠失、若しくはその一方または両末端への付加がなされたものであって、かつそのβ－フルクトフラノシダーゼ作用を保持するものをいうものとする。このような「相同体」は、配列番号１または３に示される配列を参照すれば、当業者であれば格別の困難性なしに選択し、製造可能であるこ

とは明らかである。

本発明による配列番号１および３に記載のアミノ酸配列を有するβ－フルクトフラノシダーゼは、その転移活性が高く、フラクトオリゴ糖を効率良く生成する。具体的には、３０％以上のショ糖を基質として用いた反応において、転移活性が加水分解活性に対して、配列番号１に記載のアミノ酸配列を有するβ－フルクトフラノシダーゼは４倍以上高く、また、配列番号３に記載のアミノ酸配列を有するβ－フルクトフラノシダーゼは７倍以上高い。さらに、ショ糖からフラクトオリゴ糖への変換率はともに５０％以上である。

β- フルクトフラノシダーゼ遺伝子

本発明によるβ－フルクトフラノシダーゼをコードする新規遺伝子は、配列番号１および３に示されるアミノ酸配列またはその相同体をコードするＤＮＡ配列を含んでなるものである。

一般に、蛋白質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は、いわゆるコドン表を参照して容易に定まる。よって、配列番号１あるいは３に示されるアミノ酸配列をコードする種々の塩基配列を適宜選択することが可能である。従って、本発明において「配列番号１あるいは３に示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列」とは、配列番号２あるいは４に示される塩基配列を有するもの、およびその縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一の塩基配列を有しかつ配列番号１あるいは３に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列をも意味するものとする。

本発明の好ましい態様によれば、本発明による新規遺伝子の好ましい具体例として、配列表の配列番号２または４に示される塩基配列を有するＤＮＡ配列を含んでなるＤＮＡ断片が提供される。

さらに、前記したように、本発明による新規遺伝子がコードする酵素には、配列番号１あるいは３に示されるアミノ酸配列の相同体をも包含するものである。

従って、本発明によるＤＮＡ断片には、さらにこの相同体をコードする塩基配列も包含される。

本発明によるＤＮＡ断片はその塩基配列が定まっていることから、そのＤＮＡ断片を取得する一つの手段は核酸合成の手法に従って製造することである。

また、この配列はペニシリウム・ロックフォルティー（Penicillium roqueforti）あるいはスコプラリオプシス・ブレビカウリス（Scopulariopsis brevicaulis）、好ましくはペニシリウム・ロックフォルティー　ＩＡＭ７２５４株あるいはスコプラリオプシス・ブレビカウリス　ＩＦＯ４８４３株、から遺伝子工学的手法を用いて得ることができる。

β－フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子の発現

本発明によるβ－フルクトフラノシダーゼは、それをコードするＤＮＡ断片によって形質転換された宿主細胞において製造することができる。より具体的には、本発明によるβ－フルクトフラノシダーゼをコードするＤＮＡ断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含むＤＮＡ分子、特に発現ベクター、の形態とし、それによって宿主細胞の形質転換を行い、その形質転換体を培養する。

従って、本発明によれば、さらに本発明によるβ－フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含んだＤＮＡ分子、特に発現ベクター、が提供される。このＤＮＡ分子は、ベクター分子に本発明によるβ－フルクトフラノシダーゼをコードするＤＮＡ断片を組み込むことによって得ることが出来る。本発明の好ましい態様によれば、このベクターはプラスミドである。

この本発明によるＤＮＡ分子の作成は遺伝子工学の分野で慣用されている手法に準じて実施されてよい。

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択することができ

る。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合はλファージ系のバクテリオファージ、ｐＢＲ，ｐＵＣ系のプラスミド、枯草菌の場合はｐＵＢ系のプラスミド、酵母の場合はＹＥｐ、ＹＣｐ系のベクターが挙げられる。

このプラスミドは形質転換体の選択マーカーを含むのが好ましく、選択マーカーとしては薬剤耐性マーカー、栄養要求マーカー遺伝子を使用することができる。その好ましい具体例としては、使用する宿主細胞が細菌の場合はアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などであり、酵母の場合はトリプトファン合成遺伝子（ＴＲＰ１）、ウラシル合成遺伝子（ＵＲＡ３）、ロイシン合成遺伝子（ＬＥＵ２）などがあり、カビの場合はハイグロマイシン耐性遺伝子（Ｈｙｇ）、ビアラホス耐性遺伝子（Ｂａｒ）、硝酸還元酵素遺伝子（ｎｉａＤ）などが挙げられる。

さらに、本発明による発現ベクターとしてのＤＮＡ分子は、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の発現に必要なＤＮＡ配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結信号などの転写調節信号、翻訳調節信号などを有しているのが好ましい。

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中において機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン（ｌａｃ）、トリプトファンオペロン（ｔｒｐ）等のプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ＡＤＨ）、酸性フォスファターゼ遺伝子（ＰＨＯ）、ガラクトース遺伝子（ＧＡＬ）、グリセロアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ＧＰＤ）などのプロモーター、カビではα－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙ）、セロビオハイドロラーゼＩ遺伝子（ＣＢＨＩ）等のプロモーターが好ましく用いることができるものとして挙げられる。

また、宿主細胞が枯草菌、酵母、カビの場合には、分泌型ベクターを使用して、菌体外に組換えβ－フルクトフラノシダーゼを分泌させることも有利である。宿

主細胞としては、宿主－ベクター系が確立されているものであるならばいずれも利用可能であるが、好ましくは酵母、カビなどが挙げられる。更に、ＰＣＴ／ＪＰ９７／００７５７に記載のβ－フラクトフラノシダーゼ活性を示さない糸状菌を用いることも好ましい。

前記した形質転換体の産生する組換え新規酵素は、次のようにして得ることが出来る。まず前記の宿主細胞を適切な条件下で培養し、得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により培養上清あるいは菌体を得る。菌体の場合にはこれを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨砕等により菌体を破砕し、遠心分離またはろ過により組換え新規酵素を含有する菌体抽出物を得る。

酵素の精製は、慣用されている分離、精製法を適宜組み合わせて実施することができる。例えば、熱処理のような耐熱性の差を利用する方法、塩沈澱および溶媒沈澱のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

β－フルクトフラノシダーゼを用いたフラクトオリゴ糖の製造

更に本発明によれば、前記の組換え宿主または組換えβ－フルクトフラノシダーゼを用いた、フラクトオリゴ糖の製造法が提供される。

すなわち、本発明によるフラクトオリゴ糖の製造法は、前記の組換え宿主または組換えβ－フルクトフラノシダーゼと、スクロースとを接触させることによって実施される。

本発明による組換え宿主または組換えβ－フルクトフラノシダーゼと、スクロースとの接触態様およびその条件は、組換え新規酵素が該糖に作用可能な様態で

ある限り特に限定されない。溶液中で接触させる場合の好ましい態様を示せば次の通りである。すなわち、スクロースの使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択してよいが、５～８０％の範囲とするのが一般的であり、好ましくは３０～７０％の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度およびｐＨ条件は、組換え新規酵素の最適条件下で行うことが好ましい。よって、３０～８０℃程度、ｐＨ４～１０程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは４０～７０℃、ｐＨ５～７の範囲である。

また、組換え新規酵素の精製の程度も適宜選択することができ、形質転換体の培養上清あるいは菌体破砕物から粗酵素のまま用いることもでき、また、各種精製工程で得られた精製酵素として利用してもよい。さらには各種精製手段を経て単離精製された酵素として用いてもよい。

更に酵素は、常法に準じて担体に固定化された状態でスクロースと接触させてもよい。

生成したフラクトオリゴ糖は、反応液を公知の方法に従い精製することにより得ることが出来る。例えば、加熱して酵素を失活させた後、活性炭により脱色し、さらに、イオン交換樹脂で脱塩する方法が挙げられる。

〔実　施　例〕

実施例１：ペニシリウム・ロックフォルティー（Penicillium roqueforti）ＩＡＭ７２５４株のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域の決定

アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger ）ATCC20611 株より定法に従って調製した染色体ＤＮＡを鋳型とし、配列表の配列番号５及び６に記載の合成ＤＮＡをプライマーに用いてＰＣＲを行い、アスペルギルス・ニガーのβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子を含む約２ｋｂｐのＤＮＡ断片を増幅した。このＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動で分画し、定法に従い抽出し、精製した後、

０．１μｇ／μｌとなるよう滅菌水に溶解してプローブ用ＤＮＡ試料とした。

次に、ペニシリウム・ロックフォルティーＩＡＭ７２５４株より染色体ＤＮＡを調製し、約２０μｇ分の染色体ＤＮＡ標品を制限酵素ＥｃｏＲＩで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動で分画し、４ｋｂｐ付近のＤＮＡ断片を回収した。

こうして回収した約４ｋｂｐのＤＮＡ断片約０．５μｇと、あらかじめ制限酵素ＥｃｏＲＩで消化し、フォスファターゼ処理を施しておいた、λｇｔ１０ベクター１μｇを連結し、ストラタジーン社製のｉｎ　ｖｉｔｒｏパッケージングキットＧＩＧＡＰＡＣＫII　Ｇｏｌｄを用いてパッケージングし、大腸菌ＮＭ５１４株に感染させることによりライブラリーを作成した。

上述のプローブ用ＤＮＡ試料よりプローブを作成し、ＥＣＬダイレクトＤＮＡ／ＲＮＡラベリング・検出システム（アマシャム社）を使用してプラークハイブリダイゼーションを行い、約２５０００個のプラークの中から４個の陽性クローンを得た。これらの陽性クローンについて２次スクリーニングを実施し、陽性クローンを純化した後、ファージＤＮＡを調製し、制限酵素による解析を行った結果、どのクローンも同一の約４ｋｂｐのＥｃｏＲＩ　ＤＮＡ断片を有することが明らかとなった。

この約４ｋｂｐのＥｃｏＲＩ　ＤＮＡ断片より必要な領域を適宜制限酵素で小断片化した後、プラスミドベクターｐＵＣ１１８またはｐＵＣ１１９にサブクローニングを行った。得られたサブクローンからプラスミドＤＮＡを定法により調製し、ファルマシア社製蛍光シークエンサーＡＬＦｒｅｄ　ＤＮＡシークエンサーを用いて塩基配列を決定した。この結果、配列表の配列番号７に示される塩基配列が得られた。

この塩基配列中の１６９５番目から１７４４番目までの５０塩基からなる塩基配列は、糸状菌の典型的なイントロンの構造を有していることから、イントロンであると同定した。その結果、配列表の配列番号７に示される塩基配列よりイン

トロン配列を除き、蛋白質をコードする塩基配列として配列表の配列番号２に示される塩基配列が得られた。また、対応するアミノ酸配列は配列表の配列番号１に示される通りである。

実施例２：酵母（Saccharomyces cerevisiae）によるペニシリウム・ロックフォルティー（Penicillium roqueforti）ＩＡＭ７２５４株由来のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の発現

ペニシリウム・ロックフォルティー由来のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の発現用プラスミドであるｐＹＰＥＮ０１およびｐＹＰＥＮ０２は以下の様にして作製した（図１Ａ、Ｂ、Ｃ、およびＤ）。

まず、ｐＹＰＲ２８３１（H. Horiuchi et al., Agric. Biol. Chem., 54, 1771-1779, 1990）を制限酵素ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩで消化した後、末端をＴ４ＤＮＡポリメラーゼを用いて平滑化した。これにＢａｍＨＩリンカー（5’－ＣＧＧＡＴＣＣＧ－3’）を連結し、ＢａｍＨＩで消化した後、自己連結して酵母用発現ベクターｐＹ２８３１を得た。

次に、実施例１で調製したβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子を含む約４ｋｂｐのＥｃｏＲＩ　ＤＮＡ断片をプラスミドｐＵＣ１１８に挿入して得たプラスミドｐＰＲＳ０１より一本鎖ＤＮＡを調製した。これを鋳型として、配列表の配列番号８の合成ＤＮＡをプライマーとし、部位特異的変異を行い、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域内に存在するＢａｍＨＩ部位を、コードしているアミノ酸配列に変化がないような形で破壊した（ｐＰＲＳ０２）。

プラスミドｐＰＲＳ０２を鋳型として、配列表の配列番号９および１０の合成ＤＮＡをプライマーとしてＰＣＲを行い、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域の一部を約１．８ｋｂｐのＢａｍＨＩ　ＤＮＡ断片として調製し、これをプラスミドｐＹ２８３１のＢａｍＨＩ部位に挿入してプラスミドｐＹＰＥＮ０１を作製した。従って、プラスミドｐＹＰＥＮ０１は、分泌シグナル配列に引き

続く成熟β－フルクトフラノシダーゼとして、配列表の配列番号１に示されているアミノ酸配列の内１番目から５６５番目までのアミノ酸配列からなる酵素蛋白質を生産するように設計されている。

さらに、プラスミドｐＰＲＳ０２を鋳型として、配列表の配列番号９および１１の合成ＤＮＡをプライマーとしてＰＣＲを行い、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域を含むＤＮＡ断片を約１．８ｋｂｐのＢａｍＨＩ　ＤＮＡ断片として調製し、これをプラスミドｐＵＣ１１８のＢａｍＨＩ部位に挿入してプラスミドｐＰＲＳ０３を得た。プラスミドｐＰＲＳ０３より一本鎖ＤＮＡを調製し、これを鋳型として、配列表の配列番号１２の合成ＤＮＡをプライマーとし、部位特異的変異を行い、イントロン配列を除去した（ｐＰＲＳ０４）。プラスミドｐＰＲＳ０４より、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域を約１．８ｋｂｐのＢａｍＨＩ　ＤＮＡ断片として調製し、これをプラスミドｐＹ２８３１のＢａｍＨＩ部位に挿入してプラスミドｐＹＰＥＮ０２を作製した。従って、プラスミドｐＹＰＥＮ０２は、分泌シグナル配列に引き続く成熟β－フルクトフラノシダーゼとして、配列表の配列番号１に示されているアミノ酸配列からなる酵素蛋白質を生産するように設計されている。

プラスミドｐＹＰＥＮ０１およびｐＹＰＥＮ０２を酵母サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）ＭＳ－１６１株（Suc-, ura3, trp1）に酢酸リチウム法（Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983）で導入し、形質転換体を得た。これらの形質転換体をＳＤ－Ｕｒａ培地（０．６７％酵母ニトロゲンベース（ディフコ）、２％グルコース、５０μｇ／ｍｌウラシル）で、３０℃、一晩培養した。この培養液を終濃度が１％となるように生産培地（０．６７％酵母ニトロゲンベース（ディフコ）、２％グルコース、２％カザミノ酸、５０μｇ／ｍｌウラシル）にシードし、３０℃、２日間培養して得た培養上清を用いてβ－フルクトフラノシダーゼ活性を測定した。β－フルクトフラノ

シダーゼ活性は、１０重量％ショ糖溶液、ｐＨ５．５、４０℃、６０分間の条件で反応させたとき、１分間に１μｍｏｌのグルコースを遊離させる活性を１単位とした。その結果、プラスミドｐＹＰＥＮ０１による形質転換体では$4X10^{-4}$単位／ｍｌ以下の活性であったのに対し、プラスミドｐＹＰＥＮ０２による形質転換体では０．３８単位／ｍｌの活性が検出された。

実施例３：スコプラリオプシス・ブレビカウリス（Scopulariopsis brevicaulis）ＩＦＯ４８４３株のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域の決定

スコプラリオプシス・ブレビカウリスＩＦＯ４８４３株より染色体ＤＮＡを調製し、約２０μｇ分の染色体ＤＮＡ標品を制限酵素ＥｃｏＲＩで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動で分画し、１０ｋｂｐ付近のＤＮＡ断片を回収した。

こうして回収した約１０ｋｂｐのＤＮＡ断片約０．５μｇと、あらかじめ制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ とＥｃｏＲＩで二重消化しておいたλＤＡＳＨＩＩベクター１μｇを連結し、ストラタジーン社製のｉｎ　ｖｉｔｒｏパッケージングキットＧＩＧＡＰＡＣＫＩＩ　Ｇｏｌｄを用いてパッケージングし、大腸菌ＸＬＩ－ＢｌｕｅＭＲＡ（Ｐ２）株に感染させることによりライブラリーを作成した。

実施例１で使用した約２ｋｂｐのＤＮＡ断片をプローブとして用い、ＥＣＬダイレクトＤＮＡ／ＲＮＡラベリング・検出システム（アマシャム社）を使用してプラークハイブリダイゼーションを行い、約１５０００個のプラークの中から３個の陽性クローンを得た。これらの陽性クローンについて２次スクリーニングを実施し、陽性クローンを純化した後、ファージＤＮＡを調製し、制限酵素による解析を行った結果、どのクローンも同一の約１０ｋｂｐのＥｃｏＲＩ　ＤＮＡ断片を有することが明らかとなった。

この約１０ｋｂｐのＥｃｏＲＩ　ＤＮＡ断片より必要な領域を適宜制限酵素で小断片化した後にプラスミドベクターｐＵＣ１１８あるいはｐＵＣ１１９にサブクローニングを行った。得られたサブクローンからプラスミドＤＮＡを定法によ

り調製し、ファルマシア社製蛍光シークエンサーＡＬＦｒｅｄ　ＤＮＡシークエンサーを用いて塩基配列を決定した。この結果、配列表の配列番号１３に示される塩基配列が得られた。

この塩基配列中の１７２２番目から１７７６番目までの５５塩基からなる塩基配列は糸状菌の典型的なイントロンの構造を有していることからイントロンであると同定した。その結果、配列表の配列番号１３に示される塩基配列よりイントロン配列を除き、蛋白質をコードする塩基配列として配列表の配列番号４に示される塩基配列が得られた。また、対応するアミノ酸配列は配列表の配列番号３に示される通りである。

実施例４：酵母（Saccharomyces cerevisiae）によるスコプラリオプシス・ブレビカウリス（Scopulariopsis brevicaulis）ＩＦＯ４８４３株のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の発現

スコプラリオプシス・ブレビカウリス（Scopulariopsis brevicaulis）由来のβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の発現用プラスミドであるｐＹＳＣＯＰ０１およびｐＹＳＣＯＰ０２は以下のようにして作製した（図２ＡおよびＢ）。

まず、実施例３で調製したβ－フルクトフラノシダーゼ遺伝子を含む約１０ｋｂｐのＥｃｏＲＩ　ＤＮＡ断片を鋳型として、配列表の配列番号１４および１５の合成ＤＮＡをプライマーとしてＰＣＲを行い、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域の一部を約１．８ｋｂｐのＢａｍＨＩ　ＤＮＡ断片として調製し、これをプラスミドｐＹ２８３１のＢａｍＨＩ部位に挿入してプラスミドｐＹＳＣＯＰ０１を作製した。従って、プラスミドｐＹＰＥＮ０１は、分泌シグナル配列に引き続く成熟β－フルクトフラノシダーゼとして、配列表の配列番号３に示されているアミノ酸配列の内１番目から５７４番目までのアミノ酸配列からなる酵素蛋白質を生産するように設計されている。

次に、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子を含む約１０ｋｂｐのＥｃｏＲＩ

ＤＮＡ断片を鋳型として、配列表の配列番号１４および１６の合成ＤＮＡをプライマーとしてＰＣＲを行い、β－フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域を含むＤＮＡ断片を約１．９ｋｂｐのＢａｍＨＩ　ＤＮＡ断片として調製し、これをプラスミドｐＵＣ１１８のＢａｍＨＩ部位に挿入してプラスミドｐＳＣＢ０１を得た。プラスミドｐＳＣＢ０１より一本鎖ＤＮＡを調製し、これを鋳型として、配列表の配列番号１７の合成ＤＮＡをプライマーとし、部位特異的変異を行い、イントロン配列を除去した（ｐＳＣＢ０２）。プラスミドｐＳＣＢ０２より、β- フルクトフラノシダーゼ遺伝子の翻訳領域を約１．９ｋｂｐのＢａｍＨＩ ＤＮＡ断片として調製し、これをプラスミドｐＹ２８３１のＢａｍＨＩ部位に挿入してプラスミドｐＹＳＣＯＰ０２を作製した。従って、プラスミドｐＹＳＣＯＰ０２は、分泌シグナル配列に引き続く成熟β－フルクトフラノシダーゼとして、配列表の配列番号３に示されているアミノ酸配列からなる酵素蛋白質を生産するように設計されている。

プラスミドｐＹＳＣＯＰ０１およびｐＹＳＣＯＰ０２を酵母サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）ＭＳ－１６１株（Suc-, ura3, trp1）に酢酸リチウム法で導入し、形質転換体を得た。これらの形質転換体をＳＤ－Ｕｒａ培地で、３０℃、一晩培養した。この培養液を終濃度が１％となるように生産培地にシードし、３０℃、２日間培養して得た培養上清を用いて、実施例２に記載の方法でβ－フルクトフラノシダーゼ活性を測定した。その結果、プラスミドｐＹＳＣＯＰ０１による形質転換体では4×10^{-4}単位／ｍｌ以下の活性であったのに対し、プラスミドｐＹＳＣＯＰ０２による形質転換体では6.5×10^{-3}単位／ｍｌの活性が検出された。

請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列またはその相同体を含んでなる、ポリペプチド。

2. 請求項1に記載のポリペプチドをコードする、ＤＮＡ。

3. 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を含んでなる、請求項2に記載のＤＮＡ。

4. 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列またはその相同体を含んでなる、ポリペプチド。

5. 請求項4に記載のポリペプチドをコードする、ＤＮＡ。

6. 配列表の配列番号4に記載の塩基配列を含んでなる、請求項5に記載のＤＮＡ。

7. 請求項2、3、5、または6に記載のＤＮＡを含んでなる、ベクター。

8. 請求項7に記載のベクターで形質転換されてなる、宿主細胞。

9. 請求項8に記載の宿主細胞を培養し、その宿主および／またはその培養物からβ－フルクトフラノシダーゼを採取する工程を含んでなる、β－フルクトフラノシダーゼの製造法。

10. 請求項8に記載の宿主細胞または請求項9に記載の方法によって得られたβ－フルクトフラノシダーゼと、スクロースとを接触させる工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

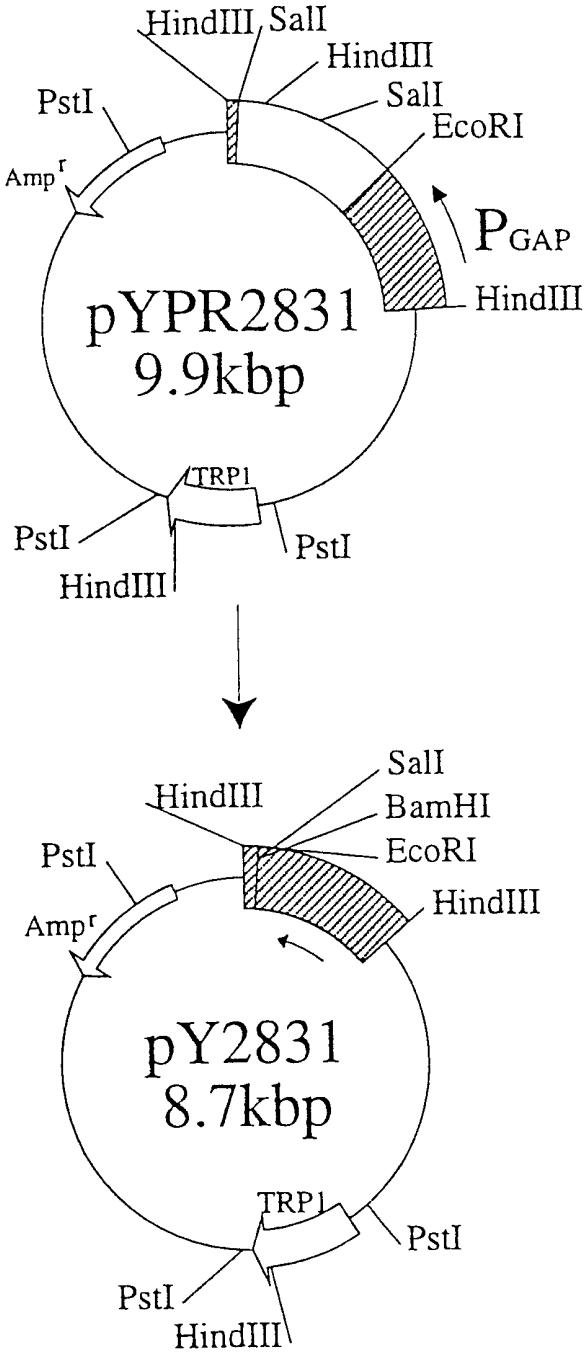

HindIII
SalI
HindIII
SalI
EcoRI
PstI
Amp r
P GAP
HindIII
pYPR2831
9.9kbp
TRP1
PstI
PstI
HindIII
SalI
HindIII
BamHI
EcoRI
PstI
HindIII
Amp r
pY2831
8.7kbp
TRP1
PstI
PstI
HindIII

FIG. 1A

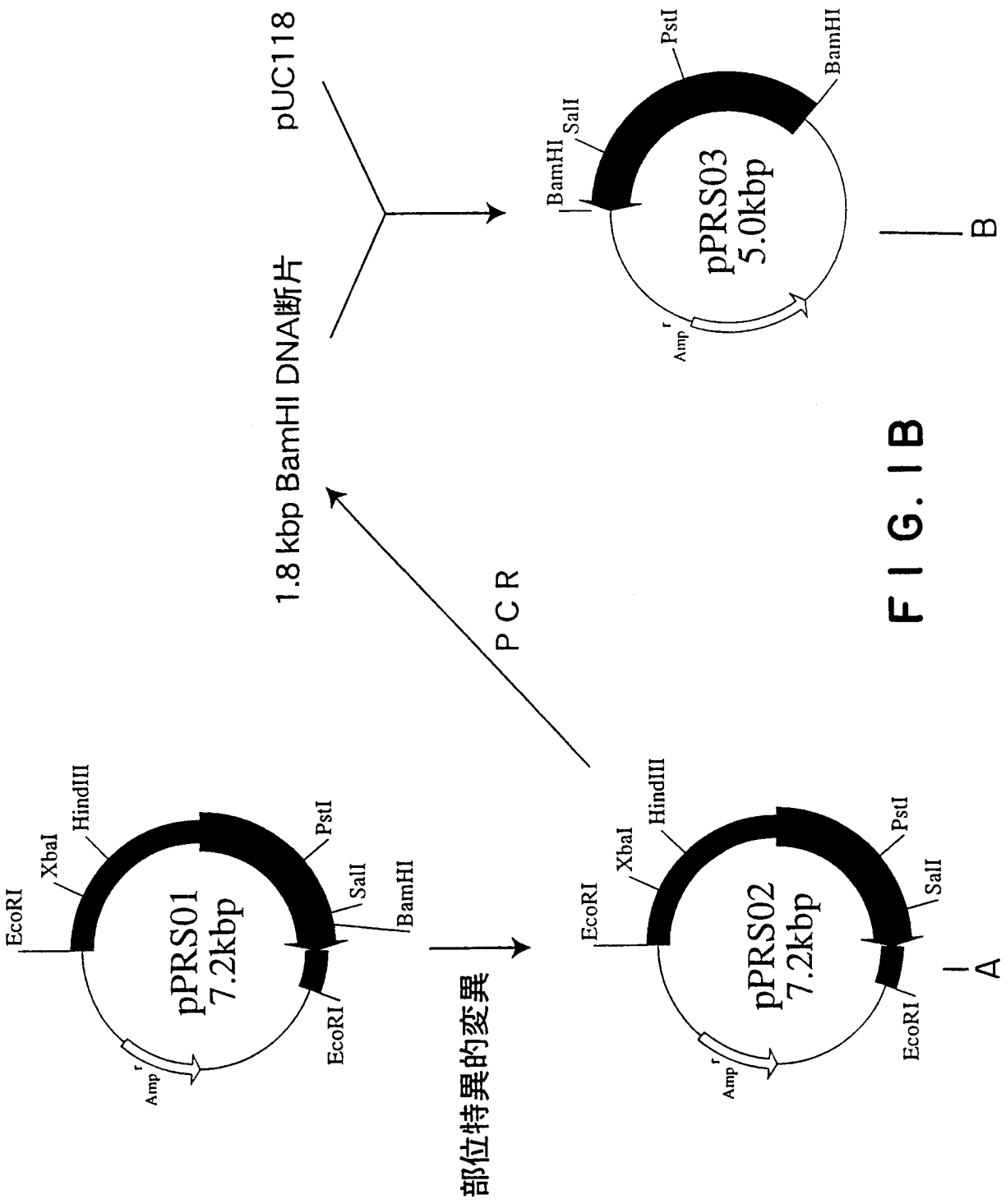

pPRS01
7.2kbp
EcoRI
XbaI
HindIII
PstI
SalI
BamHI
EcoRI
Amp r
部位特異的変異
PCR
1.8 kbp BamHI DNA断片
pUC118
pPRS02
7.2kbp
EcoRI
XbaI
HindIII
PstI
SalI
EcoRI
Amp r
pPRS03
5.0kbp
BamHI
SalI
PstI
BamHI
Amp r
A
B

FIG. 1B

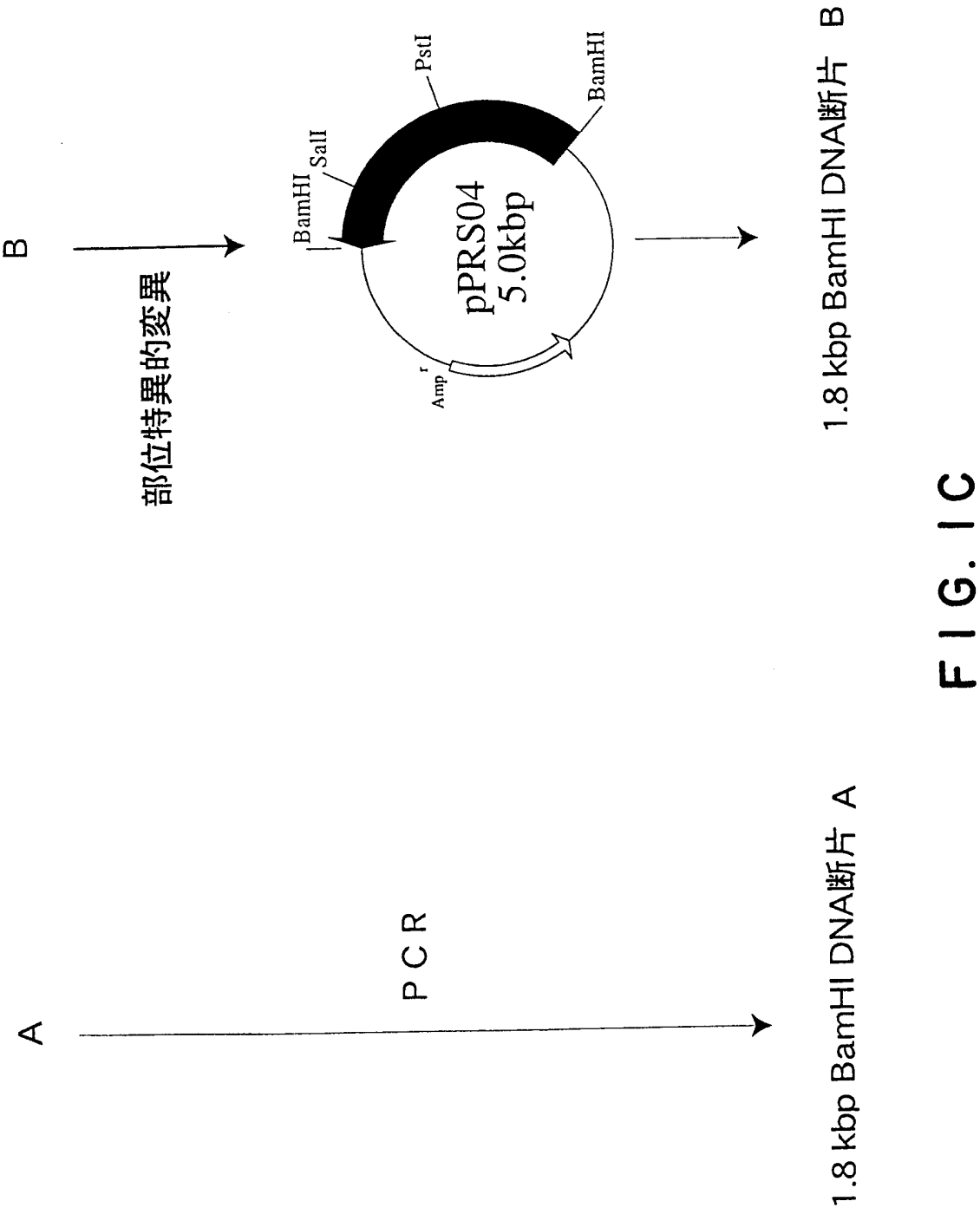

A
PCR
1.8 kbp BamHI DNA断片 A
B
部位特異的変異
BamHI
SalI
PstI
BamHI
pPRS04
5.0kbp
Amp r
1.8 kbp BamHI DNA断片 B

FIG. IC

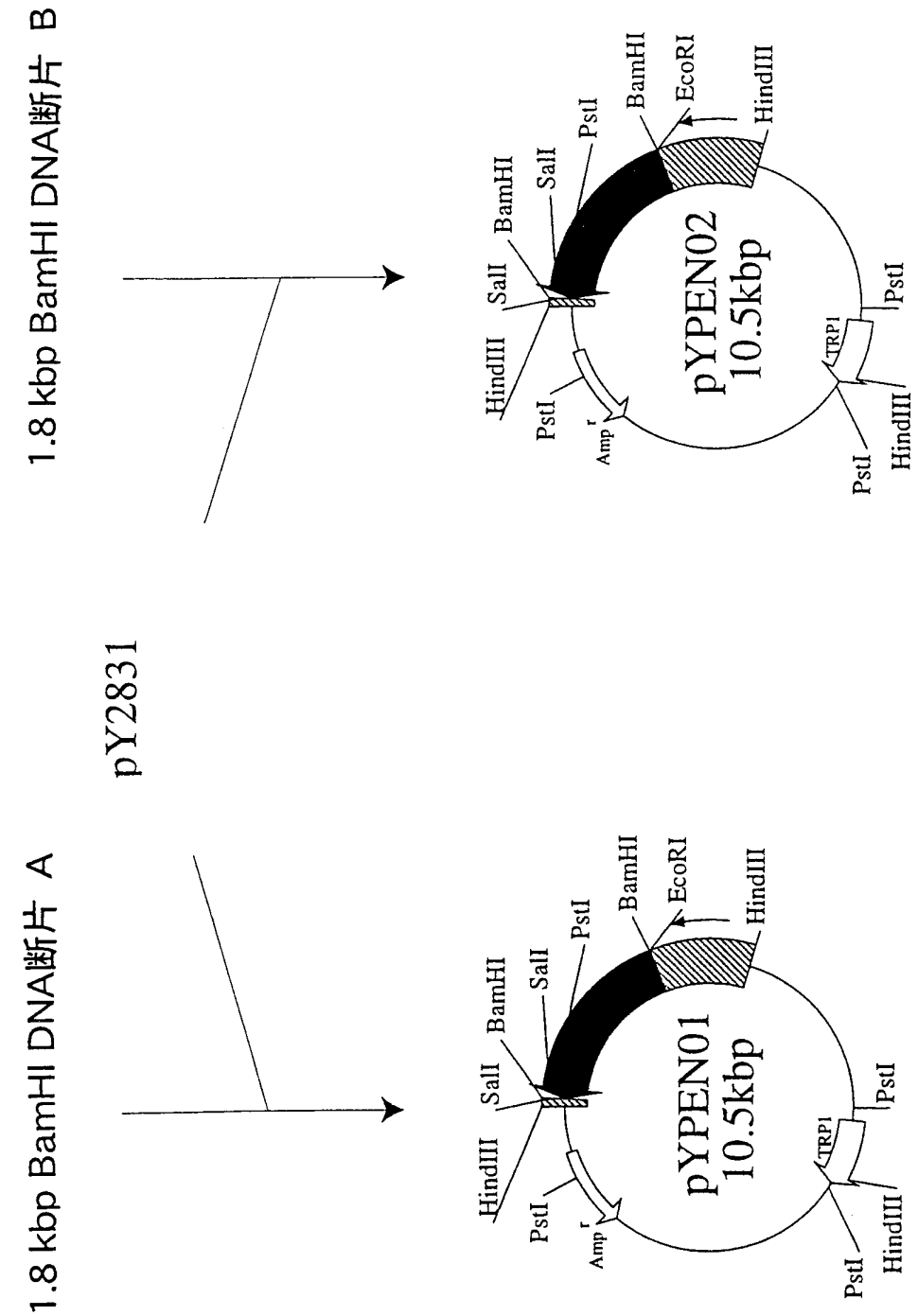

1.8 kbp BamHI DNA断片 A
pY2831
1.8 kbp BamHI DNA断片 B
pYPEN01
10.5kbp
pYPEN02
10.5kbp
BamHI
EcoRI
HindIII
PstI
SalI
BamHI
PstI
HindIII
Amp r
TRP1
PstI
HindIII

FIG. 1D

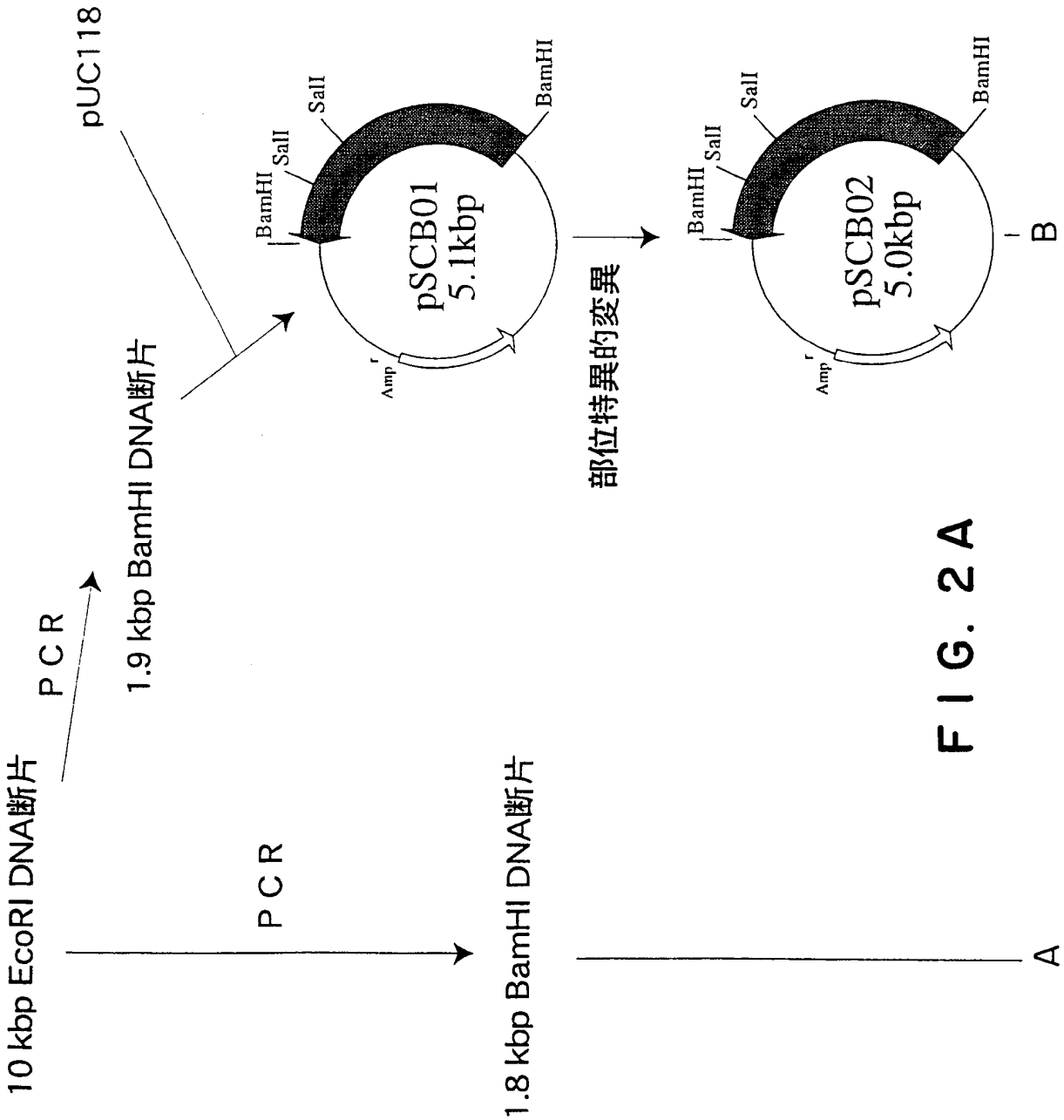

10 kbp EcoRI DNA断片
PCR
1.9 kbp BamHI DNA断片
pUC118
BamHI
SalI
SalI
BamHI
pSCB01
5.1kbp
Amp r
PCR
1.8 kbp BamHI DNA断片
A
部位特異的変異
BamHI
SalI
SalI
BamHI
pSCB02
5.0kbp
Amp r
B

FIG. 2A

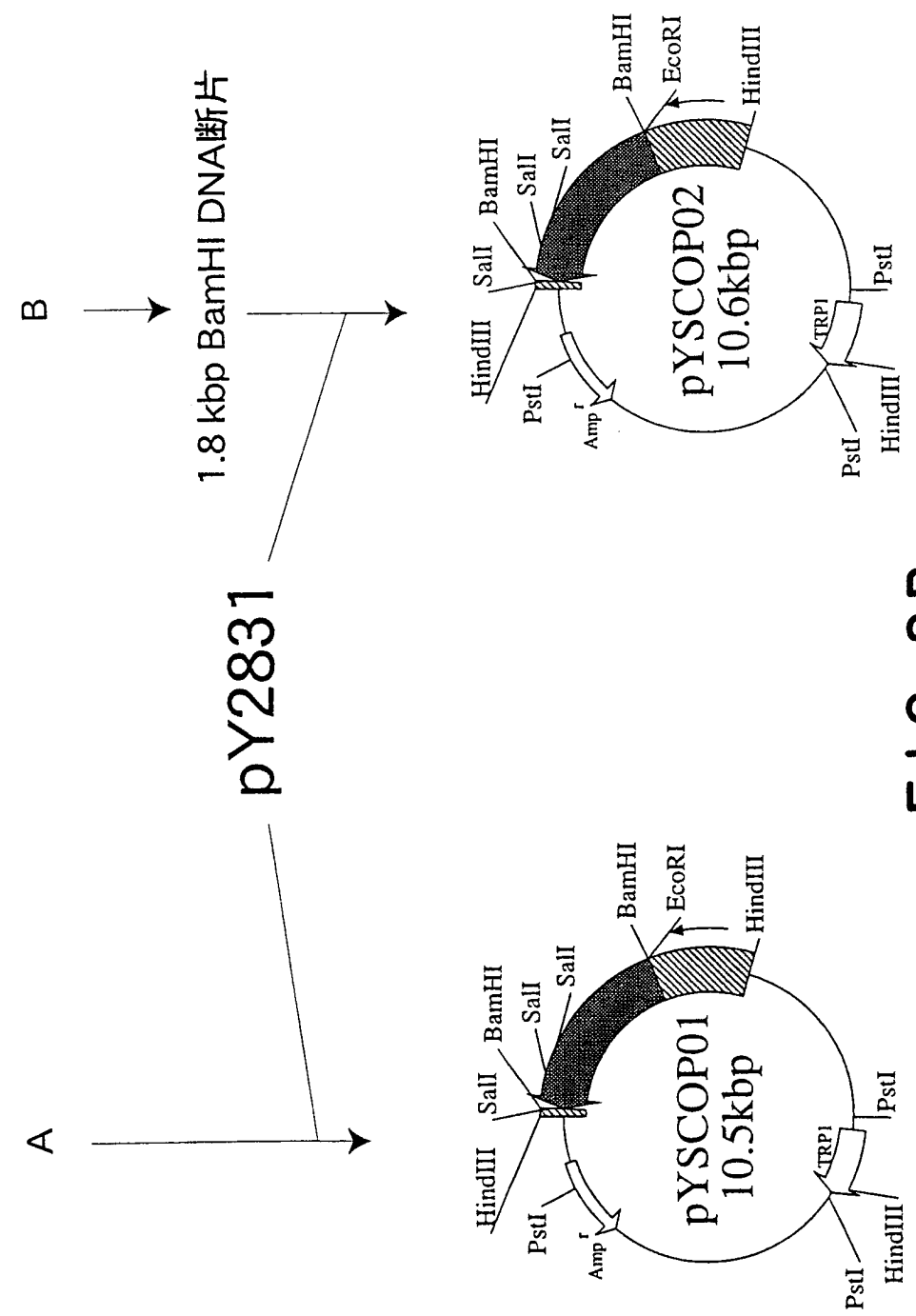

A
B
pY2831
1.8 kbp BamHI DNA断片
pYSCOP01
10.5kbp
pYSCOP02
10.6kbp
BamHI
EcoRI
HindIII
SalI
SalI
BamHI
SalI
HindIII
PstI
Amp r
TRP1
PstI
HindIII
PstI

FIG. 2B

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Beta-fructofuranosidase and its gene

<130> 116875-475

<140>

<141> 1998-9-10

<150> JP/245154/1997

<151> 1997-9-10

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 603

<212> PRT

<213> Penicillium roqueforti IAM7254

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)...(603)

<400> 1

Val Asp Phe His Thr Pro Ile Asp Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Asn Leu

1 5 10 15

Ser Thr Leu Ala Asn Ala Ser Leu Phe Lys Thr Trp Arg Pro Arg Ala
20 25 30

His Leu Leu Pro Pro Ser Gly Asn Ile Gly Asp Pro Cys Gly His Tyr
35 40 45

Thr Asp Pro Lys Thr Gly Leu Phe His Val Gly Trp Leu Tyr Ser Gly
50 55 60

Ile Ser Gly Ala Thr Thr Asp Asp Leu Val Thr Tyr Lys Asp Leu Asn
65 70 75 80

Pro Asp Gly Ala Pro Ser Ile Val Ala Gly Gly Lys Asn Asp Pro Leu
85 90 95

Ser Val Phe Asp Gly Ser Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Met Pro
100 105 110

Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Val Ser Tyr Leu Pro Ile His Trp Ser Ile
115 120 125

Pro Tyr Thr Arg Gly Ser Glu Thr Gln Ser Leu Ala Val Ser Tyr Asp
130 135 140

Gly Gly His Asn Phe Thr Lys Leu Asn Gln Gly Pro Val Ile Pro Thr
145 150 155 160

Pro Pro Phe Ala Leu Asn Val Thr Ala Phe Arg Asp Pro Tyr Val Phe
165 170 175

Gln Ser Pro Ile Leu Asp Lys Ser Val Asn Ser Thr Gln Gly Thr Trp
180 185 190

Tyr Val Ala Ile Ser Gly Gly Val His Gly Val Gly Pro Cys Gln Phe
195 200 205

Leu Tyr Arg Gln Asn Asp Ala Asp Phe Gln Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly
210 215 220

Gln Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Thr Thr Trp Gly Lys Gly Asp Trp
225 230 235 240

Ala Gly Gly Trp Gly Phe Asn Phe Glu Val Gly Asn Val Phe Ser Leu

245 250 255

Asn Ala Glu Gly Tyr Ser Glu Asp Gly Glu Ile Phe Ile Thr Leu Gly

260 265 270

Ala Glu Gly Ser Gly Leu Pro Ile Val Pro Gln Val Ser Ser Ile Arg

275 280 285

Asp Met Leu Trp Val Thr Gly Asn Val Thr Asn Asp Gly Ser Val Thr

290 295 300

Phe Lys Pro Thr Met Ala Gly Val Leu Asp Trp Gly Val Ser Ala Tyr

305 310 315 320

Ala Ala Ala Gly Lys Ile Leu Pro Ala Ser Ser Gln Ala Ser Thr Lys

325 330 335

Ser Gly Ala Pro Asp Arg Phe Ile Ser Tyr Val Trp Leu Thr Gly Asp

340 345 350

Leu Phe Glu Gln Val Lys Gly Phe Pro Thr Ala Gln Gln Asn Trp Thr

355 360 365

Gly Ala Leu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Asn Val Arg Thr Ile Ser Asn

370 375 380

Val Val Asp Asn Glu Leu Ser Arg Glu Ser Leu Thr Ser Trp Arg Val

385 390 395 400

Ala Arg Glu Asp Ser Gly Gln Ile Asp Leu Glu Thr Met Gly Ile Ser

405 410 415

Ile Ser Arg Glu Thr Tyr Ser Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Phe Val

420 425 430

Glu Ser Gly Lys Thr Leu Ser Asn Ala Gly Ala Val Pro Phe Asn Thr

435 440 445

Ser Pro Ser Ser Lys Phe Phe Val Leu Thr Ala Asn Ile Ser Phe Pro

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Ser Leu Glu Ser Thr Thr Ile Tyr Tyr Gln Phe Ser Asn Glu Ser
485 490 495

Ile Ile Val Asp Arg Ser Asn Thr Ser Ala Ala Ala Arg Thr Thr Ala
500 505 510

Gly Ile Leu Ser Asp Asn Glu Ala Gly Arg Leu Arg Leu Phe Asp Val
515 520 525

Leu Arg Asn Gly Lys Glu Gln Val Glu Thr Leu Glu Leu Thr Ile Val
530 535 540

Val Asp Asn Ser Val Leu Glu Val Tyr Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu
545 550 555 560

Gly Thr Trp Ala Arg Ser Trp Tyr Ala Asn Ser Thr Lys Ile Asn Phe
565 570 575

Phe His Asn Gly Val Gly Glu Ala Thr Phe Glu Asp Val Thr Val Phe
580 585 590

Glu Gly Leu Tyr Asp Ala Trp Pro Gln Arg Lys
595 600

<210> 2

<211> 1809

<212> DNA

<213> Penicillium roqueforti IAM7254

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)...(1809)

<400> 2

gttgatttcc ataccccgat tgactataac tcggctccgc caaacctttc taccctggca 60

aacgcatctc ttttcaagac atggagaccc agagcccatc ttctccctcc atctgggaac 120

ataggcgacc cgtgcgggca ctataccgat cccaagactg gtctcttcca cgtgggttgg 180

ctttacagtg ggatttcggg agcgacaacc gacgatctcg ttacctataa agacctcaat 240

cccgatggag ccccgtcaat tgttgcagga ggaaagaacg accctctttc tgtcttcgat 300

ggctcggtca ttccaagcgg tatagacggc atgccaactc ttctgtatac ctctgtatca 360

tacctcccaa tccactggtc catcccctac acccggggaa gcgagacaca atccttggcc 420

gtttcctatg acggtggtca caacttcacc aagctcaacc aagggcccgt gatccctacg 480

cctccgtttg ctctcaatgt caccgctttc cgtgacccct acgttttcca aagcccaatt 540

ctggacaaat ctgtcaatag tacccaagga acatggtatg tcgccatatc tggcggtgtc 600

cacggtgtcg gaccttgtca gttcctctac cgtcagaacg acgcagattt tcaatattgg 660

gaatatctcg ggcaatggtg gaaggagccc cttaatacca cttggggaaa gggtgactgg 720

gccgggggtt ggggcttcaa ctttgaggtt ggcaacgtct ttagtctgaa tgcagagggg 780

tatagtgaag acggcgagat attcataacc ctcggtgctg agggttcggg acttcccatc 840

gttcctcaag tctcctctat tcgcgatatg ctgtgggtga ccggcaatgt cacaaatgac 900

ggctctgtca ctttcaagcc aaccatggcg ggtgtgcttg actggggcgt gtcggcatat 960

gctgctgcag gcaagatctt gccggccagc tctcaggcat ccacaaagag cggtgccccc 1020

gatcggttca tttcctatgt ctggctcact ggagatctat tcgagcaagt gaaaggattc 1080

cctaccgctc aacaaaactg gaccggggcc ctcttactgc cgcgagagct gaatgtccgc 1140

actatctcta acgtggtgga taacgaactt tcgcgtgagt ccttgacatc gtggcgcgtg 1200

gcccgcgaag actctggtca gatcgacctt gaaacaatgg gaatctcaat ttccagggag 1260

acttacagcg ctctcacatc cggctcatct tttgtcgagt ctggtaaaac gttgtcgaat 1320

gctggagcag tgcccttcaa tacctcaccc tcaagcaagt tcttcgtgct gacagcaaat 1380

atatctttcc cgacctctgc ccgtgactct ggcatccagg ctggtttcca ggttttatcc 1440

tctagtcttg agtctacaac tatctactac caattctcca acgagtccat catcgtcgac 1500

cgcagcaaca cgagtgctgc ggcgagaaca actgctggga tcctcagtga taacgaggcg 1560

ggacgtctgc gcctcttcga cgtgttgcga aatggaaaag aacaggttga aactttggag 1620

ctcactatcg tggtggataa tagtgtactg gaagtatatg ccaatggacg ctttgctcta 1680

ggcacttggg ctcggtcttg gtacgccaac tcgactaaaa ttaacttctt ccataacggc 1740

gtgggagaag cgacattcga agatgtgacg gtctttgaag gactgtatga tgcctggcca 1800

caaaggaag 1809

<210> 3

<211> 613

<212> PRT

<213> Scopulariopsis brevicaulis IF04843

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)...(613)

<400> 3

Gln Pro Thr Ser Leu Ser Ile Asp Asn Ser Thr Tyr Pro Ser Ile Asp
1 5 10 15

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

Phe Glu Thr Trp Arg Pro Arg Ala His Val Leu Pro Pro Gln Asn Gln
35 40 45

Ile Gly Asp Pro Cys Met His Tyr Thr Asp Pro Glu Thr Gly Ile Phe
50 55 60

His Val Gly Trp Leu Tyr Asn Gly Asn Gly Ala Ser Gly Ala Thr Thr
65 70 75 80

Glu Asp Leu Val Thr Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Asp Gly Ala Gln Met
85 90 95

Ile Leu Pro Gly Gly Val Asn Asp Pro Ile Ala Val Phe Asp Gly Ala
100 105 110

Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Gly Lys Pro Thr Met Met Tyr Thr Ser
115 120 125

Val Ser Tyr Met Pro Ile Ser Trp Ser Ile Ala Tyr Thr Arg Gly Ser
130 135 140

Glu Thr His Ser Leu Ala Val Ser Ser Asp Gly Gly Lys Asn Phe Thr
145 150 155 160

Lys Leu Val Gln Gly Pro Val Ile Pro Ser Pro Pro Phe Gly Ala Asn
165 170 175
Val Thr Ser Trp Arg Asp Pro Phe Leu Phe Gln Asn Pro Gln Phe Asp
180 185 190
Ser Leu Leu Glu Ser Glu Asn Gly Thr Trp Tyr Thr Val Ile Ser Gly
195 200 205
Gly Ile His Gly Asp Gly Pro Ser Ala Phe Leu Tyr Arg Gln His Asp
210 215 220
Pro Asp Phe Gln Tyr Trp Glu Tyr Leu Gly Pro Trp Trp Asn Glu Glu
225 230 235 240
Gly Asn Ser Thr Trp Gly Ser Gly Asp Trp Ala Gly Arg Trp Gly Tyr
245 250 255
Asn Phe Glu Val Ile Asn Ile Val Gly Leu Asp Asp Asp Gly Tyr Asn
260 265 270
Pro Asp Gly Glu Ile Phe Ala Thr Val Gly Thr Glu Trp Ser Phe Asp
275 280 285
Pro Ile Lys Pro Gln Ala Ser Asp Asn Arg Glu Met Leu Trp Ala Ala
290 295 300
Gly Asn Met Thr Leu Glu Asp Gly Asp Ile Lys Phe Thr Pro Ser Met
305 310 315 320
Ala Gly Tyr Leu Asp Trp Gly Leu Ser Ala Tyr Ala Ala Ala Gly Lys
325 330 335
Glu Leu Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ser Gln Lys Ser Gly Ala Pro Asp
340 345 350
Arg Phe Val Ser Tyr Leu Trp Leu Thr Gly Asp Tyr Phe Glu Gly His
355 360 365
Asp Phe Pro Thr Pro Gln Gln Asn Trp Thr Gly Ser Leu Leu Leu Pro
370 375 380
Arg Glu Leu Ser Val Gly Thr Ile Pro Asn Val Val Asp Asn Glu Leu

385 390 395 400

Ala Arg Glu Thr Gly Ser Trp Arg Val Gly Thr Asn Asp Thr Gly Val

405 410 415

Leu Glu Leu Val Thr Leu Lys Gln Glu Ile Ala Arg Glu Thr Leu Ala

420 425 430

Glu Met Thr Ser Gly Asn Ser Phe Thr Glu Ala Ser Arg Asn Val Ser

435 440 445

Ser Pro Gly Ser Thr Ala Phe Gln Gln Ser Leu Asp Ser Lys Phe Phe

450 455 460

Val Leu Thr Ala Ser Leu Ser Phe Pro Ser Ser Ala Arg Asp Ser Asp

465 470 475 480

Leu Lys Ala Gly Phe Glu Ile Leu Ser Ser Glu Phe Glu Ser Thr Thr

485 490 495

Val Tyr Tyr Gln Phe Ser Asn Glu Ser Ile Ile Ile Asp Arg Ser Asn

500 505 510

Ser Ser Ala Ala Ala Leu Thr Thr Asp Gly Ile Asp Thr Arg Asn Glu

515 520 525

Phe Gly Lys Met Arg Leu Phe Asp Val Val Glu Gly Asp Gln Glu Arg

530 535 540

Ile Glu Thr Leu Asp Leu Thr Ile Val Val Asp Asn Ser Ile Val Glu

545 550 555 560

Val His Ala Asn Gly Arg Phe Ala Leu Ser Thr Trp Val Arg Ser Trp

565 570 575

Tyr Glu Ser Ser Lys Asp Ile Lys Phe Phe His Asp Gly Asp Ser Thr

580 585 590

Val Gln Phe Ser Asn Ile Thr Val Tyr Glu Gly Leu Phe Asp Ala Trp

595 600 605

Pro Glu Arg Ala Arg

610

<210> 4

<211> 1839

<212> DNA

<213> Scopulariopsis brevicaulis IF04843

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)...(1839)

<400> 4

caacctacgt ctctgtcaat cgacaattcc acgtatcctt ctatcgacta caactccgcc 60

cctccaaacc tctcgactct tgccaacaac agcctcttcg agacatggag gccgagggca 120

cacgtccttc cgccccagaa ccagatcggc gatccgtgta tgcactacac cgaccccgag 180

acaggaatct tccacgtcgg ctggctgtac aacggcaatg gcgcttccgg cgccacgacc 240

gaggatctcg tcacctatca ggatctcaac cccgacggag cgcagatgat ccttccgggt 300

ggtgtgaatg accccattgc tgtctttgac ggcgcggtta ttcccagtgg cattgatggg 360

aaacccacca tgatgtatac ctcggtgtca tacatgccca tctcctggag catcgcttac 420

accaggggaa gcgagaccca ctctctcgca gtgtcgtccg acggcggtaa gaacttcacc 480

aagctggtgc agggccccgt cattccttcg cctcccttcg gcgccaacgt gaccagctgg 540

cgtgacccct tcctgttcca aaacccccag ttcgactctc tcctcgaaag cgagaacggc 600

acgtggtaca ccgttatctc tggtggcatc cacggtgacg gcccctccgc gttcctctac 660

cgtcagcacg accccgactt ccagtactgg gagtaccttg gaccgtggtg gaacgaggaa 720

gggaactcga cctggggcag cggtgactgg gctggccggt ggggctacaa cttcgaggtc 780

atcaacattg tcggtcttga cgatgatggc tacaaccccg acggtgaaat ctttgccacg 840

gtaggtaccg aatggtcgtt tgaccccatc aaaccgcagg cctcggacaa cagggagatg 900

ctctgggccg cgggcaacat gactctcgag gacggcgata tcaagttcac gccaagcatg 960

gcgggctacc tcgactgggg tctatcggcg tatgccgccg ctggcaagga gctgcccgct 1020

tcttcaaagc cttcgcagaa gagcggtgcg ccggaccggt tcgtgtcgta cctgtggctc 1080

accggtgact acttcgaggg ccacgacttc cccaccccgc agcagaattg gaccggctcg 1140

ctttgcttc cgcgtgagct gagcgtcggg acgattccca acgttgtcga caacgagctt 1200

gctcgcgaga cgggctcttg gagggttggc accaacgaca ctggcgtgct tgagctggtc 1260

actctgaagc aggagattgc tcgcgagacg ctggctgaaa tgaccagcgg caactccttc 1320

accgaggcga gcaggaatgt cagctcgccc ggatctaccg ccttccagca gtccctggat 1380

tccaagttct tcgtcctgac cgcctcgctc tccttccctt cgtcggctcg cgactccgac 1440

ctcaaggctg gtttcgagat cctgtcgtcc gagtttgagt cgaccacggt ctactaccag 1500

ttttccaacg agtccatcat cattgaccgg agcaactcga gtgctgccgc cttgactacc 1560

gatggaatcg acacccgcaa cgagtttggc aagatgcgcc tgtttgatgt tgtcgagggt 1620

gaccaggagc gtatcgagac gctcgatctc actattgtgg ttgataactc gatcgttgag 1680

gttcatgcca acgggcgatt cgctctgagc acttgggttc gttcgtggta cgagtcgtcc 1740

aaggacatca agttcttcca cgatggcgac agcacggttc agttctcgaa catcaccgtc 1800

tacgagggac tgtttgacgc ctggccggag cgggccagg 1839

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

caatgaagct caccactacc

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

atcccggtca atttctctcc

<210> 7

<211> 1809

<212> DNA

<213> Penicillium roqueforti IAM7254

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1694)

<221> intron

<222> (1695)...(1744)

<221> CDS

<222> (1745)...(1859)

<400> 1

gttgatttcc ataccccgat tgactataac tcggctccgc caaacctttc taccctggca 60

aacgcatctc ttttcaagac atggagaccc agagcccatc ttctccctcc atctgggaac 120

ataggcgacc cgtgcgggca ctataccgat cccaagactg gtctcttcca cgtgggttgg 180

ctttacagtg ggatttcggg agcgacaacc gacgatctcg ttacctataa agacctcaat 240

cccgatggag ccccgtcaat tgttgcagga ggaaagaacg accctctttc tgtcttcgat 300

ggctcggtca ttccaagcgg tatagacggc atgccaactc ttctgtatac ctctgtatca 360

tacctcccaa tccactggtc catcccctac acccggggaa gcgagacaca atccttggcc 420

gtttcctatg acggtggtca caacttcacc aagctcaacc aagggcccgt gatccctacg 480

cctccgtttg ctctcaatgt caccgctttc cgtgacccct acgttttcca aagcccaatt 540

ctggacaaat ctgtcaatag tacccaagga acatggtatg tcgccatatc tggcggtgtc 600

cacggtgtcg gaccttgtca gttcctctac cgtcagaacg acgcagattt tcaatattgg 660

gaatatctcg ggcaatggtg gaaggagccc cttaatacca cttggggaaa gggtgactgg 720

gccgggggtt ggggcttcaa ctttgaggtt ggcaacgtct ttagtctgaa tgcagagggg 780

tatagtgaag acggcgagat attcataacc ctcggtgctg agggttcggg acttcccatc 840

gttcctcaag tctcctctat tcgcgatatg ctgtgggtga ccggcaatgt cacaaatgac 900

ggctctgtca ctttcaagcc aaccatggcg ggtgtgcttg actggggcgt gtcggcatat 960

gctgctgcag gcaagatctt gccggccagc tctcaggcat ccacaaagag cggtgccccc 1020

gatcggttca tttcctatgt ctggctcact ggagatctat tcgagcaagt gaaaggattc 1080

cctaccgctc aacaaaactg gaccggggcc ctcttactgc cgcgagagct gaatgtccgc 1140

actatctcta acgtggtgga taacgaactt tcgcgtgagt ccttgacatc gtggcgcgtg 1200

gcccgcgaag actctggtca gatcgacctt gaaacaatgg gaatctcaat ttccagggag 1260

acttacagcg ctctcacatc cggctcatct tttgtcgagt ctggtaaaac gttgtcgaat 1320

gctggagcag tgcccttcaa tacctcaccc tcaagcaagt tcttcgtgct gacagcaaat 1380

atatctttcc cgacctctgc ccgtgactct ggcatccagg ctggtttcca ggttttatcc 1440

tctagtcttg agtctacaac tatctactac caattctcca acgagtccat catcgtcgac 1500

cgcagcaaca cgagtgctgc ggcgagaaca actgctggga tcctcagtga taacgaggcg 1560

ggacgtctgc gcctcttcga cgtgttgcga aatggaaaag aacaggttga aactttggag 1620

ctcactatcg tggtggataa tagtgtactg gaagtatatg ccaatggacg ctttgctcta 1680

ggcacttggg ctcggtaagt ctctcttgtt tatggaagat tggtcaaaaa ctaaccgcat 1740

gaaggtcttg gtacgccaac tcgactaaaa ttaacttctt ccataacggc gtgggagaag 1800

cgacattcga agatgtgacg gtctttgaag gactgtatga tgcctggcca caaaggaag 1859

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

caactgctgg catcctcagt ga

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gcggatccat gaagctatca aatgcaatc

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gcggatcctt accgagccca agtgcc

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gcggatcctc acttcctttg tggccag

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

gttggcgtac caagaccgag cccaagtgcc

<210> 13

<211> 1894

<212> DNA

<213> Scopulariopsis brevicaulis IF04843

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1721)

<221> intron

<222> (1722)...(1776)

<221> CDS

<222> (1777)...(1894)

<400> 13

caacctacgt ctctgtcaat cgacaattcc acgtatcctt ctatcgacta caactccgcc 60

cctccaaacc tctcgactct tgccaacaac agcctcttcg agacatggag gccgagggca 120

cacgtccttc cgccccagaa ccagatcggc gatccgtgta tgcactacac cgaccccgag 180

acaggaatct tccacgtcgg ctggctgtac aacggcaatg gcgcttccgg cgccacgacc 240

gaggatctcg tcacctatca ggatctcaac cccgacggag cgcagatgat ccttccgggt 300

ggtgtgaatg accccattgc tgtctttgac ggcgcggtta ttcccagtgg cattgatggg 360

aaacccacca tgatgtatac ctcggtgtca tacatgccca tctcctggag catcgcttac 420

accaggggaa gcgagaccca ctctctcgca gtgtcgtccg acggcggtaa gaacttcacc 480

aagctggtgc agggccccgt cattccttcg cctcccttcg gcgccaacgt gaccagctgg 540

cgtgacccct tcctgttcca aaaccccccag ttcgactctc tcctcgaaag cgagaacggc 600

acgtggtaca ccgttatctc tggtggcatc cacggtgacg gcccctccgc gttcctctac 660

cgtcagcacg accccgactt ccagtactgg gagtaccttg gaccgtggtg gaacgaggaa 720

gggaactcga cctggggcag cggtgactgg gctggccggt ggggctacaa cttcgaggtc 780

atcaacattg tcggtcttga cgatgatggc tacaaccccg acggtgaaat ctttgccacg 840

gtaggtaccg aatggtcgtt tgaccccatc aaaccgcagg cctcggacaa cagggagatg 900

ctctgggccg cgggcaacat gactctcgag gacggcgata tcaagttcac gccaagcatg 960

gcgggctacc tcgactgggg tctatcggcg tatgccgccg ctggcaagga gctgcccgct 1020

tcttcaaagc cttcgcagaa gagcggtgcg ccggaccggt tcgtgtcgta cctgtggctc 1080

accggtgact acttcgaggg ccacgacttc cccaccccgc agcagaattg gaccggctcg 1140

cttttgcttc cgcgtgagct gagcgtcggg acgattccca acgttgtcga caacgagctt 1200

gctcgcgaga cgggctcttg gagggttggc accaacgaca ctggcgtgct tgagctggtc 1260

actctgaagc aggagattgc tcgcgagacg ctggctgaaa tgaccagcgg caactccttc 1320

accgaggcga gcaggaatgt cagctcgccc ggatctaccg ccttccagca gtccctggat 1380

tccaagttct tcgtcctgac cgcctcgctc tccttccctt cgtcggctcg cgactccgac 1440

ctcaaggctg gtttcgagat cctgtcgtcc gagtttgagt cgaccacggt ctactaccag 1500

ttttccaacg agtccatcat cattgaccgg agcaactcga gtgctgccgc cttgactacc 1560

gatggaatcg acacccgcaa cgagtttggc aagatgcgcc tgtttgatgt tgtcgagggt 1620

gaccaggagc gtatcgagac gctcgatctc actattgtgg ttgataactc gatcgttgag 1680

gttcatgcca acgggcgatt cgctctgagc acttgggttc ggtaagtgga acgccgacca 1740

cgcttcttaa tttctccaat actaacatta tcacagttcg tggtacgagt cgtccaagga 1800

catcaagttc ttccacgatg gcgacagcac ggttcagttc tcgaacatca ccgtctacga 1860

gggactgttt gacgcctggc cggagcgggc cagg 1894

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

gcggatccat gaaactctca actgtt

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

gcggatcctt accgaaccca agtgct

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

gcggatcctt acctggcccg ctccg

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

cgactcgtac cacgaacgaa cccaagtgct cag

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/04087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[6] C12N9/10, C12N15/54, C12N1/19, C12P19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[6] C12N9/10, C12N15/54, C12N1/19, C12P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
DDBJ/EMBL/GenBank

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L.M. Boddy et al., "Purification and characterization of an Aspergillus nigar invertase and its DNA sequence", Curr. Genet., Vol. 24, P.60-66 (1993)	1-10
P, X	WO, 97/34004, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 18 September, 1997 (18. 09. 97) (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 November, 1998 (27. 11. 98)	8 December, 1998 (08. 12. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９８／０４０８７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl[6]　C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/19, C12P 19/00

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl[6]　C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/19, C12P 19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
DDBJ/EMBL/GenBank

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	L.M.Boddy et al.,"Purification and characterization of an Aspergillus nigar invertase and its DNA sequence", Curr.Genet.,Vol.24,P.60-66 (1993)	1－10
P,X	WO,97/34004,A (明治製菓株式会社) 18.9月.1997 (18.09.97) ファミリーなし	1－10

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
27.11.98	08.12.98

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4B	9162
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	新見　浩一 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９２年７月）