

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3681385号

(P3681385)

(45) 発行日 平成17年8月10日(2005.8.10)

(24) 登録日 平成17年5月27日(2005.5.27)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 9/40

C 1 2 N 9/40

C 1 2 N 9/50

C 1 2 N 9/50

請求項の数 22 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-502952
 (86) (22) 出願日 平成5年7月7日(1993.7.7)
 (65) 公表番号 特表平7-508652
 (43) 公表日 平成7年9月28日(1995.9.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1993/001763
 (87) 国際公開番号 W01994/001567
 (87) 国際公開日 平成6年1月20日(1994.1.20)
 審査請求日 平成12年4月13日(2000.4.13)
 (31) 優先権主張番号 92202080.5
 (32) 優先日 平成4年7月8日(1992.7.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 92203899.7
 (32) 優先日 平成4年12月14日(1992.12.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 590003065
 ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノート
 シヤープ
 オランダ国、3013・エイエル・ロッテ
 ルダム、ヴェーナ 455
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (72) 発明者 クリス、フランシスキス・マリア
 オランダ国、エヌ・エル-1025・カー
 ・エル・アムステルダム、ベネデンラング
 ス・102
 (72) 発明者 シュルルダー、マーテン・ブルー
 オランダ国、エヌ・エル-1111・イク
 ス・ペー・デイメン、ロード・クロイス
 ラーン・1220

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 融合タンパク質の製造によって酵素を微生物細胞の細胞壁に固定化する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵母の細胞壁に連結された酵素または酵素の機能性フラグメントを産生するために組換えDNA技術を用いることを含む酵素を固定化する方法であって、その際酵素または酵素の機能性フラグメントをアンカータンパク質の固定部に連結することによって細胞壁の外側に位置させ、前記固定部は前記アンカータンパク質のC末端部から誘導し得ることを特徴とする、前記方法。

【請求項2】

前記酵母がCandida属、Debaryomyces属、Hansenula属、Kluyveromyces属、Pichia属及びSaccharomyces属からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

触媒活性を具えたタンパク質をコードする構造遺伝子と、酵母の細胞壁に固定し得るアンカータンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一部分を含み、前記一部分は前記アンカータンパク質の少なくとも固定部をコードし、この固定部は前記アンカータンパク質のC末端部から誘導し得ることを特徴とする、組換えポリヌクレオチド。

【請求項4】

ポリヌクレオチドの発現産物を分泌するシグナルペプチドをコードする配列を更に含むことを特徴とする、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

シグナルペプチドがグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカータンパク質、 α 因子、 α -アグルチニン、インベルターゼまたはイヌリナーゼ、Bacillus 属の α -アミラーゼ、及び乳酸菌のプロテイナーゼからなる群から選択されたタンパク質から得られることを特徴とする、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

細胞壁に固定し得るタンパク質が α -アグルチニン、AGA1、FLO1、酵母の主要細胞壁タンパク質からなる群から選択されることを特徴とする、請求項3から5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

プロモーターに作動的に連結されていることを特徴とする、請求項3から6のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項8】

誘導可能なプロモーターに作動的に連結されていることを特徴とする請求項7に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】

触媒活性を具えたタンパク質が加水分解酵素であることを特徴とする請求項3から8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】

加水分解酵素がリパーゼであることを特徴とする、請求項9に記載のポリヌクレオチド。

【請求項11】

触媒活性を具えたタンパク質がオキシドレダクターゼであることを特徴とする、請求項3から8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項12】

オキシドレダクターゼがオキシダーゼであることを特徴とする、請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項13】

請求項3から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む、組換えベクター。

【請求項14】

触媒活性を具えたタンパク質がマルチマーとして存在する場合に前記触媒活性を呈し、その際触媒活性を具えた同一のタンパク質をコードする構造遺伝子を含む第2ポリヌクレオチドもこの第2ポリヌクレオチドの発現産物を分泌するシグナルペプチドをコードする配列と組み合わせて含み、前記第2ポリヌクレオチドは調節可能なプロモーターに作動的に連結されていることを特徴とする、請求項13に記載の組換えベクター。 30

【請求項15】

調節可能なプロモーターが誘導または抑制可能なプロモーターであることを特徴とする、請求項14に記載の組換えベクター。

【請求項16】

請求項3から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドによってコードされたキメラタンパク質。

【請求項17】

請求項3から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13もしくは15に記載のベクターを保持する酵母。 40

【請求項18】

請求項3から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項13に記載のベクターを保持する酵母であって、触媒活性を具えたタンパク質がマルチマーとして存在する場合に前記触媒活性を呈し、その際触媒活性を具えた同一のタンパク質をコードする構造遺伝子を含む第2ポリヌクレオチドもこの第2ポリヌクレオチドの発現産物を分泌するシグナルペプチドをコードする配列と組み合わせて保持し、前記第2ポリヌクレオチドは調節可能なプロモーターに作動的に連結されており、かつ他のベクター中、または酵母の染色体中に存在することを特徴とする、前記酵母。 50

【請求項 19】

調節可能なプロモーターが誘導または抑制可能なプロモーターである、請求項 18 に記載の酵母。

【請求項 20】

染色体中に組み込まれている少なくとも一つの前記ポリヌクレオチドを有する、請求項 17 または 19 に記載の酵母。

【請求項 21】

請求項 16 に記載のタンパク質が細胞壁に固定化された酵母。

【請求項 22】

固定化した触媒活性タンパク質を用いて酵素処理を行なう方法であって、前記触媒活性タンパク質の基質を請求項 17 から 21 のいずれか 1 項に記載の酵母と接触させることを特徴とする、前記方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、遺伝子工学によって製造した固定化酵素を用いる変換処理に係わる。

発明の背景

洗剤、パーソナルケア用品及び食品の製造分野では、これらの製品の成分として天然物質を指向する傾向、及び環境的に許容可能な工程を用いる傾向が強い。酵素変換処理は全く天然で行ない得るので、上記のような消費者の要求を満たすうえで非常に重要である。そのうえ、酵素処理は非常に特異的であり、従って最少量の副産物しか生成させない。このような処理は、温和な温度及び大気圧の下で水中で実施し得る。しかし、遊離酵素に基づく酵素処理は酵素の損失に起因してきわめて高価となるか、または酵素を捕捉するウルトラメンブランシステムのような高価な設備を必要とする。

あるいは他の場合には、酵素を物理的または化学的に固定化することができる。化学的固定化法にはしばしば、非天然の化学薬剤を用い、かつ環境の観点から好ましくない方法で結合を実現するという欠点が存在する。そのうえ、酵素の化学的改変はほぼ常にさほど特異的でなく、このことは結合が酵素の活性に悪影響を及ぼす恐れが有ることを意味する。物理的固定化は消費者の要求に適い得るが、やはり酵素の活性に悪影響を及ぼしかねない。しかも、物理的に固定化した酵素は遊離酵素と平衡し、このことは連続反応容器内では熱力学の法則に従って酵素の相当の損失が不可避であることを意味する。

微生物細胞への酵素の固定化に関する刊行物が幾つか存在する（参考文献 1 参照）。本発明は、酵素を微生物細胞の細胞壁に非常に正確に固定化する方法を提供する。加えて、本発明の固定化方法は何等の化学的または物理的結合ステップも必要とせず、かつ非常に効率的である。或る種の細胞外タンパク質は、該タンパク質が宿主細胞の細胞壁に結合している場合にのみ発揮し得る特別の機能を有することが知られている。この種のタンパク質はしばしば、細胞壁に固定（anchor）された長い C 末端部を有する。この C 末端部は非常に特殊なアミノ酸配列を有する。一典型例はプロリンに富んだ C 末端配列を介して固定されている（参考文献 2 参照）。タンパク質を細胞壁に固定させる別の機構に、タンパク質がグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーを有するというもの（参考文献 3 参照）、及びタンパク質の C 末端部が相当数の潜在的セリン及びトレオニングリコシル化部位を有するというものが有る。前記部位の O-グリコシル化は当該タンパク質の C 末端部に棒状のコンホメーションを付与する。このようなマンノタンパク質には、下等真核生物の細胞壁から SDS で抽出できないので前記細胞壁中のグルカンに連結すると考えられるがグルカナーゼ処理によって解離し得るという特徴も有る。

発明の概要

本発明は、酵素を固定化する方法であって、組み換え体 DNA 技術を用いて酵素または酵素の機能部を宿主細胞、好ましくは微生物細胞の細胞壁に連結することを含み、その際酵素または酵素の機能フラグメントを細胞壁の外側に位置させる方法を提供する。好ましくは、酵素または酵素の機能部を、細胞壁への固定を保証するタンパク質の C 末端部への連結によって固定化する。

本発明はその一実施態様において、触媒活性を具えたタンパク質をコードする構造遺伝子

10

20

30

40

50

と、真核または原核細胞の細胞壁に固定し得るタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一部分とを含み、前記一部分は前記固定（またはアンカー）タンパク質の少なくともC末端部をコードする組み換え体ポリヌクレオチドを提供する。好ましくはこのポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドの発現産物の分泌を保証するシグナルペプチドをコードする配列も含む。上記のようなシグナルペプチドは、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカータンパク質、 α 因子、 α -アグルチニン、インベルターゼもしくはイヌリナーゼ、Bacillus属の α -アミラーゼ、または乳酸菌のプロテイナーゼに由来し得る。細胞壁に固定し得るタンパク質をコードするDNA配列は、 α -アグルチニン、AGA1、FLO1、もしくは下等真核生物の主要細胞壁タンパク質（Major Cell Wall Protein）、または乳酸菌のプロテイナーゼをコードし得る。本発明の組み換え体ポリヌクレオチドはプロモーター、好ましくは誘導可能なプロモーターに作動的に連結されている。触媒活性を具えたタンパク質をコードするDNA配列は加水分解酵素、例えばリパーゼかオキシドレダクターゼ、例えばオキシダーゼをコードし得る。

10

本発明はその別の実施態様において、上述のポリヌクレオチドを含む組み換え体ベクターも提供する。このベクターは、触媒活性を具えたタンパク質でマルチマー形態（multimeric form）で存在する時にその触媒活性を呈示するタンパク質をコードするDNA配列を含む場合、触媒活性を具えた同じタンパク質をコードする構造遺伝子を含む第二のポリヌクレオチドもこの第二のポリヌクレオチドの発現産物の分泌を保証するシグナルペプチドをコードする配列と組み合わせて含み得、その際第二のポリヌクレオチドは調節可能なプロモーター、好ましくは誘導または抑制可能なプロモーターに作動的に連結されている。

20

本発明は更に別の実施態様において、先に述べたポリヌクレオチドによってコードされたキメラタンパク質も提供する。

先に述べたポリヌクレオチドまたは先に述べたベクターを保持する宿主細胞、好ましくは微生物も本発明の一態様である。触媒活性を具えたタンパク質がマルチマー形態で存在する時にその触媒活性を呈示する場合、上記宿主細胞または微生物は触媒活性を具えた同じタンパク質をコードする構造遺伝子を含む第二のポリヌクレオチドもこの第二のポリヌクレオチドの発現産物の分泌を保証するシグナルペプチドをコードする配列と組み合わせて保持し得、その際第二のポリヌクレオチドは調節可能なプロモーター、好ましくは誘導または抑制可能なプロモーターに作動的に連結されており、かつ別のベクター中にか、または微生物の染色体中に存在する。好ましくは、上記宿主細胞または微生物は上述のポリヌクレオチドのうちの少なくとも一つをその染色体中に組み込まれている。そのような宿主細胞または微生物を培養することによって本発明は、先に述べたタンパク質がその細胞壁に固定化された宿主細胞、好ましくは微生物を提供する。宿主細胞または微生物は下等真核生物、特に酵母であり得る。

30

本発明は、固定化した触媒活性タンパク質を用いて酵素処理を行なう方法であって、前記触媒活性タンパク質の基質を本発明による宿主細胞または微生物と接触させる方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

40

第1図はS. cerevisiaeの完全なAGA1遺伝子を含む6057bpのHindIII断片のDNA配列示す（配列番号1及び2参照）。本明細書に説明した構築に用いる非反復NheI部位及びHindIII部位の位置をヘッダにおいて特定する。

第2図はpUR2969の構築の概略的説明図である。用いたエンドヌクレアーゼの制限部位を示す。

使用略号：

AG- α 1pha-1：S. cerevisiae由来の α -アグルチニンを発現する遺伝子。

amp： β -ラクタマーゼ耐性遺伝子。

PGKp：ホスホグリセレートキナーゼプロモーター。

50

P G K t : 同遺伝子のターミネーター。

第3図はバッチ培養の間に p S Y 1 3 で形質転換した S. cerevisiae M T 3 0 2 / 1 C 細胞及び培養液の α -ガラクトシダーゼ活性を示す。

A : 単位時間当たりの U / l α -ガラクトシダーゼ。O D₅₃₀ も示す。

B : U / O D₅₃₀ で表わした遊離及び結合酵素の α -ガラクトシダーゼ活性。

第4図はバッチ培養の間に p U R 2 9 6 9 で形質転換した S. cerevisiae M T 3 0 2 / 1 C 細胞及び培養液の α -ガラクトシダーゼ活性を示す。

A : 単位時間当たりの U / l α -ガラクトシダーゼ。O D₅₃₀ も示す。

B : U / O D₅₃₀ で表わした遊離及び結合酵素の α -ガラクトシダーゼ活性。

第5図は指数増殖期の細胞 (O D₅₃₀ = 2) の細胞外画分を抗 α -ガラクトシダーゼ血清でウェスタン分析した結果を示す。分析した画分はいずれも 4 m g 細胞壁 (新鮮重量) に相当する。

A : α -ガラクトシダーゼを発現させる M T 3 0 2 / 1 C。

レーン 1 ; 増殖培地

レーン 2 ; 単離した細胞壁の S D S 抽出物

レーン 3 ; S D S 抽出細胞壁のグルカナーゼ抽出物

B : α -G a l - A G α 1 融合タンパク質を発現させる M T 3 0 2 / 1 C。

レーン 1 ; 増殖培地

レーン 2 ; 単離した細胞壁の S D S 抽出物

レーン 3 ; S D S 抽出細胞壁のグルカナーゼ抽出物

レーン 4 ; E n d o - H 処理したグルカナーゼ抽出物

第6図は α -G a l - α -アグルチニン融合タンパク質を発現させる指数増殖期の M T 3 0 2 / 1 C 細胞 (O D₅₃₀ = 2) の免疫蛍光標識 (抗 α -ガラクトシダーゼ) を示す完全細胞の位相差顕微鏡写真である。

A : 概観。

B : 細部。

第7図は p U R 2 9 7 0 A、p U R 2 9 7 1 A、p U R 2 9 7 2 A 及び p U R 2 9 7 3 の構築の概略的説明図である。用いたエンドヌクレアーゼの制限部位を図示する。P C R オリゴヌクレオチド配列については本文中で言及する。

使用略号 :

A G a l c d s : α -アグルチニンのコーディング配列。a - A G G = A G a l : S. cerevisiae 由来の α -アグルチニンを発現する遺伝子。

a m p : β -ラクタマーゼ耐性遺伝子。

P g a l 7 = G A L 7 : G A L 7 プロモーター。

l i p o l a s e : H u m i c o l a 属のリパーゼ遺伝子。

i n v S S : S U C 2 シグナル配列。

a - M F : プレプロ- α -接合因子配列。

a - g a l : α -ガラクトシダーゼ遺伝子。

L E U 2 d : L E U 2 遺伝子の截頭 (t r u n c a t e d) プロモーター。

L E U 2 : 完全なプロモーター配列を伴った L E U 2 遺伝子。

第8図は G e o t r i c h u m c a n d i d u m 株 3 3 5 4 2 6 のリパーゼ B の完全なコーディング配列を含む断片の D N A 配列を示す (配列番号 1 1 及び 1 2 参照)。成熟リパーゼ B の配列は、図示した配列の 9 7 位のヌクレオチドから始まる。コーディング配列は 4 0 位のヌクレオチド (A T G) から始まる。

第9図は p U R 2 9 7 5 及び p U R 2 9 7 6 の構築の概略的説明図である。用いたエンドヌクレアーゼの制限部位を示す。

使用略号 :

a - A G G : S. cerevisiae 由来の α -アグルチニンを発現する遺伝子。

a m p : β -ラクタマーゼ耐性遺伝子。

P g a l 7 = G A L 7 : G A L 7 プロモーター。

i n v S S : S U C 2 シグナル配列。

a-MF : プレプロ- α -接合因子配列。

L E U 2 d : L E U 2 遺伝子の截頭プロモーター。

l i p o l a s e : H u m i c o l a 属のリパーゼ遺伝子。

l i p a s e B : G e o t r i c h u m c a n d i d u m のリパーゼ B 遺伝子。

第 10 図は p U R 2 9 8 1 及び p U R 2 9 8 2 の構築の概略的説明図である。用いたエンドヌクレアーゼの制限部位を示す。

使用略号：

a-A G G = A G - a l p h a 1 : S . c e r e v i s i a e 由来の α -アグルチニンを発現する遺伝子。

m u c o r l i p a s e : R h i z o m u c o r m i e h e i のリパーゼ遺伝子。

2 u : 2 μ m 配列。

P g a 1 7 = G A L 7 : G A L 7 プロモーター。

i n v S S : S U C 2 シグナル配列。

a-MF : プレプロ- α -接合因子配列。

l i p o l a s e : H u m i c o l a 属のリパーゼ遺伝子。

a m p : β -ラクタマーゼ耐性遺伝子。

L E U 2 d : L E U 2 遺伝子の截頭プロモーター。

L E U 2 : 完全なプロモーター配列を伴った L E U 2 遺伝子。

第 11 図は F L O 1 遺伝子の 894 アミノ酸コーディング部の DNA 配列 (2685 塩基) を示す (配列番号 21 及び 22 参照)。図示した配列は、最初のアミノ酸のコドンで始まり、終結コドンで終わる。

第 12 図はプラスミド p U R 2 9 9 0 を示す概略的説明図である。図中に記したクローニング手順に関連するエンドヌクレアーゼの幾つかの制限部位を示す。

第 13 図はプラスミド p U R 7 0 3 4 を示す概略的説明図である。

第 14 図はプラスミド p U R 2 9 7 2 B を示す概略的説明図である。

第 15 図は l i p o l a s e / α -アグルチニン融合タンパク質を発現させる指数増殖期の S U 10 細胞 ($O D_{530} = 0.5$) の免疫蛍光標識 (抗 l i p o l a s e) を示す。

A : 位相差顕微鏡写真。

B : 整合蛍光顕微鏡写真。

発明の詳細な説明

本発明は、酵素を固定化する方法であって、組み換え体 DNA 技術を用いて酵素または酵素の機能部を宿主細胞、好ましくは微生物細胞の細胞壁に固定化することを含む方法を提供する。特に、酵素または酵素の機能部を、細胞壁への固定を保証するタンパク質の C 末端部に、酵素が細胞表面上または細胞表面の僅かに上方に位置するように結合する。このようにして酵素を細胞の表面に固定化する。上記結合は遺伝子レベルで行ない、この遺伝子レベルの結合は、酵素をコードする構造遺伝子をアンカータンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一部に、発現産物において酵素の C 末端がアンカータンパク質の C 末端部に結合するように結合させるという特徴を有する。好ましくはキメラ酵素の上流に、キメラタンパク質の効率的な分泌を保証するシグナル配列を配置する。

即ち本発明は、触媒活性を具えたタンパク質をコードする構造遺伝子と、真核または原核細胞の細胞壁に固定し得るタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも一部分とを含む組み換え体ポリヌクレオチドを提供し、その際前記一部分は前記固定 (即ちアンカー) タンパク質の少なくとも C 末端部をコードする。アンカータンパク質の C 末端部の長さは様々であり得る。この構造タンパク質の全体を用いることは可能であるが、一部しか用いない方が好ましく、その場合細胞を取り巻く培地中での酵素タンパク質のより効率的な暴露が実現する。アンカータンパク質の固定部は、好ましくはその全体が存在するべきである。一例として、アンカータンパク質の C 末端部のおよそ半分を用い得る。

好ましくは、上記ポリヌクレオチドは更に、該ポリヌクレオチドの発現産物の分泌を保証するシグナルペプチドをコードする配列も含む。シグナルペプチドは G P I アンカータン

10

20

30

40

50

パク質、 α 因子、 α -アグルチニン、インベルターゼもしくはイヌリナーゼ、b a c i l l u s 属の α -アミラーゼ、または乳酸菌のプロテイナーゼに由来し得る。

細胞壁に固定し得るタンパク質は好ましくは、 α -アグルチニン、A G A 1、F L O 1（凝集タンパク質）、下等真核生物の主要細胞壁タンパク質、及び乳酸菌のプロテイナーゼの中から選択する。本発明のポリヌクレオチドは好ましくは、プロモーター、好ましくは調節可能なプロモーターで特に誘導可能なプロモーターに作動的に連結されている。

本発明は、上述のポリヌクレオチドを含み組み換え体ベクター、及び前記ポリヌクレオチドまたは前記ベクターを保有する宿主細胞も提供する。オキシドレダクターゼに関してあり得るような、触媒活性を具えたタンパク質がマルチマー形態で存在する時にその触媒活性を呈示するという特別の場合には、モノマーのダイマー化またはマルチマー化が活性の必要条件となり得る。その場合、ベクター及び／または宿主細胞は触媒活性を具えた同じタンパク質をコードする構造遺伝子を含む第二のポリヌクレオチドも、この第二のポリヌクレオチドの発現産物の分泌を保証するシグナルペプチドをコードする配列と組み合わせ有し得、その際第二のポリヌクレオチドは調節可能なプロモーター、好ましくは誘導または抑制可能なプロモーターに作動的に連結されている。第一のポリヌクレオチドの発現及び分泌の後に第二のポリヌクレオチドの発現及び分泌が起こることによって、細胞壁の外側に活性なマルチマーが生成する。宿主細胞または微生物は先に述べた本発明のポリヌクレオチドを、または組み合わせの場合は上記ポリヌクレオチドのうちの少なくとも一つを、好ましくはその染色体中に組み込まれた状態で保持する。

本発明は特に、非常に安定な細胞壁を有し、かつ細胞壁に固定されていることが知られているタンパク質、例えば α -アグルチニンや遺伝子 F L O 1 の産物を有する酵母のような下等真核生物に係わる。適当な酵母は、C a n d i d a 属、D e b a r y o m y c e s 属、H a n s e n u l a 属、K l u y v e r o m y c e s 属、P i c h i a 属及び S a c c h a r o m y c e s 属に属する。真菌、特に A s p e r g i l l u s 属、P e n i c i l l i u m 属及び R h i z o p u s 属も用い得る。用途によっては原核生物も適用可能である。

酵母の場合、本発明は特に、

- a. 例えば α 因子遺伝子、インベルターゼ遺伝子、 α -アグルチニン遺伝子またはイヌリナーゼ遺伝子に由来するシグナル配列と、
- b. α -ガラクトシダーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ペクチナーゼ、ペクチルエステラーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、エステラーゼ及びリパーゼなどの加水分解酵素、またはオキシダーゼなどの非加水分解酵素をコードする構造遺伝子と、
- c. α -アグルチニン（参考文献 4 参照）、A G A 1（参考文献 5 参照）及び F L O 1（本願出願前未公表の参考文献 6 参照）などの典型的な細胞壁結合タンパク質の C 末端とから成るキメラ酵素をコードする遺伝子に係わる。

このような遺伝子の発現は構成プロモーターの制御下に置くことができるが、プロモーターは、S a c c h a r o m y c e s 属では G A L 7 プロモーター、K l u y v e r o m y c e s 属ではイヌリナーゼプロモーター、H a n s e n u l a 属ではメタノールオキシダーゼプロモーターといった調節可能な、即ち抑制または誘導可能なプロモーターの方がより好ましい。

構築物は好ましくは、新しい遺伝情報が宿主細胞の染色体中に安定に組み込まれるように形成される。

本発明は、上述のキメラタンパク質が細胞壁に固定化された宿主細胞、特に微生物も提供する。本発明はまた、そのような微生物の、酵素の基質を当該微生物と接触させることによる酵素処理の実施への使用も提供する。前記処理は、例えば充填カラム内で微生物を固体粒子に支持させて実施するか、または反応容器内で攪拌下に実施し得る。反応は水性であっても非水性であってもよい。必要であれば、酵素の機能に必要な添加物、例えば補因子を反応媒質中に導入し得る。

自然に固定化された酵素系を処理において繰り返し用いると、系の性能が低下する恐れが有る。これは、酵素が物理的に変性するか、または化学的に有毒化したり、脱着したりす

10

20

30

40

50

ることによる。本発明は特に、使用した系を反応媒質から単なる遠心または膜濾過技術によって回収できること、及びそのようにして集めた細胞を回復媒質に移し得、この媒質中で細胞は急速に再生し、それと共にキメラタンパク質が生成し、このようにして細胞の表面が完全に活性化固定化酵素によって覆われることが保証されることを特徴とする。上記再生法は単純かつ安価であり、従って酵素処理の経済性を改善し、固定化酵素系に基づく処理の用途をはるかに拡張し得る。

しかし、本発明は決して固定化酵素の再利用性に限定されない。

本発明を、本発明の範囲を限定しない以下の実施例によって詳述する。

実施例 1

S. cerevisiaeの表面に固定した α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニン 10
 α -アグルチニンをコードする遺伝子についてはLipke等が述べている（参考文献4参照）。AG α 1遺伝子の全体を含む、pTZ18R中の6057bpのHindIII挿入体の配列を第1図に示す。コーディング配列は650アミノ酸を越えて伸張し、3653位のヌクレオチドからATGをもって始まる推定シグナル配列を含む。非反復NheI部位がこのDNAを、アミノ酸330をコードする部分内で上記コーディング配列の988位において切断し、それによって α -アグルチニンをほぼ同寸法のN末端部とC末端部とに分割する。

pUR2968（第2図参照）をNheI/HindIIIで消化することによって、推定される細胞壁アンカーの配列情報を担った1.4kb断片を放出させた。 α -ガラクトシダーゼへの融合のために、SUC2インペルターゼシグナル配列に後続する α -ガラクトシダーゼ配列を含む、YEp lac181に基づくエピソードベクターであるプラスミドpSY16を用い、これを構成PGKプロモーターとPGKターミネーターとの間に配置した。 α -ガラクトシダーゼ遺伝子の読み取り枠の最後の9塩基対中に存在するStyI部位をAG α 1遺伝子断片のNheI部位に連結した。枠内融合を確実にするため、StyI/HindIIIで消化したpSY13への連結前にStyI部位を充填し、かつNheI部位の5'オーバーハングを除去した（第2図参照）。 20

新しいプラスミドの適正構築を確認するため、大腸菌JM109（recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi ▲（lac-proAB） F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ▲M15]）（参考文献7参照）をシャトルベクターで、Chung等が述べている形質転換プロトコル（参考文献8参照）により形質転換した。陽性クローンのうちの、記号pUR2969を付した一つを更に特性付け、DNAをQiagenプロトコルに従って単離及び精製し、その後DNA配列決定によって特性付けた。DNA配列決定は主としてSanger等（参考文献9参照）及びHsiao（参考文献10参照）が述べているようにして行ない、その際ここではT7 DNAポリメラーゼ（Amersham International plc）及び[³⁵S] dATPaS（Amersham International plc：370 MBq/ml；22 TBq/mmol）を用いるプロトコルに従いUnited States Biochemical CompanyのSequenaseバージョン2.0キットを用いた。 30

次に、このプラスミドでS. cerevisiae株MT302/1Cを、Klebe 40
 等のプロトコル（参考文献11参照）に従って形質転換した。

酵母形質転換細胞を、ロイシンを存在させない選択プレート上に40 μ l（DMF 20mg/ml）載せて選択した。X- α -Gal（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- α -D-グルコース；Boehringer Mannheim）を塗り広げ、 α -ガラクトシダーゼ活性について直接試験した（参考文献12参照）。キメラタンパク質の発現、分泌、局在及び活性を証明するべく、次の分析を行なった。

1. 発現及び分泌

S. cerevisiae株MT302/1Cを、Cyamopsis tetragonolobaの α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むプラスミドpSY13か、または α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニン融合構築物を含むプラスミドpUR2969で形 50

質転換した。バッチ培養の間 α -ガラクトシダーゼ活性を、洗浄した細胞と増殖培地とにおいて測定した。結果を第3図及び第4図に示す。プラスミドpSY13を保持する酵母細胞から発現された α -ガラクトシダーゼは大部分が専ら増殖培地中に存在した(第3図のA)が、 α -ガラクトシダーゼ- α -アグルチニン融合タンパク質の方は大部分が専ら細胞に結合していた(第4図のA)。そのうえ、固定化された、細胞壁に結合した α -ガラクトシダーゼ- α -アグルチニン融合酵素は全インキュベーション時間にわたって完全な活性を維持したが、分泌及び放出された酵素は65時間のインキュベーション後に約90%の活性を失った。このことは、上述の酵素を酵母の細胞壁に固定化すれば該酵素を、おそらくはプロテイナーゼによる不活性化から保護することになり、それによって安定性が著しく向上することを示している。更に、様々な遺伝子産物の局在に関してウェスタン分析により考察した。即ち、細胞を遠心によって集収し、0℃においてpH7.8の10mMトリス・HCl、及び1mM PMSFで洗浄し、後の諸ステップは前記と同じ温度で実施した。細胞1g(湿潤重量)当たり3mlの単離緩衝液と10gのガラスビーズとを添加した。混合物をGriffin振盪機において、該振盪機の最高速度の50%の速度で30分間振盪した。上清を単離し、ガラスビーズを1M NaCl及び1mM PMSFで洗液が澄むまで洗浄した。上清及び洗液をプールした。細胞壁を遠心によって回収し、その後1mM PMSFで洗浄した。

2% SDS、100mM EDTA及び40mM β -メルカプトエタノールを含有するpH7.8の50mMトリス・HCl中での5分間の煮沸によって細胞壁に、共有結合以外で結合したタンパク質、またはジスルフィド架橋を介して結合したタンパク質を放出させた。10mg(湿潤重量)の細胞壁を、1mM PMSFを含有するpH5.0の100mM酢酸ナトリウム20l中に取り上げた。これに0.5mUの β -1,3-グルカナーゼ(Laminarase; Sigma L5144)を添加し、続いて37℃で2時間インキュベーションした。その後、再び0.5mUの β -1,3-グルカナーゼを添加してから37℃で更に2時間インキュベートした。

タンパク質を、5分間煮沸してからEndo-H処理を施すことによって変性させた。2mgのタンパク質を、100mM β -メルカプトエタノール及び0.5mM PMSFを含有するpH5.5の50mMリン酸カリウム1ml中で40mUのEndo-H(Boehringer)と共に37℃で48時間インキュベートした。その後、20mUのEndo-Hを添加してから37℃で24時間インキュベートした。

タンパク質を、2.2-20%勾配ゲルにおいてLaemmli(参考文献13参照)に従いSDS-PAGEによって分離した。ゲルを、Towbin等が述べているImmobilonポリビニリデン-ジフルオライド膜(Millipore)上への電気泳動転移によってブロッティングした(参考文献14参照)。高度にグリコシル化したタンパク質の場合は、その後、50mM過ヨウ酸、pH4.5の100mM酢酸ナトリウム中で4℃で数時間、温和な過ヨウ酸塩処理を施した。後のインキュベーションは総て室温で行なった。プロットを、0.5%のゼラチン及び0.5%のTween-20を含有するPBS中で1時間ブロックし、続いて1:200に希釈した血清を含有するプローブ緩衝液(PBS; 0.2%ゼラチン、0.1%Tween-20)中で1時間インキュベーションを行なった。その後、プロットを洗浄緩衝液(PBS; 0.2%ゼラチン、0.5% Tween-20)中で数回洗浄し、続いて¹²⁵I標識タンパク質A(Amersham)を含有するプローブ緩衝液中で1時間インキュベーションを行なった。洗浄緩衝液中で数回洗浄後、プロットを風乾し、Saran(Dow)に包み、これを用いて-70℃において、増感スクリーンを具備したX-omat Sフィルム(Kodak)を露光した。Omni media 6cxスキャナ及びAdobe Photoshopプログラムを用いて、標識されたタンパク質を定量した。両形質転換細胞からタンパク質を単離した様々な操作の結果を第5図に示す。プラスミドpSY13を保持する形質転換細胞の場合、酵素は全般に培地中に局在し、その際少量の酵素のみが細胞壁に、結合したというよりは捕捉された(第5図のA)-この酵素はSDS抽出によって完全に除去可能-が、融合タンパク質の方は細胞壁に強固に結合し、少量の α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニン

10

20

30

40

50

のみが周囲の培養液中に放出され、またはSDS抽出可能であった。遊離 α -ガラクトシダーゼを発現させる細胞からの細胞壁のラミナリナーゼ抽出ではそれ以上の酵素解離は観察されなかったことに対して、融合酵素発現細胞に同じ処理を施すと融合酵素は全般に解離した。このことは、融合タンパク質は α -アグルチニン同様 *S. cerevisiae* の細胞壁グルカンと強固に結合するが、 α -ガラクトシダーゼ単独ではそのようなことは無いということを示している。後から行なったEndo-H処理は融合タンパク質の著しいグリコシル化を示したが、これは先に説明した、 α -アグルチニンのC末端部の拡大グリコシル化と完全に一致する結果であった。

2. 局在

抗 α -ガラクトシダーゼ血清での免疫蛍光標識を完全細胞に対して行ない、それによって細胞壁における α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニン融合タンパク質の存在及び分布を測定した。免疫蛍光標識は、Watzel等による固定(参考文献5参照)はせずに行なった。OD₅₃₀=2の細胞を単離し、TBS(140mM NaCl、5mM EDTA及び20 μ g/mlシクロヘキシミドを含有するpH7.8の10mMトリス・HCl)中で洗浄した。細胞をTBS+抗 α -ガラクトシダーゼ血清中で1時間インキュベートし、続いてTBS中で数回洗浄した。その後、FITCと結合させた抗ウサギIgG(Sigma)を添加して30分間、インキュベーションを行なった。TBS中で洗浄後、細胞を、1mg/mlのp-フェニレンジアミン及び0.1%のアジドを含有するpH9.0の10mMトリス・HCl中に取り、Zeiss 68000顕微鏡において写真撮影した。この分析の結果を示す第6図からは、 α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニンキメラが酵母細胞の表面に局在することが明らかである。非常に小さいものまで非常に均一に標識された様々な大きさのバッド(buds)が、融合酵素が全細胞周期を通じて連続的に細胞壁中に取り込まれ、かつ瞬時に強固に結合することを明示している。

3. 活性

α -ガラクトシダーゼ活性を定量的に評価するべく、pH4.5の0.1M酢酸ナトリウム及び10mM p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド(Sigma)を含有する200 μ l試料を37℃で正確に5分間インキュベートした。1mlの2%炭酸ナトリウムの添加によって反応を停止させた。先に述べたように遠心によって分離し、かつ単離及び洗浄した完全細胞及び細胞壁から α -ガラクトシダーゼ活性を、410nmにおいて18.4cm²/molであるp-ニトロフェノールの消衰係数を用いて算出した。1単位を、37℃における1分間当たりの基質1 μ molの加水分解と定義した。

表1. 酵母細胞における遊離及び固定化 α -ガラクトシダーゼ活性の分布

発現タンパク質	α -ガラクトシダーゼ活性(U/g F.W.細胞)		
	増殖培地	完全細胞	単離した細胞壁
α -ガラクトシダーゼ	14.7	0.37	0.01
α Gal/ α AGG融合タンパク質	0.54	13.3	10.9

形質転換したMT302/1C細胞は指数増殖期(OD₅₃₀=2)にあった。1単位を、37℃における1分間当たりのp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド1 μ molの加水分解と定義する。

結果を表1にまとめる。大部分の α -ガラクトシダーゼは培養液中に分布し、一方融合物はそのほとんどが細胞、主として細胞壁に結合していた。第3図～第6図及び表1に示した結果を勘案すれば、キメラ酵素の酵素 α -ガラクトシダーゼ活性は遊離酵素のものに劣らないと推測できる。そのうえ、定常期の間に増殖培地中の α -ガラクトシダーゼの活性は低下したが、細胞壁に結合した α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニン融合タンパク

質の活性は不変のままであり、このことは細胞に結合した融合タンパク質が失活またはタンパク質分解から保護されることを示している。

注記：本実施例の主旨は優先権主張年中にM. P. Schreuder等によって公表された（参考文献25参照）。

実施例2A

S. cerevisiaeの表面に固定化したHumicola属リパーゼ／ α -アグルチニン（固定化酵素系の誘導発現）

α -アグルチニンのC末端部を含む1.4 kbのNhe I／Hind III断片の構築及び単離は実施例1に述べた。プラスミドpUR7021は、市販ベクターpTZ18RのEcoRI／Hind III制限部位にクローニングされた長さ894 bpの、Humicola属のリパーゼをコードする合成DNA断片（参考文献16並びに配列番号7及び8参照）を含む（第7図参照）。成熟リパーゼをコードするDNA部分の5'末端と3'末端との両方を1ステップで適正に改変するのにPCR技術を適用し得る。従って、標準的PCRプロトコルにおいてDNAオリゴヌクレオチドlipol（配列番号3参照）及びlipol2（配列番号6参照）をプライマーとして用いて、両末端にEag I制限部位及びHind III制限部位をそれぞれ有する長さ826 bpのDNA断片を生じさせ得、この断片を、本明細書中で先に述べたインベルターゼシグナル配列に後続する α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含むプラスミドであるEag I／Hind III消化pUR2650の大きい方の部分と組み合わせることによりプラスミドpUR2970Aを生じさせ得る（第7図参照）。

Humicola属リパーゼと α -アグルチニンのC末端との枠内連結のためのPCRオリゴヌクレオチド

a. SUC2シグナル配列とリパーゼのN末端との間の転移（transition）のためのPCRオリゴヌクレオチド

>成熟リパーゼ

Eag I E V S Q D L F

プライマーlipol1: 5'-GGG GCG GCC GAG GTC TCG CAA GAT CTG GA-3'

|||||

リパーゼ: 3'-TAA GCA GCT CTC CAG AGC GTT CTG GAC CTG TTT-5'

（非コーディング鎖；配列番号4参照）

b. リパーゼのC末端と α -アグルチニンのC末端部との間の枠内転移のためのPCRオリゴヌクレオチド

F G L I G T C L

リパーゼ: 5'-TTC GGG TTA ATT GGG ACA TGT CTT TAG TGC GA-3'

（コーディング鎖） ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

プライマーlipol2: 3'-CCC AAT TAA CCC TGT ACA GAA CGA TCG GAA TTC GAACCCC-5'

Nhe I

Hind III

（リパーゼコーディング鎖の部分に関しては配列番号5参照）

PCR法によりリパーゼのコーディング配列の末端にNhe I部位を創出して、リパーゼをコードするDNAと α -アグルチニンのC末端部をコードするDNAとの枠内連結を可能にする。そうすれば、プラスミドpUR2970AをNhe I及びHind IIIで消化し得、プラスミドpUR2968に由来する、 α -アグルチニンのC末端部を含む1.4 kbのNhe I／Hind III断片をNhe I及びHind IIIで処理したプラスミドpUR2970Aの大きい方の部分と組み合わせてプラスミドpUR2971Aを得ることができる。このプラスミドから2.2 kbのEag I／Hind III断片を単離して、Eag I及びHind IIIで処理したpUR2741中に連結し得、その際プラスミドpUR2741はpUR2740の、既に不活性なTet耐性遺伝子の第二のEag I制限部位がNru I／Sal I消化によって欠失した誘導体である。（参考文献17参照）。Sal

1 I 部位は再連結前に充填された。連結によって、G A L 7プロモーター、インペルターゼシグナル配列、リパーゼ／ α -アグルチニンキメラ遺伝子、2 μ m配列、欠陥L e u 2プロモーター及びL e u 2遺伝子を含むp U R 2 9 7 2 Aが得られる。このプラスミドを用いてS. cerevisiaeを形質転換し得、得られる形質転換細胞は、リパーゼ／ α -アグルチニンキメラ遺伝子の発現を惹起する誘導物質としてガラクトースを抑制量のグルコースの不在下に含有するY P培地中で培養することができる。

リパーゼ／ α -アグルチニンキメラの発現、分泌、局在及び活性の分析は、実施例1に述べたのと同様の操作を用いて可能である。

同様にして、rDNA技術を介して得られるHumicola属リパーゼの変異体 (v a r i a n t s) を α -アグルチニンのC末端部に結合することも可能であり、前記変異体はエステル化反応またはエステル交換反応の間、より高い安定性を有し得る。

10

実施例 2 B

S. cerevisiaeの表面に固定化したHumicola属リパーゼ／ α -アグルチニン (固定化酵素系の誘導発現)

実施例 2 Aでは、特定構築物を製造するプロトコルを説明する。研究を行なう前、本実施例 2 Bでの構築手順が実施例 2 Aでの構築手順と僅かな点でしか異ならず、しかも得られるプラスミドは実施例 2 Aに述べたものと同等でないように実施例 1に述べた発現ベクターを用いることが好ましいと考えられた。しかし、プロモーターと、シグナル配列と、融合タンパク質をコードする構造遺伝子とを含む実質的な遺伝子構築物は実施例 2 Aと実施例 2 Bとで同じである。

20

1. 構築

α -アグルチニン細胞壁タンパク質のC末端部をコードする1.4 kbのN h e I／H i n d III断片の構築及び単離は実施例1に述べた。市販のベクターp T Z 1 8 RをE c o R I及びH i n d IIIで処理し、得られるベクター断片を、Humicola属のリパーゼをコードする長さ894 bpの合成DNA E c o R I／H i n d III断片と連結することによって、(実施例 2 Aのp U R 7 0 2 1に類似する) プラスミドp U R 7 0 3 3を調製した(配列番号7及び8並びに参考文献16参照)。

リパーゼを α -アグルチニンのC末端の、細胞壁アンカーを含む領域に融合させるために、プラスミドp U R 7 0 3 3をE a g I及びH i n d IIIで消化し、リパーゼコーディング配列を単離して、E a g I及びH i n d IIIで消化した酵母発現ベクターp S Y 1 (参考文献27参照)中に連結し、それによってp U R 7 0 3 4を生じさせた(第13図参照)。これは実施例1に述べた、誘導可能なG A 1 7プロモーターの制御下にインペルターゼ (S U C 2) シグナル配列に後続する α -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む2 μ mエピソード発現ベクターである。

30

上述の消化に並行して、p U R 7 0 3 3をE c o R V及びH i n d IIIでも消化し、それによって最後の15個のカルボキシル末端アミノ酸のためのコドンを含む長さ57 bpのDNA断片を解離させた。この断片を配列番号9及び10の、化学的に合成した2個のデオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって生じさせた小さいDNA断片に対して交換した。両DNA鎖のアニールリング後、これら2個のオリゴヌクレオチドは最初のリパーゼ遺伝子の3'コーディング配列の残部を実質的に再構成するが、リパーゼ遺伝子の下流に新たなN h e I制限部位を導入し、これにH i n d III部位が近接して続き、その際N h e I部位の最初の3個のヌクレオチドはリパーゼの最後のアミノ酸のコドン構成する。得られたプラスミドに記号“p U R 2 9 7 0 B”を付した。次に、この構築中間体をE a g I及びN h e Iで消化し、リパーゼコーディング断片を単離してp U R 2 9 6 8の1.4 kbのN h e I／H i n d III断片と共にE a g I及びH i n d III切断p S Y 1ベクター中に連結した。この三点連結によって得られた最終的なl i p o l a s e- α -アグルチニン酵母発現ベクターを“p U R 2 9 7 2 B”と命名した(第14図参照)。

40

このプラスミドを用いて、参考文献17に記載されたS. cerevisiae株S U 1 0を形質転換し、形質転換細胞を、リパーゼ／ α -アグルチニンキメラ遺伝子の発現を

50

惹起する誘導物質としてガラクトースを抑制量のグルコースの不在下に含有する Y P 培地中で培養した。

2. 活性

リパーゼ活性を定量するべく、2種の別個の基質に関して2種の活性測定を行なった。いずれの場合も、プラスミド pUR7034 または pSY1 で形質転換した SU10 酵母細胞を対照として用いた。従って、プラスミド pSY1、プラスミド pUR7034 またはプラスミド pUR2972B を保持する形質転換酵母細胞を、ヒスチジン及びウラシルを添加した YNB-グルコース培地中で24時間増殖させ、その後5%ガラクトースを添加した YP 培地中で1:10に希釈し、再び培養した。30℃で24時間のインキュベーション後、上記両アッセイのための第一の測定を行なった。

適用した第一のアッセイは pH スタット法であった。このアッセイではリパーゼ活性の1単位を、ラジオメーター pH スタット装置 (pHM 84 メーター、ABU 80 自動ビュレット、TTA 60 滴定アセンブリ) において標準的なアッセイ条件 (1:1 w/w アラビアゴムで乳化した純粋なトリオレエートと看做される 38 mM のオリーブ油と、20 mM の塩化カルシウムと、40 mM の塩化ナトリウムと、5 mM のトリスとを含有する 30 ml アッセイ溶液、pH 9.0、30℃) 下にトリグリセリド基質から毎分 1 μ mol の脂肪酸を遊離させ得る酵素量と定義する。生じた脂肪酸を 0.05 N NaOH で滴定し、測定した活性は推定酵素バッチの添加後1~2分間隔でのアルカリ消費に基づくものであった。固定化リパーゼ活性について試験するべく、1 ml の各培養物を遠心し、上清を取り分け、ペレットを 1 ml の 1 M ソルビトール中に再懸濁させて洗浄し、その後再び遠心し、かつ 200 μ l の 1 M ソルビトール中に再懸濁させた。各種の酵母細胞から得た最初の上清及び洗浄した細胞をリパーゼ活性について試験した。

A: 24時間後のリパーゼ活性 (LU/ml)

	結合細胞	培養液
pSY1	5.9	8.8
pUR7034	24.1	632.0
pUR2972B-(1)	18.7	59.6
pUR2972B-(2)	24.6	40.5

B: 48時間後のリパーゼ活性 (LU/ml)

	結合細胞	培養液	OD660
pSY1	6.4	4.3	~40
pUR7034	215.0	2750.0	~40
pUR2972B-(1)	37.0	87.0	~40
pUR2972B-(2)	34.0	82.0	~40

残りの酵母培養物を更にインキュベートし、48時間後に実質的に同じ分離操作を行なった。測定した初期活性に応じて、測定試料の実際量は 25 μ l から 150 μ l まで様々とした。

この一連の測定は、リパーゼ- α -アグルチニン融合タンパク質をコードするプラスミドを保持する酵母細胞が實際上、酵母細胞に関係付けられる幾分かのリパーゼ活性を呈することを示している。

リパーゼの活性が酵母細胞表面に固定化されることを更に確認するべく、付加的な第二のアッセイを行なった。手短に言えばこのアッセイでは、PNP (=パラニトロフェニル) の PNP-ブチレートからの遊離の反応速度を 400 nm における OD の測定によって決

定する。従って、pSY1、pUR7034またはpUR2972Bを保持する酵母細胞を含有する培養物10mlを遠心し、ペレットを4mlの緩衝液A（pH5.0の0.1M NaOAc、及び1mM PMSF）中に再懸濁させ、この4mlのうちの500μlを再び遠心し、かつ500μlのPNB緩衝液（pH9.0の20mMトリス-HCl、20mM CaCl₂、25mM NaCl）中に再懸濁させ、再度遠心し、最後に400μlのPNB緩衝液中に再懸濁させた。この画分を用いて、リパーゼの細胞結合部位を測定した。

残りの3500μlを遠心し、ペレットを4mlのA中に再懸濁させ、得られた各懸濁液に40μlのラミナリナーゼ（ex mol lusc, 1.25mU/μl）を添加し、最初37℃で3時間、続いて20℃で一晩インキュベートした。次に、完全細胞をなお含有する反応混合物を再び遠心し、上清を用いて、本来細胞壁に結合していたがラミナリナーゼインキュベーションにより遊離した物質の量を測定した。最終ペレットを400μlのPNP緩衝液中に再懸濁させ、細胞になお結合している部分を算定した。4mlのアッセイ緩衝液に加えた所定量の特定培養物画分のブランク反応を測定し、その後80μlの基質溶液（メタノール中に100mM PNP-ブチレート）の添加によって反応を開始させ、分光光度計において25℃及び400nmで観察した。

	細胞結合 活性*	培地中 活性	ラミナリナーゼ 抽出物	ラミナリナーゼ 抽出細胞	OD660
pSY1	0.001(116μl)	0.001	0.028	0.000	2.6
pUR7034	0.293(220μl)	0.446	0.076	0.985	2.36
pUR2972B-(1)	0.494(143μl)	0.021	0.170	0.208	2.10

*; 特に断らないかぎり、添加した酵素溶液の量は20μlであった。

この結果は、プラスミドpUR2972Bを保持する酵母細胞の表面に相当量のリパーゼ活性が固定化されることを明示している。ここでも、完全細胞の細胞壁に挿入されたリパーゼによって反応が触媒されるように導入が実現したが、このことは外向きの固定化を示唆する。そのうえ、ラミナリナーゼと共にインキュベートした後に相当量のリパーゼ活性が呈示されることも、α-アグルチニンのC末端部との遺伝子操作融合により異種酵素がおそらくは共有結合によって導入されることを明示する。

3. 局在

リパーゼ-α-アグルチニン融合タンパク質の発現、分泌、及び酵母細胞壁へのその後の導入も、実質的に実施例1の2“局在”に述べた、抗lipolase血清を用いる免疫蛍光標識によって確認した。

第15図から知見され得るように、ここでの免疫蛍光染色はα-ガラクトシダーゼ免疫染色と実質的に類似する像を示し、反応性は細胞表面外側に明らかに検出できる（細胞を取り巻く明瞭な光輪を示す第15図のA、及び細胞表面のより明るい円を示す第15図のB参照）が、培地中や細胞内部には検出できない。pUR2972BにHumicola属リパーゼ-α-アグルチニン融合タンパク質を発現させる酵母細胞は表面を均一に染色されるようになり、このことはα-アグルチニンC末端を有するキメラ酵素の実質的に総てが酵母細胞の外側に固定化されたことを示す。行なった対照実験では、プラスミドpUR7034を保持するSU10酵母細胞を対照として用い、この実験で適用した抗リパーゼ血清に対する細胞表面結合反応性は検出できなかった。

同様にして、rDNA技術を介して得られるHumicola属リパーゼの変異体をα-アグルチニンのC末端部に結合することも可能であり、前記変異体はエステル化反応またはエステル交換反応の間、より高い安定性を有し得る。

実施例3

S. cerevisiaeの表面に固定化したHumicola属リパーゼ/α-アグルチニン（固定化酵素系の構成発現）

10

20

30

40

50

実施例 2 に述べたプラスミド pUR2972 は Eag I 及び Hind III で処理し得、リパーゼ/α-アグルチニン遺伝子を含む約 2.2 kb の断片を単離することができる。プラスミド pSY16 を Eag I 及び Hind III で制限し、前記 2 酵素の制限部位間に、リパーゼ/α-アグルチニン断片を含む 2.2 kb 断片を連結して pUR2973 を得ることができる。このプラスミドの、キメラ酵素の産生に關与する部分は pUR2972 に類似し、ただしシグナル配列は異なる。pUR2972 は SUC2 インベルターゼシグナル配列を含むが、pUR2973 は α-接合因子配列を含む（参考文献 18 参照）。そのうえ、プラスミド pUR2973 は pUR2972 の截頭プロモーターに替えて、完全なプロモーター配列を伴った Leu2 マーカー遺伝子を含む。

実施例 4

S. cerevisiae の表面に固定化した Geotrichum 属リパーゼ/α-アグルチニン

AGα-1 (α-アグルチニン) の C 末端部を含む 1.4 kb の Nhe I / Hind III 断片の構築及び単離は実施例 1 に述べた。α-アグルチニンの C 末端膜アンカーをコードする DNA の、株 CMICC 335426 に由来する Geotrichum candidum リパーゼ B の完全コーディング配列への枠内遺伝子融合（第 8 図並びに配列番号 11 及び 12 参照）のためにプラスミド pUR2974 を用い得る。市販の pBluescript II SK プラスミドに由来するこのプラスミドは長さ 1850 bp の EcoRI / XhoI 挿入体上に、完全な G. candidum リパーゼ II をコードする cDNA を含む（第 9 図参照）。

相同なシグナル配列を伴った S. cerevisiae のための発現ベクターを開発するために、成熟リパーゼ B の N 末端を標準的な技術で実験により決定した。得られたアミノ酸配列 “Gln-Ala-Pro-Thr-Ala-Val-…” は、G. candidum リパーゼ II のシグナルペプチダーゼ切断部位と完全に一致する（参考文献 19 参照）。

成熟リパーゼ B を、一方では SUC2 (インベルターゼ) または α-接合因子 (プレプロ-αMF) の S. cerevisiae シグナル配列に融合させ、他方では AGα1 遺伝子の 3' 末端部に枠内融合させるのに PCR 技術を用い得る。PCR プライマー lip3 (配列番号 13 参照) は、(成熟タンパク質のコドン 5~7 にわたる) コーディング配列の 5' 末端部に本来存在する Eag I 部位がアミノ酸配列を何等変化させることなく不活性となるように構築することができる。後のクローニング操作を容易にするべく、PCR プライマーの 5' 末端に、SUC2 シグナル配列やプレプロ-αMF 配列への枠内連結のための新たな Eag I 部位を付与することも可能である。対応する PCR プライマー lip4 (配列番号 16 参照) は、リパーゼ B の C 末端をコードするヌクレオチドの後方に位置する余分な Nhe I 部位を含み、それによって α-アグルチニンの C 末端部への適正な融合を確実化する。

G. candidum リパーゼ II と、SUC2 シグナル配列及び α-アグルチニンの C 末端部との枠内連結のための PCR オリゴヌクレオチド

a. プレプロ αMF 配列または SUC2 シグナル配列への N 末端転移

Eag I A Q A P R P S L N

プライマー lip3: 5'-GGG GCG GCC GCG CAG GCC CCA AGG CGG TCT CTC AAT-3'

|| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

リパーゼ II: 3'-GAC CGG GTC CGG GGT GCC GCC AGA GAG TTA-5'

(非コーディング鎖; 配列番号 14 参照)

b. α-アグルチニンの C 末端部への C 末端融合

10

20

30

40

S N F E T D V N L Y G

リパーゼ: 5'-CA AAG TTT GAG ACT GAC GTT AAT CTC TAC GGT TAA AAC-3'

(コーディング鎖) | | | | | | | | | |

プライマー-lipo4: 3'-C TGA CTG CAA TTA GAG ATG CCA CGATCG CCCC-5'

Nhe I

(リパーゼコーディング鎖の部分に関しては配列番号15参照)

改変された末端を有するPCR産物は、やはり校正活性を示してエラーの無いDNA鋳型を保証する新規な熱安定性VENTポリメラーゼを通常のAmpI-Taqポリメラーゼの替わりに用いて標準的なPCRプロトコルにより生成させ得る。先に述べたプラスミ

10

d pUR2972をEagI (完全) 及びNheI (部分) で消化することにより、Humicola属リパーゼ断片をリパーゼBをコードするDNA断片に対し交換し、それによって最終的なS. cerevisiae発現ベクターpUR2975を調製することができる (第9図参照)。

実施例5

S. cerevisiaeの表面に固定化したRhizomucor mieheiリパーゼ/α-アグルチニン

20

α-アグルチニンのC末端部をコードする1.4kbのNheI/HindIII断片の構築及び単離は実施例1に述べた。プラスミドpUR2980は市販のpUC18のSmaI部位にクローニングされた1.25kbのcDNA断片を含み、(人工的な合成可能な) この断片は、トリアシルグリセロールをエステル交換する (参考文献21参照) か、またはバイオサーファクタントを製造する (参考文献22参照) 幾つかの方法において用いられる酵素であるRhizomucor mieheiのトリグリセリドリパーゼの完全なコーディング配列をコードする (参考文献20参照)。この断片は成熟リパーゼ分子の269コドンの外に、24アミノ酸シグナルペプチドのためのコドン、並びにプロペプチドの70アミノ酸のためのコドンも含む。成熟リパーゼをコードする遺伝子断片のSUC

30

2シグナル配列またはS. cerevisiaeのプレプロα-接合因子配列との適正な融合、並びに先に述べたNheI/HindIII断片との枠内融合を確実にするべくPCRを容易に適用し得る。次の2個のプライマーlipo5 (配列番号17参照) 及びlipo6 (配列番号20参照) は833bpのDNA断片をもたらし、この断片はプロテイナーゼK処理並びにEagI及びNheIでの消化後に長さ816bpの断片として、EagI/NheIで消化したプラスミドpUR2972及びpUR2973それぞれにクローニングすることができる (第7図参照)。

Eag I A S I D G G I

lipo5: 5'-CCC GCG GCC GCG AGC ATT GAT GGT GGT ATC-3'

||| ||| ||| ||| ||| |||

リパーゼ(非コーディング鎖): 3'-TCG TAA CTA GCA CCA TAG-5'

(リパーゼ非コーディング鎖の部分に関しては配列番号18参照)

N T G L C T

リパーゼ(コーディング鎖): 5'-AAC ACA GGC CTC TGT ACT-3'

||| ||| ||| ||| ||| |||

lipo6: 3'-TTG TGT CCG GAG ACA TGA CGATCGCGCC-5'

Nhe I

10

(リパーゼコーディング鎖の部分に関しては配列番号19参照)

これらの新規な S. cerevisiae 発現プラスミドは GAL7 プロモーターと、インベルターゼシグナル配列 (pUR2981) またはプレプロ- α -接合因子配列 (pUR2982) と、Rhizomucor miehei リパーゼ/ α -アグルチニンキメラ遺伝子と、2 μ m 配列と、欠陥 (截頭) Leu2 プロモーターと、Leu2 遺伝子とを含む。これらのプラスミドで S. cerevisiae を形質転換して増殖させ、先の諸実施例に述べたプロトコルを用いて分析することができる。

20

実施例 6

S. cerevisiae の表面に固定化した Aspergillus niger グルコースオキシダーゼ/GPI 固定細胞壁タンパク質

Aspergillus niger 由来のグルコースオキシダーゼ (β -D: 酸素 1-オキシドレダクターゼ; EC 1.1.3.4) は、 β -D-グルコースのグルコノ- δ -ラクトンへの酸化とそれに伴う酸素分子の過酸化水素への還元とを触媒する。この真菌酵素は、強固に結合した 2 個の FAD 補因子を含む分子量 150,000 のホモダイマーから成る。この酵素はグルコース検出キットで用いられるほか、食物の保存における過酸化水素源として有用でもある。遺伝子は cDNA とゲノムライブラリーとの両方からクローニングした。ただ 1 個の読み取り枠は介在配列を含まず、605 アミノ酸のタンパク質

30

をコードする (参考文献 23 参照)。2 個の適正なオリゴヌクレオチドを用いて、配列のコーディング部を PCR でのワンステップ改変操作において、グルコースオキシダーゼ、並びに FL01 遺伝子産物または α -アグルチニンの C 末端細胞壁アンカーをコードする融合遺伝子産物が得られるように調節する。即ち、先の諸実施例に述べたプラスミドのうちの幾つかを用いて対応する配列を、先の諸実施例で用いたシグナル配列のうちの一つと AG α 1 遺伝子の Nhe I/Hind III 部分との間に枠内で組み込むことができる。

2 個のモノマーのダイマー化が活性の必要条件となり得るので、別のアプローチでは GPI アンカーを伴わないグルコースオキシダーゼのための完全なコーディング配列を、融合構築物を既に保持する S. cerevisiae 形質転換細胞において発現させ得る。このような発現は、GPI アンカーを有する融合構築物の、例えば GAPDH または PGK プロモーターの補助下での構成発現によって実現し得る。例えば GAL7 プロモーターなどの誘導可能なプロモーターを含む DNA 構築物を用いることにより、固定しない未結合モノマーを製造することが可能である。

40

実施例 7

ダイズ抽出物中のラフィノース、スタキオース及び類似糖質を、酵母に固定化した α -ガラクトシダーゼ/ α -アグルチニンで変換する方法

プラスミド pUR2969 で形質転換した酵母は大規模に培養できる。培養の間一定の時間間隔で、洗浄した細胞をその表面における α -ガラクトシダーゼ活性の存在に関し、実施例 1 に述べた方法で分析するべきである。細胞密度と単位生物量当たりの α -ガラクト

50

シダーゼ活性との両方がその最大値に達したら、酵母細胞を遠心によって回収し、洗浄し得る。洗浄した細胞はダイズ抽出物に添加し得る。酵母細胞の最終濃度は0.1 g/l から10 g/l までとし得るが、好ましくは前記濃度は1 g/l を上回るべきである。ダイズ抽出物の温度は酵母細胞の代謝活性を低減するべく8℃より低くするべきである。ラフィノース及びスタキオースの変換はHPLC法で分析し得、前記糖質の95%変換後、酵母細胞を遠心によって分離して、その生物量1 g当たりの α -ガラクトシダーゼ活性を測定し得る。優れた活性を有する遠心分離物は後の変換過程で用い得、一方本来の活性の50%未満の活性しか有しない遠心分離物は増殖培地中で蘇生させ得、その際細胞は2~4時間掛けて回復させ得る。その後、細胞を遠心し、洗浄してから、後の変換過程で用い得る。

10

実施例 8

酵母に固定化したHumicola属リパーゼ/ α -アグルチニンを用いてのバイオサーファクタントの製造

プラスミドpUR2972または2973で形質転換した酵母は大規模に培養できる。培養の間一定の時間間隔で、洗浄した細胞をその表面におけるリパーゼ活性の存在に関し、実施例1に述べた方法で分析し得る。細胞密度と単位生物量当たりのリパーゼとの両方がその最大値に達したら、酵母細胞を遠心によって回収し、洗浄し得る。洗浄した細胞は、少量の水中に懸濁させて、好ましくは炭素原子12~18個の鎖長を有する脂肪酸と、好ましくはグルコース、ガラクトースまたはスクロースである糖質との混合物を収容した反応容器に加え得る。(酵母細胞中の水を除いた)水の総量は0.1%未満であり得る。酵母細胞の最終濃度は0.1 g/l から10 g/l までとし得るが、好ましくは前記濃度は1 g/l を上回る。反応容器は、(不飽和)脂肪酸の酸化を回避し、かつ酵母の代謝活性を最小限に留めるべく N_2 及び CO_2 の雰囲気下に保持しなければならない。容器内の混合物の温度は、用いる脂肪酸の種類に応じて30~60℃とするべきである。脂肪酸の変換はGLC法で分析し得、脂肪酸の95%変換後、酵母細胞を遠心によって分離して、その生物量1 g当たりのリパーゼ活性を測定し得る。優れた活性を有する遠心分離物は後の変換過程で用い得、一方本来の活性の50%未満の活性しか有しない遠心分離物は増殖培地中で蘇生させ得、その際細胞は2~8時間掛けて回復させ得る。その後、細胞を再び遠心し、洗浄し、後の変換過程で用い得る。

20

実施例 9

酵母に固定化したRhizomucor mieheiリパーゼ/ α -アグルチニンを用いての特定種類のトリアシルグリセロールの製造

プラスミドpUR2981または2982で形質転換した酵母は大規模に培養できる。培養の間一定の時間間隔で、洗浄した細胞をその表面におけるリパーゼ活性の存在に関し、実施例1に述べた方法で分析し得る。細胞密度と単位生物量当たりのリパーゼとの両方がその最大値に達したら、酵母細胞を遠心によって回収し、洗浄し得る。洗浄した細胞は、少量の水中に懸濁させて、様々なトリアシルグリセロール及び脂肪酸の混合物を収容した反応容器に加え得る。(酵母細胞中の水を除いた)水の総量は0.1%未満であり得る。酵母細胞の最終濃度は0.1 g/l から10 g/l までとし得るが、好ましくは前記濃度は1 g/l を上回る。反応容器は、(不飽和)脂肪酸の酸化を回避し、かつ酵母の代謝活性を最小限に留めるべく N_2 及び CO_2 の雰囲気下に保持しなければならない。容器内の混合物の温度は、用いるトリアシルグリセロール及び脂肪酸の種類に応じて30~70℃とするべきである。エステル交換の程度はGLC/MS法で分析し得、所望種類のトリアシルグリセロールが理論値の80%以上生成した後、酵母細胞を遠心によって分離して、その生物量1 g当たりのリパーゼ活性を測定し得る。優れた活性を有する遠心分離物は後の変換過程で用い得、一方本来の活性の50%未満の活性しか有しない遠心分離物は増殖培地中で蘇生させ得、その際細胞は2~8時間掛けて回復させるべきである。その後、細胞を遠心し、洗浄し、後のエステル交換反応過程で用い得る。

30

40

(実施例1に述べた)プラスミドpSY13またはプラスミドpUR2969で形質転換した株MT302/1Cのパン酵母はブダペスト条約に従い、それぞれ仮番号330.9

50

2及び329.92の下に1992年7月3日付でCentraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)に寄託した。

実施例10

S. cerevisiaeの表面に固定化したHumicola属リパーゼ/FLO1融合物

“分散する酵素細胞のフロックへの（可逆的）凝集”と定義されるフロキュレーション（参考文献24参照）は、工業的発酵における酵素株の最も重要な特徴である。フロキュレーションは、細胞壁タンパク質に関連する特性であること、また定量的特性であることでも重要である。S. cerevisiaeのフロキュレーション表現型に関連する遺伝子の一つにFLO1遺伝子が有る。この遺伝子は染色体Iの右端から約24 kbのところに位置し、FLO1遺伝子の主要部を含むクローンのDNA配列がつい最近決定された（参考文献26参照）。この配列を第11図並びに配列番号21及び22に示す。クローン化断片は、サザン及びノザンハイブリダイゼーションから判断してゲノムコピーより約2 kb短いと考えられるが、FLO1遺伝子の両端を含む。DNA配列データの解析によって、推定されるタンパク質がN末端に、分泌のためのシグナル配列を保証する疎水性領域を有し、またGPIアンカーの結合のためのシグナルとして機能し得る疎水性C末端を有し、かつ特にC末端に多くのグリコシル化部位を有し、任意に定義したC末端（アミノ酸271～894）の46.6%はセリン及びトレオニンであることが判明している。これらのことから、FLO1遺伝子産物が酵母細胞壁に配向して局在し、隣接細胞との相互作用過程に直接関与し得ると考えることができる。従って、クローニングしたFLO1配列は、タンパク質またはペプチドを細胞表面に、異なる種類の細胞壁アンカーによって固定化するのに適当であり得る。

組み換え体DNA構築物は、例えばFLO1遺伝子産物のアミノ酸271～894をコードするDNA、即ち第11図のポリヌクレオチド811～2682を用いることによって得ることができる。2個のPCRプライマーpcrflo1（配列番号23参照）及びpcrflo2（配列番号26参照）の適用により、DNA断片の両端にNhe I及びHind III部位を導入し得る。第二のステップにおいて、pUR2972（AまたはB）中に存在する、 α -アグルチニンのC末端部をコードする1.4 kbのNhe I/Hind III断片を、FLO1タンパク質のC末端部をコードする1.9 kbのDNA断片によって置き換え得、それによって得られるプラスミドpUR2990（第12図参照）は（a）インベルターゼシグナル配列（SUC2）と、これに後続する（b）融合タンパク質とをコードするDNA配列を含み、前記融合タンパク質は（b.1）Humicola属のリパーゼ（参考文献16参照）と、これに後続する（b.2）FLO1タンパク質のC末端（アミノ酸271～894）とから成る。

Humicola属リパーゼをコードする遺伝子と、FLO1遺伝子産物のC末端部をコードする遺伝子との枠内連結のためのPCRオリゴヌクレオチド

プライマーpcrflo1: 5'-GAATTC GCT AGC AAT TAT GCT GTC AGT ACC-3'
Nhe I ||| ||| ||| ||| ||| |||

FLO1遺伝子(非コーディング鎖): 3'-AGT TTA ATA CGA CAG TCA TGG TGA-5'
 (非コーディング鎖の部分に関しては配列番号24参照)

S N F E T D V N L Y G
FLO1(コーディング鎖): 5'-AATAA AATTCGCGTTCTTTTACG-3'
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

プライマーpcrflo2: 3'-TTAAGCGCAAGAAAAATGC TTCGAACTCGAG-5'
Hind III

(コーディング鎖の部分に関しては配列番号25参照)

プラスミドpUR2972（AまたはB）はNhe I（部分）及びHind IIIで制限し

10

20

30

40

50

得、ベクター主鎖及びリパーゼ遺伝子を含む Nhe I / Hind III断片を、FLO1配列を含むプラスミドの対応して消化したPCR生成物に連結して、GAL7プロモーターと、S. cerevisiaeインベルターゼシグナル配列と、リパーゼ/FLO1キメラ遺伝子と、酵母2 μ m配列と、欠陥Leu2プロモーターと、Leu2遺伝子とを含むプラスミドpUR2990を得ることができる。このプラスミドでS. cerevisiaeを形質転換し得、形質転換した細胞は誘導物質としてガラクトースを含有するYP培地中で培養することができる。

リパーゼ/FLO1キメラタンパク質の発現、分泌、局在及び活性は、実施例1に述べたのと同様の操作を用いて分析可能である。

参考文献：

1. Monsan, P., Combes, D. (1988) "Enzyme stabilization by immobilization"; in Meth. in Enzymol. Vol. 137 584-598.
2. Kok, J. (1990) "Genetics of proteolytic systems of lactic acids bacteria" FEMS Microbiol. Rev. 87 15-54.
3. Conzelmann, A., Fankhauser, C., Desponds, C. (1990) "Myoinositol gets
incorporated into numerous membrane glycoproteins of *S. cerevisiae*: Incorporation is dependent on phosphomannomutase" (SEC53). EMBO 9 653 - 661. 10
4. Lipke, P.,N., Wojciechowicz, D., Kurjan, J. (1989) "AG α 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating" Mol. Cell. Biol. 9 3155-3165.
5. Roy, A., Lu, C.F., Marykwas,D., Lipke, P., Kurja, J. (1991) "The AGA1 gene product is involved in cell surface attachment of the *S. cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin", Mol. Cell. Biol. 11 4196-4206. 20
6. Teunissen, A.W.R.H., van den Berg, J.A., Steensma, H.Y. (1993) "Physical localization of the flocculation gene *FLO1* on chromosome I of *S. cerevisiae*, Yeast 9 (1) 1-10.
7. Yanisch Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985) "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13 mp18 and pUC19 vectors." Gene 33 103-119. 30
8. Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H. (1989) "One step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 2172-2175.
9. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) "DNA sequencing with chain terminating inhibitors" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 5463-5467.
10. Hsiao, K. (1991) "A fast and simple procedure for sequencing double stranded DNA with Sequenase" Nucl. Acids Res. 19 2787. 40
11. Klebe, R.J.J., Harriss, V., Sharp, Z.D., Douglas, M.G. (1983) "A general method for polyethylene glycol induces genetic transformation of bacteria and yeast" Gene 25 333-341.

12. Overbeeke, N., Fellingner, A. J., Toonen, M. Y., van Wassenaar, P. D., Verrips, C. T. (1989) "Cloning and nucleotide sequence of the α -galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba*" Plant Mol. Biol. 13 541-550.
13. Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of heads of bacteriophage T4." Nature 227 680-685.
14. Towbin, H. Steahelin, T., Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 4350-4354. 10
15. Watzele, M., Klis, F., Tanner, W. (1988) "The immunological and molecular characterization of α -agglutinin from *S. cerevisiae*" EMBO J. 7 1483-1488
16. Boel, E., Huge-Jensen, B., Brown, J. D. (1989) "*Humicola* lipase and process for the production of recombinant *Humicola* lipases" EP-A1-0 305 216.
17. Verbakel, J.M.A. (1991) "Heterologous gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" PhD thesis, Rijksuniversiteit Utrecht, The Netherlands 20
18. Kurjan, J., Herskowitz, I. (1982) "Structure of a yeast Pheromone Gene (MF α): A putative α -Factor precursor contains four tandem copiers of mature α -factor" Cell 30 933-943.
19. Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizumi, T., Tsunasawa, S. (1989) "cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase" J. Biochem. 106 383-388.
20. Boel, E., Huge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L., Fiil, N. (1988) "Rhizomucor miehei Triglyceride Lipase is Synthesized as a Precursor" Lipids, Vol.23, No 7, 701-706. 30
21. Schuch, R., Mukherjee, K.D. (1988) in "World conference on Biotechnology for the fat and oil industry" ISBN 0-935315-21-7, 328-329.
22. Kosaric, N., Cairus, W.L., Gray, N.C.C. (editors) (1987) "Biosurfactants and Biotechnology" Marcel Dekker Inc., New York, Vol. 25.

23. Frederick, K.R., Tung, J., Emerik, R.S., Masiarz, F.R., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S. (1990) "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*". J. Biol. Chem., Vol.265, No.7, 3793-3802.
24. Johnston, J.R., Reader, H.P. (1983) "Genetic control of flocculation" in 'Yeast Genetics, Fundamental and applied aspects', Spencer, J.F.T. (Editor), ISBN 0-540-90793-9, p. 205-224.
25. Schreuder, M.P., Brekelmans, S., Van den Ende, H., Klis, F.M. (1993) "Targeting of a Heterologous Protein to the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*" Yeast 9 399-409 10
26. Teunissen, A.W.R.H., Holub, E., Van der Hucht, J., Van Den Berg, J.A., Steensma, H.Y. (1993) "Sequence of the Open reading frame of the *FLO1* Gene from *Saccharomyces cerevisiae*" YEAST 9 423-427.
27. Harmsen, M.M., Langedijk, A.C., Van Tuinen, E., Geerse, R.H.; Raue, H.A., Maat, J. (1993) Effect of a *pmr1* disruption and different signal sequences on the intracellular processing and secretion of *Cyamopsis tetragonoloba* α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* Gene 125 115-123 20

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：6057

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：*Saccharomyces cerevisiae*(サッカロミセス・セレビシエ)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：3653..5605

他の情報：／機能＝“有性凝集”/生成物＝“ α -凝集素”

配列：

AAGCTTTAGG TAAGGGAGGC AGGGGGAAAA GATACTGAAA TGACGGAAAA CGAGAATATG	60
GAGCAGGGAG CAACTTTTAG AGCTTTACCC GTTAAAAGGT CAAATCGAGG CTCCTGCCT	120
TTGTCTGATT TTAGTAGTAC CGGAAGGTTT ATTACGCCCA AGAACAGTGC TTGAATTGAG	180
TTCTCGGGAC ACGGGAAAGA CAATGGAAGA AAAATTTACA TTCAGTAGCC TTATATATGA	240
AATGCTGCCA AGCCACGTCT TTATAAGTAG ATAATGTCCC ATGAGCTGAA CTATGGGAAT	300
TTATGACGCA GTTCATTGTA TATATATTAC ATTAACCTCT TAGTTTAACA TCTGAATTGT	360
TTTATAAAAT AACTTTTTGA ATTTTTTTAT GATCGCTTAG TTAAGTCTAT TATATCAGGT	420
TTTTTCATTC ATCATAATTG TTCGTTAAAT ATGAGTATAT TTAAATACAG GAATTAGTAT	480

CATTGCACT CACGAAAAGG GCCGTTTCAT AGAGAGTTTT CTTAATAAAG TTGAGGGTTT	540	
CCGTGATAGT TTTGAGGGGT TGTGTTGAACT AGATTACGC TTACCTTTCA ACTGATTAAT	600	
TTTTTCAGCG GGCTTATCAT AATCATCCAT CATAGCAGTC TTTCTGGACT TCGTCGAGGA	660	
CTGGCTTTCT GAATTTTGAC GGTCCCTATT AGCTCCAGTT GGAGGAATTG AGTTACCTAC	720	
AACTGGCAAG AGGTCTTGT TTGGATTCAA AATAGGACTT TGTGGTAGCA GTTTGGTTTT	780	10
ATTCAATCTA AAGATATGAG AAACAGGTTT TAAGTAAATC GATACTATTG TACCAATGTT	840	
TAGCTCCAAT TCCTCCAAAA CGGTGGGATC TAATTTTGTG TTCATTTCTA TTAGTGGCAA	900	
CTCTCCGTCC AGTACTGATT TTAAAGATTC AAAAGTTATC GCGTTTGATA TACGAGACGT	960	
TTTCGTTAAT GACAGCAATC TCCAATACAT CAGTGTTTTA TCTCTTAAGT CAGGATTATT	1020	
TTCGTGATCG GTGCATCCTT TTAATAAATC CATACAAAGT TCTTCAGTTT CCTTTGTAGG	1080	20
ATTTCTGATG AAGAATTTTA TTGCTGAGTT CAGAATGGAA AATTGCACTT CTAGCGTCTC	1140	
ATTAAACATG TTTGAGGAAA AAACCTCTAA TAACTCCAGG TAGTTTGGAA TTACATCCGA	1200	
ATATTGCGTT ATTATCCAGA TCATAGCGTT TTTTGATTCA GGTTCCCTGTA CAACTTCAGT	1260	
GTGTTTGAAT AGTTCTGTGA CGTTTGCTTT AAAATTATTG GGATATTTCC TCAAAATATT	1320	
TCTGAAAACC GAAATAATCT CCTGGACGAC ATAATCAACA CCGAATTCTA ACAAATCTAG	1380	30
TAGCACAGCG ACACAATCGT GTACAGAGTC TTCATCTAGC TTAACAGCGA GATTACCAAT	1440	
GGCTCTGACT GATTTCCCTG ACATTTGAAT ATCAATATCT GTAGCATATT GTTCCAACCTC	1500	
TTCTAGAATT CTTGGTAATG TTTCTTGTT AGCTAAAAGA TATAAACACT CTAATTTCTG	1560	
GTCTTTGATG TATATGGGGT CATTGTACTC GATGAAAAAA TACGAAATGT CTAGCCTGAG	1620	
TAGAGATGAC TCCCTACTCA ATAAAAGAAG AATAACGTTT CTTAATACTA AAAATTGTAA	1680	40
TTCAGGCGGC TTATCTAACA AAGCTATTAC AGAGTTAGAT AGCTTTTTCGG CTAGAGTTTC	1740	
TTTGATGACG TCAACATAAT TCAACAAGTA CATGATGAAT TTAAAGAGT TCAACACTAC	1800	
GATGTGTTT ACTTGTTGCA GGTACGGTAA AGCTAGTTTC ATCATTTCAT GGGTATCCAA	1860	

ATAATGCTGC GGCACAACCG AAGTCGTCAA AACTTCCAAA ACAGTAGCCT TATTCCACTC	1920
ATTTAATTCG GGTAAAAGTT CTAGCATGTC AAAAGCGAGT TCCAAGGGAA TCCTGAAGGT	1980
TCCATGTTAG CGTTTTTTTC GTGAATGGAA TATAAAGTAT GTAATGCAGC TACAATGACT	2040
TCTGGAGAGC TCGACTGTGC CTTTACAATG TCATGTAGAA TGCTTGATAA CCCC AATACC	2100
CTTTCATGAT CAATTTTCATC TAAATCCAAC AGTGCGTAAA TTGCTGTCCT CGTCACTTGT	2160
TCAGGTGGAG ACTTGTGATT TACCAATGAA ATGATACAGT CGAAGGCCTG ATCAGATAGC	2220
TCTTTCACCG GGACTAATAC CAGAGTTCTT AGTGCCATTA TTTGTAACTT TTCATCTCTG	2280
CTTTTGAAAT CGTCCATTAT AAATGGCAAA GCCTCTCTGG CCTGCTGAGG TTTTAATGCG	2340
CCGATCACCC TAATATACTC ATGGCAAATT CTTTTCACCT CTAGATCATC TTCAATTGTC	2400
CAAAATTTCA AGAGCTCAGA AAACAGAAGG GACATTTTCGC CATAGTTTCC TAGAACCRAA	2460
TTGGCGATAA TTTTCTCAG AGCATTTTTC CTTCTTGTTA TATTCGATTT AAAC TTTTTT	2520
ACTCCAAAAT GTTGCAGATC TGTGACGATT TCATTTGCTT TATATCTGGC AAAA ACTTTT	2580
TGATCGGACA TAAGCGAAAT ACGTCCTATT AATGAAGTGA ATGTTCTTGC TGTATTCCCT	2640
TCTTGTGCAG TAGATTAATT CTGTTTCCAG GCTGCGATAC TTTGATACCC AATACTAAAA	2700
GTTGATGATT TGAACGATCT CCTATTTCTT CGCACATTTT TGGAGCGATA CCCGGAAGAC	2760
AGAATCGCGA TGTTAAGAAA ATAGTTCTGA TGGCACTAAA GAGATCATGA TTAAGGAAAG	2820
GTAAGTGATA TGCATGAATG GGAATAGGCT TTCGAACTTG ACGATTTAGT TCCTTATTTT	2880
TATCCATCTA ATCCTCCAAC TTCAATAGGC CTTATCTAGC TCAGAGCAGT ATTTAATTGA	2940
GAATAGTAGC TTAATTGAAA CCTTACTAAA AAAGTGTATG GTTACATAAG ATAAGGCGTT	3000
AAGAAGAGTA TACATATGCA TTATTCATTA CCAAGACCAC TATGAATAGT AATACCATAT	3060
TTAGCTTTTG AAAC TCA TGT TTTCTATTGT GTTGT TTTCAA ATTCTCTGT TAGGCTCAAT	3120
TTAGGTTAAT TAAATTATAA AAAAATATAA AAAATAAAGA AAGTTTATCC ATCGGCACCT	3180
CAATTCAATG GAGTAAACAG TTTCAACACT GAGTGGTGAA ACATTGAACA ACTACATGCA	3240

10

20

30

40

GTTTCCCGCC ACGAGGCAAG TGTAGGTCCT TTGTCCATTT CGCTTTGTTT TGCAGGTCAT	3300	
TGATGACCTA ATTAGGAAGG TAGAAGCCGC TCCAGCTCAA TAAGGAAATG CTAAGGGTAC	3360	
TCGCCTTTGG TGTTTTACCA TACAATGGCA GCTTTATGTC ACTTCATTCT TCAGTAACGG	3420	
CGCTTAAATA TTCCCAAAAA CGTTACAATG GAATTGTTTG ATCATGTAAC GAAATGCAAT	3480	
CTTCTAAAAA AAAAGCCATG TGAATCAAAA AAAGATTCCT TTTAGCATAC TATAAATATG	3540	10
CAAAATGCCC TCTATTTATT CTAGTAATCG TCCATTCTCA TATCTTCCTT ATATCAGTCG	3600	
CCTCGCTTAA TATAGTCAGC ACAAAGGAA CAACAATTCG CCAGTTTTC A A ATG	3655	
		Met
		1
TTC ACT TTT CTC AAA ATT ATT CTG TGG CTT TTT TCC TTG GCA TTG GCC	3703	
Phe Thr Phe Leu Lys Ile Ile Leu Trp Leu Phe Ser Leu Ala Leu Ala		
5 10 15		20
TCT GCT ATA AAT ATC AAC GAT ATC ACA TTT TCC AAT TTA GAA ATT ACT	3751	
Ser Ala Ile Asn Ile Asn Asp Ile Thr Phe Ser Asn Leu Glu Ile Thr		
20 25 30		
CCA CTG ACT GCA AAT AAA CAA CCT GAT CAA GGT TGG ACT GCC ACT TTT	3799	
Pro Leu Thr Ala Asn Lys Gln Pro Asp Gln Gly Trp Thr Ala Thr Phe		
35 40 45		
GAT TTT AGT ATT GCA GAT GCG TCT TCC ATT AGG GAG GGC GAT GAA TTC	3847	30
Asp Phe Ser Ile Ala Asp Ala Ser Ser Ile Arg Glu Gly Asp Glu Phe		
50 55 60 65		
ACA TTA TCA ATG CCA CAT GTT TAT AGG ATT AAG CTA TTA AAC TCA TCG	3895	
Thr Leu Ser Met Pro His Val Tyr Arg Ile Lys Leu Leu Asn Ser Ser		
70 75 80		
CAA ACA GCT ACT ATT TCC TTA GCG GAT GGT ACT GAG GCT TTC AAA TGC	3943	
Gln Thr Ala Thr Ile Ser Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Phe Lys Cys		40
85 90 95		
TAT GTT TCG CAA CAG GCT GCA TAC TTG TAT GAA AAT ACT ACT TTC ACA	3991	
Tyr Val Ser Gln Gln Ala Ala Tyr Leu Tyr Glu Asn Thr Thr Phe Thr		
100 105 110		

TGT ACT GCT CAA AAT GAC CTG TCC TCC TAT AAT ACG ATT GAT GGA TCC	4039	
Cys Thr Ala Gln Asn Asp Leu Ser Ser Tyr Asn Thr Ile Asp Gly Ser		
115 120 125		
ATA ACA TTT TCG CTA AAT TTT AGT GAT GGT GGT TCC AGC TAT GAA TAT	4087	
Ile Thr Phe Ser Leu Asn Phe Ser Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Tyr		
130 135 140 145		
GAG TTA GAA AAC GCT AAG TTT TTC AAA TCT GGG CCA ATG CTT GTT AAA	4135	10
Glu Leu Glu Asn Ala Lys Phe Phe Lys Ser Gly Pro Met Leu Val Lys		
150 155 160		
CTT GGT AAT CAA ATG TCA GAT GTG GTG AAT TTC GAT CCT GCT GCT TTT	4183	
Leu Gly Asn Gln Met Ser Asp Val Val Asn Phe Asp Pro Ala Ala Phe		
165 170 175		
ACA GAG AAT GTT TTT CAC TCT GGG CGT TCA ACT GGT TAC GGT TCT TTT	4231	20
Thr Glu Asn Val Phe His Ser Gly Arg Ser Thr Gly Tyr Gly Ser Phe		
180 185 190		
GAA AGT TAT CAT TTG GGT ATG TAT TGT CCA AAC GGA TAT TTC CTG GGT	4279	
Glu Ser Tyr His Leu Gly Met Tyr Cys Pro Asn Gly Tyr Phe Leu Gly		
195 200 205		
GGT ACT GAG AAG ATT GAT TAC GAC AGT TCC AAT AAC AAT GTC GAT TTG	4327	
Gly Thr Glu Lys Ile Asp Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Asn Val Asp Leu		
210 215 220 225		
GAT TGT TCT TCA GTT CAG GTT TAT TCA TCC AAT GAT TTT AAT GAT TGG	4375	30
Asp Cys Ser Ser Val Gln Val Tyr Ser Ser Asn Asp Phe Asn Asp Trp		
230 235 240		
TGG TTC CCG CAA AGT TAC AAT GAT ACC AAT GCT GAC GTC ACT TGT TTT	4423	
Trp Phe Pro Gln Ser Tyr Asn Asp Thr Asn Ala Asp Val Thr Cys Phe		
245 250 255		
GGT AGT AAT CTG TGG ATT ACA CTT GAC GAA AAA CTA TAT GAT GGG GAA	4471	40
Gly Ser Asn Leu Trp Ile Thr Leu Asp Glu Lys Leu Tyr Asp Gly Glu		
260 265 270		
ATG TTA TGG GTT AAT GCA TTA CAA TCT CTA CCC GCT AAT GTA AAC ACA	4519	
Met Leu Trp Val Asn Ala Leu Gln Ser Leu Pro Ala Asn Val Asn Thr		
275 280 285		

ATA GAT CAT GCG TTA GAA TTT CAA TAC ACA TGC CTT GAT ACC ATA GCA Ile Asp His Ala Leu Glu Phe Gln Tyr Thr Cys Leu Asp Thr Ile Ala 290 295 300 305	4567	
AAT ACT ACG TAC GCT ACG CAA TTC TCG ACT ACT AGG GAA TTT ATT GTT Asn Thr Thr Tyr Ala Thr Gln Phe Ser Thr Thr Arg Glu Phe Ile Val 310 315 320	4615	
TAT CAG GGT CGG AAC CTC GGT ACA GCT AGC GCC AAA AGC TCT TTT ATC Tyr Gln Gly Arg Asn Leu Gly Thr Ala Ser Ala Lys Ser Ser Phe Ile 325 330 335	4663	10
TCA ACC ACT ACT ACT GAT TTA ACA AGT ATA AAC ACT AGT GCG TAT TCC Ser Thr Thr Thr Thr Asp Leu Thr Ser Ile Asn Thr Ser Ala Tyr Ser 340 345 350	4711	
ACT GGA TCC ATT TCC ACA GTA GAA ACA GGC AAT CGA ACT ACA TCA GAA Thr Gly Ser Ile Ser Thr Val Glu Thr Gly Asn Arg Thr Thr Ser Glu 355 360 365	4759	20
GTG ATC AGT CAT GTG GTG ACT ACC AGC ACA AAA CTG TCT CCA ACT GCT Val Ile Ser His Val Val Thr Thr Ser Thr Lys Leu Ser Pro Thr Ala 370 375 380 385	4807	
ACT ACC AGC CTG ACA ATT GCA CAA ACC AGT ATC TAT TCT ACT GAC TCA Thr Thr Ser Leu Thr Ile Ala Gln Thr Ser Ile Tyr Ser Thr Asp Ser 390 395 400	4855	
AAT ATC ACA GTA GGA ACA GAT ATT CAC ACC ACA TCA GAA GTG ATT AGT Asn Ile Thr Val Gly Thr Asp Ile His Thr Thr Ser Glu Val Ile Ser 405 410 415	4903	30
GAT GTG GAA ACC ATT AGC AGA GAA ACA GCT TCG ACC GTT GTA GCC GCT Asp Val Glu Thr Ile Ser Arg Glu Thr Ala Ser Thr Val Val Ala Ala 420 425 430	4951	
CCA ACC TCA ACA ACT GGA TGG ACA GGC GCT ATG AAT ACT TAC ATC CCG Pro Thr Ser Thr Thr Gly Trp Thr Gly Ala Met Asn Thr Tyr Ile Pro 435 440 445	4999	40
CAA TTT ACA TCC TCT TCT TTC GCA ACA ATC AAC AGC ACA CCA ATA ATC Gln Phe Thr Ser Ser Ser Phe Ala Thr Ile Asn Ser Thr Pro Ile Ile 450 455 460 465	5047	

TCT TCA TCA GCA GTA TTT GAA ACC TCA GAT GCT TCA ATT GTC AAT GTG	5095	
Ser Ser Ser Ala Val Phe Glu Thr Ser Asp Ala Ser Ile Val Asn Val		
470 475 480		
CAC ACT GAA AAT ATC ACG AAT ACT GCT GCT GTT CCA TCT GAA GAG CCC	5143	
His Thr Glu Asn Ile Thr Asn Thr Ala Ala Val Pro Ser Glu Glu Pro		
485 490 495		
ACT TTT GTA AAT GCC ACG AGA AAC TCC TTA AAT TCC TTC TGC AGC AGC	5191	10
Thr Phe Val Asn Ala Thr Arg Asn Ser Leu Asn Ser Phe Cys Ser Ser		
500 505 510		
AAA CAG CCA TCC AGT CCC TCA TCT TAT ACG TCT TCC CCA CTC GTA TCG	5239	
Lys Gln Pro Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Pro Leu Val Ser		
515 520 525		
TCC CTC TCC GTA AGC AAA ACA TTA CTA AGC ACC AGT TTT ACG CCT TCT	5287	
Ser Leu Ser Val Ser Lys Thr Leu Leu Ser Thr Ser Phe Thr Pro Ser		
530 535 540 545		20
GTG CCA ACA TCT AAT ACA TAT ATC AAA ACG GAA AAT ACG GGT TAC TTT	5335	
Val Pro Thr Ser Asn Thr Tyr Ile Lys Thr Glu Asn Thr Gly Tyr Phe		
550 555 560		
GAG CAC ACG GCT TTG ACA ACA TCT TCA GTT GGC CTT AAT TCT TTT AGT	5383	
Glu His Thr Ala Leu Thr Thr Ser Ser Val Gly Leu Asn Ser Phe Ser		
565 570 575		
GAA ACA GCA CTC TCA TCT CAG GGA ACG AAA ATT GAC ACC TTT TTA GTG	5431	30
Glu Thr Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Ile Asp Thr Phe Leu Val		
580 585 590		
TCA TCC TTG ATC GCA TAT CCT TCT TCT GCA TCA GGA AGC CAA TTG TCC	5479	
Ser Ser Leu Ile Ala Tyr Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Gln Leu Ser		
595 600 605		
GGT ATC CAA CAG AAT TTC ACA TCA ACT TCT CTC ATG ATT TCA ACC TAT	5527	
Gly Ile Gln Gln Asn Phe Thr Ser Thr Ser Leu Met Ile Ser Thr Tyr		
610 615 620 625		40
GAA GGT AAA GCG TCT ATA TTT TTC TCA GCT GAG CTC GGT TCG ATC ATT	5575	
Glu Gly Lys Ala Ser Ile Phe Phe Ser Ala Glu Leu Gly Ser Ile Ile		
630 635 640		

TTT CTG CTT TTG TCG TAC CTG CTA TTC TAAAACGGGT ACTGTACAGT 5622
 Phe Leu Leu Leu Ser Tyr Leu Leu Phe
 645 650

TAGTACATTG AGTCGAAATA TACGAAATTA TTGTTCATAA TTTTCATCCT GGCTCTTTTT 5682

TTCTTCAACC ATAGTTAAAT GGACAGTTCA TATCTTAAAC TCTAATAATA CTTTTCTAGT 5742

TCTTATCCTT TTCCGTCTCA CCGCAGATTT TATCATAGTA TTAAATTTAT ATTTTGTTTCG 5802

10

TAAAAAGAAA AATTTGTGAG CGTTACCGCT CGTTTCATTA CCCGAAGGCT GTTTCAGTAG 5862

ACCACTGATT AAGTAAGTAG ATGAAAAAAT TTCATCACCA TGAAAGAGTT CGATGAGAGC 5922

TACTTTTTCA AATGCTTAAC AGCTAACCGC CATTCAATAA TGTTACGTTT TCTTCATTCT 5982

GCGGCTACGT TATCTAACAA GAGGTTTTAC TCTCTCATAT CTCATTCAAA TAGAAAGAAC 6042

ATAATCAAAA AGCTT 6057 20

配列番号：2

配列の長さ：650

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Phe Thr Phe Leu Lys Ile Ile Leu Trp Leu Phe Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ile Asn Ile Asn Asp Ile Thr Phe Ser Asn Leu Glu Ile 30
 20 25 30

Thr Pro Leu Thr Ala Asn Lys Gln Pro Asp Gln Gly Trp Thr Ala Thr
 35 40 45

Phe Asp Phe Ser Ile Ala Asp Ala Ser Ser Ile Arg Glu Gly Asp Glu
 50 55 60

Phe Thr Leu Ser Met Pro His Val Tyr Arg Ile Lys Leu Leu Asn Ser
 65 70 75 80
 Ser Gln Thr Ala Thr Ile Ser Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Phe Lys
 85 90 95
 Cys Tyr Val Ser Gln Gln Ala Ala Tyr Leu Tyr Glu Asn Thr Thr Phe
 100 105 110
 Thr Cys Thr Ala Gln Asn Asp Leu Ser Ser Tyr Asn Thr Ile Asp Gly
 115 120 125
 Ser Ile Thr Phe Ser Leu Asn Phe Ser Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Glu
 130 135 140
 Tyr Glu Leu Glu Asn Ala Lys Phe Phe Lys Ser Gly Pro Met Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Leu Gly Asn Gln Met Ser Asp Val Val Asn Phe Asp Pro Ala Ala
 165 170 175
 Phe Thr Glu Asn Val Phe His Ser Gly Arg Ser Thr Gly Tyr Gly Ser
 180 185 190
 Phe Glu Ser Tyr His Leu Gly Met Tyr Cys Pro Asn Gly Tyr Phe Leu
 195 200 205
 Gly Gly Thr Glu Lys Ile Asp Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Asn Val Asp
 210 215 220
 Leu Asp Cys Ser Ser Val Gln Val Tyr Ser Ser Asn Asp Phe Asn Asp
 225 230 235 240
 Trp Trp Phe Pro Gln Ser Tyr Asn Asp Thr Asn Ala Asp Val Thr Cys
 245 250 255
 Phe Gly Ser Asn Leu Trp Ile Thr Leu Asp Glu Lys Leu Tyr Asp Gly
 260 265 270
 Glu Met Leu Trp Val Asn Ala Leu Gln Ser Leu Pro Ala Asn Val Asn
 275 280 285
 Thr Ile Asp His Ala Leu Glu Phe Gln Tyr Thr Cys Leu Asp Thr Ile
 290 295 300

10

20

30

40

Ala Asn Thr Thr Tyr Ala Thr Gln Phe Ser Thr Thr Arg Glu Phe Ile
 305 310 315 320
 Val Tyr Gln Gly Arg Asn Leu Gly Thr Ala Ser Ala Lys Ser Ser Phe
 325 330 335
 Ile Ser Thr Thr Thr Thr Asp Leu Thr Ser Ile Asn Thr Ser Ala Tyr
 340 345 350
 Ser Thr Gly Ser Ile Ser Thr Val Glu Thr Gly Asn Arg Thr Thr Ser
 355 360 365
 Glu Val Ile Ser His Val Val Thr Thr Ser Thr Lys Leu Ser Pro Thr
 370 375 380
 Ala Thr Thr Ser Leu Thr Ile Ala Gln Thr Ser Ile Tyr Ser Thr Asp
 385 390 395 400
 Ser Asn Ile Thr Val Gly Thr Asp Ile His Thr Thr Ser Glu Val Ile
 405 410 415
 Ser Asp Val Glu Thr Ile Ser Arg Glu Thr Ala Ser Thr Val Val Ala
 420 425 430
 Ala Pro Thr Ser Thr Thr Gly Trp Thr Gly Ala Met Asn Thr Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Gln Phe Thr Ser Ser Ser Phe Ala Thr Ile Asn Ser Thr Pro Ile
 450 455 460
 Ile Ser Ser Ser Ala Val Phe Glu Thr Ser Asp Ala Ser Ile Val Asn
 465 470 475 480
 Val His Thr Glu Asn Ile Thr Asn Thr Ala Ala Val Pro Ser Glu Glu
 485 490 495
 Pro Thr Phe Val Asn Ala Thr Arg Asn Ser Leu Asn Ser Phe Cys Ser
 500 505 510
 Ser Lys Gln Pro Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Pro Leu Val
 515 520 525
 Ser Ser Leu Ser Val Ser Lys Thr Leu Leu Ser Thr Ser Phe Thr Pro
 530 535 540

10

20

30

40

Ser Val Pro Thr Ser Asn Thr Tyr Ile Lys Thr Glu Asn Thr Gly Tyr
545 550 555 560

Phe Glu His Thr Ala Leu Thr Thr Ser Ser Val Gly Leu Asn Ser Phe
565 570 575

Ser Glu Thr Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Ile Asp Thr Phe Leu
580 585 590

Val Ser Ser Leu Ile Ala Tyr Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Gln Leu
595 600 605

Ser Gly Ile Gln Gln Asn Phe Thr Ser Thr Ser Leu Met Ile Ser Thr
610 615 620

Tyr Glu Gly Lys Ala Ser Ile Phe Phe Ser Ala Glu Leu Gly Ser Ile
625 630 635 640

Ile Phe Leu Leu Leu Ser Tyr Leu Leu Phe
645 650

配列番号：3

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーlipol

配列：

GGGGCGGCCG AGGTCTCGCA AGATCTGGA

29

配列番号：4

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分非コーディング鎖リパーゼ

配列：

TTTGTCCAGG TCTTGCGAGA CCTCTCGACG AAT

33

配列番号：5

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分コーディング鎖リパーゼ

配列：

10

20

30

40

50

TTCGGGTAA TTGGGACATG TCTTTAGTGC GA

32

配列番号：6

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーlipo2

配列：

CCCCAAGCTT AAGGCTAGCA AGACATGTCC CAATTAACCC 40

10

配列番号：7

配列の長さ：894

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Humicola lanuginosa

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：72..884

他の情報：／生成物＝“リパーゼ”

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：72..881

他の情報：／生成物＝“リパーゼ”

配列：

GAATTCGTAG CGACGATATG AGGAGCTCCC TTGTGCTGTT CTTTGTCTCT GCGTGGACGG 60

30

CCTTGGCCAC G GCC GAG GTC TCG CAA GAT CTG TTT AAC CAG TTC AAT CTC 110

Ala Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu

1

5

10

TTT GCA CAG TAT TCT GCT GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT GAT GCC 158

Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala

15

20

25

CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC GAG GTA	206	
Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val		
30 35 40 45		
GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT GGA GTG	254	
Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val		
50 55 60		
GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTA GAC AAC ACG AAC AAA TTG ATC	302	10
Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile		
65 70 75		
GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAA AAC TGG ATC GGA AAT	350	
Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn		
80 85 90		
CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC TGC AGG	398	20
Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg		
95 100 105		
GGA CAT GAC GGC TTC ACC TCG AGC TGG AGG TCT GTA GCC GAT ACG TTA	446	
Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu		
110 115 120 125		
AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT CGC GTG	494	
Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val		
130 135 140		
GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT GCC GGA	542	30
Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly		
145 150 155		
GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAC ATC GAC GTG TTT TCA TAT GGC	590	
Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly		
160 165 170		
GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC GTA CAG	638	40
Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln		
175 180 185		
ACC GGC GGT ACC CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT GTC CCT	686	
Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro		
190 195 200 205		

AGA CTC CCG CCG CGC GAG TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA GAG TAC	734
Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr	
210 215 220	

TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAC ATC GTG	782
Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val	
225 230 235	

AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT AAC ATT	830
Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile	
240 245 250	

10

CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG ACA TGT	878
Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys	
255 260 265	

CTT TAGTGCGAAG CTT	894
Leu	
270	

20

配列番号：8

配列の長さ：270

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Ala Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln
1 5 10 15

Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly	30
20 25 30	

Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala
35 40 45

Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val
50 55 60

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

Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe
85 90 95

Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp
100 105 110

Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys
115 120 125

Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr
130 135 140

Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu
145 150 155 160

Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg
165 170 175

Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly
180 185 190

Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro
195 200 205

Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys
210 215 220

Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu
225 230 235 240

Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile
245 250 255

Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265 270

配列番号：9

配列の長さ：55

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマー

配列：

ATCCCTGCGC ACCTATGGTA CTTGGGGTTA ATTGGGACAT GTCTTGCTAG CCTTA 55

10

20

30

40

50

配列番号：10

配列の長さ：59

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマー

配列：

AGCTTAAGGC TAGCAAGACA TGTCCCAATT AACCCGAAGT ACCATAGGTG CGCAGGGAT 59 10

配列番号：11

配列の長さ：1828

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Geotrichum candidum

株名：CMICC 335426

配列の特徴

20

特徴を表す記号：CDS

存在位置：40..1731

他の情報：／生成物＝“ リパーゼ ”

配列の特徴

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：40..96

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：97..1728

他の情報：／生成物＝“ リパーゼ ”／遺伝子＝“ lipB ”

30

配列：

AATTCGGCAC GAGATTCCTT TGATTGCAA CTGTTAATC ATG GTT TCC AAA AGC	54	
Met Val Ser Lys Ser		
-19 -15		
TTT TTT TTG GCT GCG GCG CTC AAC GTA GTG GGC ACC TTG GCC CAG GCC	102	
Phe Phe Leu Ala Ala Ala Leu Asn Val Val Gly Thr Leu Ala Gln Ala		
-10 -5 1		
CCC ACG GCC GTT CTT AAT GGC AAC GAG GTC ATC TCT GGT GTC CTT GAG	150	
Pro Thr Ala Val Leu Asn Gly Asn Glu Val Ile Ser Gly Val Leu Glu		10
5 10 15		
GGC AAG GTT GAT ACC TTC AAG GGA ATC CCA TTT GCT GAC CCT CCT GTT	198	
Gly Lys Val Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Asp Pro Pro Val		
20 25 30		
GGT GAC TTG CGG TTC AAG CAC CCC CAG CCT TTC ACT GGA TCC TAC CAG	246	
Gly Asp Leu Arg Phe Lys His Pro Gln Pro Phe Thr Gly Ser Tyr Gln		
35 40 45 50		20
GGT CTT AAG GCC AAC GAC TTC AGC TCT GCT TGT ATG CAG CTT GAT CCT	294	
Gly Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ser Ser Ala Cys Met Gln Leu Asp Pro		
55 60 65		

GGC AAT GCC TTT TCT TTG CTT GAC AAA GTA GTG GGC TTG GGA AAG ATT	342	
Gly Asn Ala Phe Ser Leu Leu Asp Lys Val Val Gly Leu Gly Lys Ile		
70 75 80		
CTT CCT GAT AAC CTT AGA GGC CCT CTT TAT GAC ATG GCC CAG GGT AGT	390	
Leu Pro Asp Asn Leu Arg Gly Pro Leu Tyr Asp Met Ala Gln Gly Ser		
85 90 95		
GTC TCC ATG AAT GAG GAC TGT CTC TAC CTT AAC GTT TTC CGC CCC GCT	438	
Val Ser Met Asn Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Phe Arg Pro Ala		10
100 105 110		
GGC ACC AAG CCT GAT GCT AAG CTC CCC GTC ATG GTT TGG ATT TAC GGT	486	
Gly Thr Lys Pro Asp Ala Lys Leu Pro Val Met Val Trp Ile Tyr Gly		
115 120 125 130		
GGT GCC TTT GTG TTT GGT TCT TCT GCT TCT TAC CCT GGT AAC GGC TAC	534	
Gly Ala Phe Val Phe Gly Ser Ser Ala Ser Tyr Pro Gly Asn Gly Tyr		
135 140 145		20
GTC AAG GAG AGT GTG GAA ATG GGC CAG CCT GTT GTG TTT GTT TCC ATC	582	
Val Lys Glu Ser Val Glu Met Gly Gln Pro Val Val Phe Val Ser Ile		
150 155 160		
AAC TAC CGT ACC GGC CCC TAT GGA TTC TTG GGT GGT GAT GCC ATC ACC	630	
Asn Tyr Arg Thr Gly Pro Tyr Gly Phe Leu Gly Gly Asp Ala Ile Thr		
165 170 175		
GCT GAG GGC AAC ACC AAC GCT GGT CTG CAC GAC CAG CGC AAG GGT CTC	678	
Ala Glu Gly Asn Thr Asn Ala Gly Leu His Asp Gln Arg Lys Gly Leu		30
180 185 190		
GAG TGG GTT AGC GAC AAC ATT GCC AAC TTT GGT GGT GAT CCC GAC AAG	726	
Glu Trp Val Ser Asp Asn Ile Ala Asn Phe Gly Gly Asp Pro Asp Lys		
195 200 205 210		
GTC ATG ATT TTC GGT GAG TCC GCT GGT GCC ATG AGT GTT GCT CAC CAG	774	
Val Met Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Met Ser Val Ala His Gln		
215 220 225		40
CTT GTT GCC TAC GGT GGT GAC AAC ACC TAC AAC GGA AAG CAG CTT TTC	822	
Leu Val Ala Tyr Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Asn Gly Lys Gln Leu Phe		
230 235 240		

CAC TCT GCC ATT CTT CAG TCT GGC GGT CCT CTT CCT TAC TTT GAC TCT	870	
His Ser Ala Ile Leu Gln Ser Gly Gly Pro Leu Pro Tyr Phe Asp Ser		
245 250 255		
ACT TCT GTT GGT CCC GAG AGT GCC TAC AGC AGA TTT GCT CAG TAT GCC	918	
Thr Ser Val Gly Pro Glu Ser Ala Tyr Ser Arg Phe Ala Gln Tyr Ala		
260 265 270		
GGA TGT GAC ACC AGT GCC AGT GAT AAT GAC ACT CTG GCT TGT CTC CGC	966	
Gly Cys Asp Thr Ser Ala Ser Asp Asn Asp Thr Leu Ala Cys Leu Arg		10
275 280 285 290		
AGC AAG TCC AGC GAT GTC TTG CAC AGT GCG CAG AAC TCG TAT GAT CTT	1014	
Ser Lys Ser Ser Asp Val Leu His Ser Ala Gln Asn Ser Tyr Asp Leu		
295 300 305		
AAG GAC CTG TTT GGT CTG CTC CCT CAA TTC CTT GGA TTT GGT CCC AGA	1062	
Lys Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Gln Phe Leu Gly Phe Gly Pro Arg		
310 315 320		20
CCC GAC GGC AAC ATT ATT CCC GAT GCC GCT TAT GAG CTC TAC CGC AGC	1110	
Pro Asp Gly Asn Ile Ile Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Leu Tyr Arg Ser		
325 330 335		
GGT AGA TAC GCC AAG GTT CCC TAC ATT ACT GGC AAC CAG GAG GAT GAG	1158	
Gly Arg Tyr Ala Lys Val Pro Tyr Ile Thr Gly Asn Gln Glu Asp Glu		
340 345 350		
GGT ACT ATT CTT GCC CCC GTT GCT ATT AAT GCT ACC ACT ACT CCC CAT	1206	30
Gly Thr Ile Leu Ala Pro Val Ala Ile Asn Ala Thr Thr Thr Pro His		
355 360 365 370		
GTT AAG AAG TGG TTG AAG TAC ATT TGT AGC CAG GCT TCT GAC GCT TCG	1254	
Val Lys Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Cys Ser Gln Ala Ser Asp Ala Ser		
375 380 385		
CTT GAT CGT GTT TTG TCG CTC TAC CCC GGC TCT TGG TCG GAG GGT TCA	1302	
Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser Trp Ser Glu Gly Ser		
390 395 400		40
CCA TTC CGC ACT GGT ATT CTT AAT GCT CTT ACC CCT CAG TTC AAG CGC	1350	
Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro Gln Phe Lys Arg		
405 410 415		

ATT GCT GCC ATT TTC ACT GAT TTG CTG TTC CAG TCT CCT CGT CGT GTT 1398
 Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln Ser Pro Arg Arg Val
 420 425 430

ATG CTT AAC GCT ACC AAG GAC GTC AAC CGC TGG ACT TAC CTT GCC ACC 1446
 Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp Thr Tyr Leu Ala Thr
 435 440 445 450

CAG CTC CAT AAC CTC GTT CCA TTT TTG GGT ACT TTC CAT GGC AGT GAT 1494
 Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr Phe His Gly Ser Asp
 455 460 465

10

CTT CTT TTT CAA TAC TAC GTG GAC CTT GGC CCA TCT TCT GCT TAC CGC 1542
 Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro Ser Ser Ala Tyr Arg
 470 475 480

CGC TAC TTT ATC TCG TTT GCC AAC CAC CAC GAC CCC AAC GTT GGT ACC 1590
 Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp Pro Asn Val Gly Thr
 485 490 495

20

AAC CTC CAA CAG TGG GAT ATG TAC ACT GAT GCA GGC AAG GAG ATG CTT 1638
 Asn Leu Gln Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ala Gly Lys Glu Met Leu
 500 505 510

CAG ATT CAT ATG ATT GGT AAC TCT ATG AGA ACT GAC GAC TTT AGA ATC 1686
 Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr Asp Asp Phe Arg Ile
 515 520 525 530

GAG GGA ATC TCG AAC TTT GAG TCT GAC GTT ACT CTC TTC GGT TAATCCCATT 1738
 Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Ser Asp Val Thr Leu Phe Gly
 535 540 545

30

TAGCAAGTTT TGTGTATTTT AAGTATACCA GTTGATGTAA TATATCAATA GATTACAAAT 1798

TAATTAGTGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAC 1828

配列番号：12

配列の長さ：563

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

40

Met Val Ser Lys Ser Phe Phe Leu Ala Ala Ala Leu Asn Val Val Gly
 -19 -15 -10 -5

Thr Leu Ala Gln Ala Pro Thr Ala Val Leu Asn Gly Asn Glu Val Ile
 1 5 10

Ser Gly Val Leu Glu Gly Lys Val Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe
 15 20 25

Ala Asp Pro Pro Val Gly Asp Leu Arg Phe Lys His Pro Gln Pro Phe
 30 35 40 45

Thr Gly Ser Tyr Gln Gly Leu Lys Ala Asn Asp Phe Ser Ser Ala Cys
 50 55 60

Met Gln Leu Asp Pro Gly Asn Ala Phe Ser Leu Leu Asp Lys Val Val
 65 70 75

Gly Leu Gly Lys Ile Leu Pro Asp Asn Leu Arg Gly Pro Leu Tyr Asp
 80 85 90

Met Ala Gln Gly Ser Val Ser Met Asn Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn
 95 100 105

Val Phe Arg Pro Ala Gly Thr Lys Pro Asp Ala Lys Leu Pro Val Met
 110 115 120 125

Val Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Val Phe Gly Ser Ser Ala Ser Tyr
 130 135 140

Pro Gly Asn Gly Tyr Val Lys Glu Ser Val Glu Met Gly Gln Pro Val
 145 150 155

Val Phe Val Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Pro Tyr Gly Phe Leu Gly
 160 165 170

Gly Asp Ala Ile Thr Ala Glu Gly Asn Thr Asn Ala Gly Leu His Asp
 175 180 185

Gln Arg Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Asp Asn Ile Ala Asn Phe Gly
 190 195 200 205

10

20

30

40

Gly Asp Pro Asp Lys Val Met Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Met
 210 215 220

Ser Val Ala His Gln Leu Val Ala Tyr Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Asn
 225 230 235

Gly Lys Gln Leu Phe His Ser Ala Ile Leu Gln Ser Gly Gly Pro Leu
 240 245 250

Pro Tyr Phe Asp Ser Thr Ser Val Gly Pro Glu Ser Ala Tyr Ser Arg
 255 260 265

Phe Ala Gln Tyr Ala Gly Cys Asp Thr Ser Ala Ser Asp Asn Asp Thr
 270 275 280 285

Leu Ala Cys Leu Arg Ser Lys Ser Ser Asp Val Leu His Ser Ala Gln
 290 295 300

Asn Ser Tyr Asp Leu Lys Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Gln Phe Leu
 305 310 315

Gly Phe Gly Pro Arg Pro Asp Gly Asn Ile Ile Pro Asp Ala Ala Tyr
 320 325 330

Glu Leu Tyr Arg Ser Gly Arg Tyr Ala Lys Val Pro Tyr Ile Thr Gly
 335 340 345

Asn Gln Glu Asp Glu Gly Thr Ile Leu Ala Pro Val Ala Ile Asn Ala
 350 355 360 365

Thr Thr Thr Pro His Val Lys Lys Trp Leu Lys Tyr Ile Cys Ser Gln
 370 375 380

Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Arg Val Leu Ser Leu Tyr Pro Gly Ser
 385 390 395

Trp Ser Glu Gly Ser Pro Phe Arg Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr
 400 405 410

Pro Gln Phe Lys Arg Ile Ala Ala Ile Phe Thr Asp Leu Leu Phe Gln
 415 420 425

Ser Pro Arg Arg Val Met Leu Asn Ala Thr Lys Asp Val Asn Arg Trp
 430 435 440 445

10

20

30

40

Thr Tyr Leu Ala Thr Gln Leu His Asn Leu Val Pro Phe Leu Gly Thr
450 455 460

Phe His Gly Ser Asp Leu Leu Phe Gln Tyr Tyr Val Asp Leu Gly Pro
465 470 475

Ser Ser Ala Tyr Arg Arg Tyr Phe Ile Ser Phe Ala Asn His His Asp
480 485 490

Pro Asn Val Gly Thr Asn Leu Gln Gln Trp Asp Met Tyr Thr Asp Ala
495 500 505

Gly Lys Glu Met Leu Gln Ile His Met Ile Gly Asn Ser Met Arg Thr
510 515 520 525

Asp Asp Phe Arg Ile Glu Gly Ile Ser Asn Phe Glu Ser Asp Val Thr
530 535 540

Leu Phe Gly

配列番号：13

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマー-lipo3

配列：

GGGGCGGCCG CGCAGGCCCC AAGGCGGTCT CTCAAT 36

配列番号：14

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分非コーディング鎖リパーゼII

配列：

ATTGAGAGAC CGCCGTGGGG CCTGGGCCAG 30

配列番号：15

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分コーディング鎖リパーゼII

配列：

CAAACTTTGA GACTGACGTT AATCTCTACG GTTAAAC 38

10

20

30

40

50

配列番号：16

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーlipo4

配列：

CCCCGCTAGC ACCGTAGAGA TTAACGTCAG TC

32

10

配列番号：17

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーlipo5

配列：

CCCGCGGCCG CGAGCATTGA TGGTGGTATC

30

20

配列番号：18

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分非コーディング鎖リパーゼ

配列：

GATACCACGA TCAATGCT

18

30

配列番号：19

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分コーディング鎖リパーゼ

配列：

AACACAGGCC TCTGTACT

18

40

配列番号：20

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーlipo6

配列：

CCGCGCTAGC AGTACAGAGG CCTGTGTT

28

50

配列番号：21

配列の長さ：2685

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Saccharomyces cerevisiae(サッカロミセス・セレビシエ)

直接の起源

クローン名：pYY105

10

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..2685

他の情報：／生成物＝“凝集タンパク質”／遺伝子＝“FL01”

配列：

ATG ACA ATG CCT CAT CGC TAT ATG TTT TTG GCA GTC TTT ACA CTT CTG 48

Met Thr Met Pro His Arg Tyr Met Phe Leu Ala Val Phe Thr Leu Leu

1 5 10 15

GCA CTA ACT AGT GTG GCC TCA GGA GCC ACA GAG GCG TGC TTA CCA GCA 96

Ala Leu Thr Ser Val Ala Ser Gly Ala Thr Glu Ala Cys Leu Pro Ala

20 25 30

20

GGC CAG AGG AAA AGT GGG ATG AAT ATA AAT TTT TAC CAG TAT TCA TTG 144

Gly Gln Arg Lys Ser Gly Met Asn Ile Asn Phe Tyr Gln Tyr Ser Leu

35 40 45

AAA GAT TCC TCC ACA TAT TCG AAT GCA GCA TAT ATG GCT TAT GGA TAT 192

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

50 55 60

30

GCC TCA AAA ACC AAA CTA GGT TCT GTC GGA GGA CAA ACT GAT ATC TCG 240

Ala Ser Lys Thr Lys Leu Gly Ser Val Gly Gly Gln Thr Asp Ile Ser

65 70 75 80

ATT GAT TAT AAT ATT CCC TGT GTT AGT TCA TCA GGC ACA TTT CCT TGT 288

Ile Asp Tyr Asn Ile Pro Cys Val Ser Ser Ser Gly Thr Phe Pro Cys

85 90 95

CCT CAA GAA GAT TCC TAT GGA AAC TGG GGA TGC AAA GGA ATG GGT GCT 336

Pro Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Asn Trp Gly Cys Lys Gly Met Gly Ala

100 105 110

40

TGT TCT AAT AGT CAA GGA ATT GCA TAC TGG AGT ACT GAT TTA TTT GGT 384

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

115 120 125

TTC TAT ACT ACC CCA ACA AAC GTA ACC CTA GAA ATG ACA GGT TAT TTT	432	
Phe Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Val Thr Leu Glu Met Thr Gly Tyr Phe		
130 135 140		
TTA CCA CCA CAG ACG GGT TCT TAC ACA TTC AAG TTT GCT ACA GTT GAC	480	
Leu Pro Pro Gln Thr Gly Ser Tyr Thr Phe Lys Phe Ala Thr Val Asp		
145 150 155 160		
GAC TCT GCA ATT CTA TCA GTA GGT GGT GCA ACC GCG TTC AAC TGT TGT	528	
Asp Ser Ala Ile Leu Ser Val Gly Gly Ala Thr Ala Phe Asn Cys Cys		10
165 170 175		
GCT CAA CAG CAA CCG CCG ATC ACA TCA ACG AAC TTT ACC ATT GAC GGT	576	
Ala Gln Gln Gln Pro Pro Ile Thr Ser Thr Asn Phe Thr Ile Asp Gly		
180 185 190		
ATC AAG CCA TGG GGT GGA AGT TTG CCA CCT AAT ATC GAA GGA ACC GTC	624	
Ile Lys Pro Trp Gly Gly Ser Leu Pro Pro Asn Ile Glu Gly Thr Val		
195 200 205		20
TAT ATG TAC GCT GGC TAC TAT TAT CCA ATG AAG GTT GTT TAC TCG AAC	672	
Tyr Met Tyr Ala Gly Tyr Tyr Tyr Pro Met Lys Val Val Tyr Ser Asn		
210 215 220		
GCT GTT TCT TGG GGT ACA CTT CCA ATT AGT GTG ACA CTT CCA GAT GGT	720	
Ala Val Ser Trp Gly Thr Leu Pro Ile Ser Val Thr Leu Pro Asp Gly		
225 230 235 240		
ACC ACT GTA AGT GAT GAC TTC GAA GGG TAC GTC TAT TCC TTT GAC GAT	768	
Thr Thr Val Ser Asp Asp Phe Glu Gly Tyr Val Tyr Ser Phe Asp Asp		30
245 250 255		
GAC CTA AGT CAA TCT AAC TGT ACT GTC CCT GAC CCT TCA AAT TAT GCT	816	
Asp Leu Ser Gln Ser Asn Cys Thr Val Pro Asp Pro Ser Asn Tyr Ala		
260 265 270		
GTC AGT ACC ACT ACA ACT ACA ACG GAA CCA TGG ACC GGT ACT TTC ACT	864	
Val Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr		
275 280 285		40
TCT ACA TCT ACT GAA ATG ACC ACC GTC ACC GGT ACC AAC GGC GTT CCA	912	
Ser Thr Ser Thr Glu Met Thr Thr Val Thr Gly Thr Asn Gly Val Pro		
290 295 300		

ACT GAC GAA ACC GTC ATT GTC ATC AGA ACT CCA ACC AGT GAA GGT CTA	960	
Thr Asp Glu Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu		
305 310 315 320		
ATC AGC ACC ACC ACT GAA CCA TGG ACT GGC ACT TTC ACT TCG ACT TCC	1008	
Ile Ser Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser		
325 330 335		
ACT GAG GTT ACC ACC ATC ACT GGA ACC AAC GGT CAA CCA ACT GAC GAA	1056	10
Thr Glu Val Thr Thr Ile Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu		
340 345 350		
ACT GTG ATT GTT ATC AGA ACT CCA ACC AGT GAA GGT CTA ATC AGC ACC	1104	
Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Ile Ser Thr		
355 360 365		
ACC ACT GAA CCA TGG ACT GGT ACT TTC ACT TCT ACA TCT ACT GAA ATG	1152	
Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met		
370 375 380		20
ACC ACC GTC ACC GGT ACT AAC GGT CAA CCA ACT GAC GAA ACC GTG ATT	1200	
Thr Thr Val Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu Thr Val Ile		
385 390 395 400		
GTT ATC AGA ACT CCA ACC AGT GAA GGT TTG GTT ACA ACC ACC ACT GAA	1248	
Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Val Thr Thr Thr Thr Glu		
405 410 415		
CCA TGG ACT GGT ACT TTT ACT TCG ACT TCC ACT GAA ATG TCT ACT GTC	1296	30
Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met Ser Thr Val		
420 425 430		
ACT GGA ACC AAT GGC TTG CCA ACT GAT GAA ACT GTC ATT GTT GTC AAA	1344	
Thr Gly Thr Asn Gly Leu Pro Thr Asp Glu Thr Val Ile Val Val Lys		
435 440 445		
ACT CCA ACT ACT GCC ATC TCA TCC AGT TTG TCA TCA TCA TCT TCA GGA	1392	
Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly		
450 455 460		40
CAA ATC ACC AGC TCT ATC ACG TCT TCG CGT CCA ATT ATT ACC CCA TTC	1440	
Gln Ile Thr Ser Ser Ile Thr Ser Ser Arg Pro Ile Ile Thr Pro Phe		
465 470 475 480		

TAT CCT AGC AAT GGA ACT TCT GTG ATT TCT TCC TCA GTA ATT TCT TCC	1488	
Tyr Pro Ser Asn Gly Thr Ser Val Ile Ser Ser Ser Val Ile Ser Ser		
485 490 495		
TCA GTC ACT TCT TCT CTA TTC ACT TCT TCT CCA GTC ATT TCT TCC TCA	1536	
Ser Val Thr Ser Ser Leu Phe Thr Ser Ser Pro Val Ile Ser Ser Ser		
500 505 510		
GTC ATT TCT TCT TCT ACA ACA ACC TCC ACT TCT ATA TTT TCT GAA TCA	1584	10
Val Ile Ser Ser Ser Thr Thr Thr Ser Thr Ser Ile Phe Ser Glu Ser		
515 520 525		
TCT AAA TCA TCC GTC ATT CCA ACC AGT AGT TCC ACC TCT GGT TCT TCT	1632	
Ser Lys Ser Ser Val Ile Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ser Ser		
530 535 540		
GAG AGC GAA ACG AGT TCA GCT GGT TCT GTC TCT TCT TCC TCT TTT ATC	1680	
Glu Ser Glu Thr Ser Ser Ala Gly Ser Val Ser Ser Ser Ser Phe Ile		
545 550 555 560		20
TCT TCT GAA TCA TCA AAA TCT CCT ACA TAT TCT TCT TCA TCA TTA CCA	1728	
Ser Ser Glu Ser Ser Lys Ser Pro Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Leu Pro		
565 570 575		
CTT GTT ACC AGT GCG ACA ACA AGC CAG GAA ACT GCT TCT TCA TTA CCA	1776	
Leu Val Thr Ser Ala Thr Thr Ser Gln Glu Thr Ala Ser Ser Leu Pro		
580 585 590		
CCT GCT ACC ACT ACA AAA ACG AGC GAA CAA ACC ACT TTG GTT ACC GTG	1824	30
Pro Ala Thr Thr Thr Lys Thr Ser Glu Gln Thr Thr Leu Val Thr Val		
595 600 605		
ACA TCC TGC GAG TCT CAT GTG TGC ACT GAA TCC ATC TCC CCT GCG ATT	1872	
Thr Ser Cys Glu Ser His Val Cys Thr Glu Ser Ile Ser Pro Ala Ile		
610 615 620		
GTT TCC ACA GCT ACT GTT ACT GTT AGC GGC GTC ACA ACA GAG TAT ACC	1920	
Val Ser Thr Ala Thr Val Thr Val Ser Gly Val Thr Thr Glu Tyr Thr		
625 630 635 640		40
ACA TGG TGC CCT ATT TCT ACT ACA GAG ACA ACA AAG CAA ACC AAA GGG	1968	
Thr Trp Cys Pro Ile Ser Thr Thr Glu Thr Thr Lys Gln Thr Lys Gly		
645 650 655		

ACA ACA GAG CAA ACC ACA GAA ACA ACA AAA CAA ACC ACG GTA GTT ACA Thr Thr Glu Gln Thr Thr Glu Thr Thr Lys Gln Thr Thr Val Val Thr 660 665 670	2016	
ATT TCT TCT TGT GAA TCT GAC GTA TGC TCT AAG ACT GCT TCT CCA GCC Ile Ser Ser Cys Glu Ser Asp Val Cys Ser Lys Thr Ala Ser Pro Ala 675 680 685	2064	
ATT GTA TCT ACA AGC ACT GCT ACT ATT AAC GGC GTT ACT ACA GAA TAC Ile Val Ser Thr Ser Thr Ala Thr Ile Asn Gly Val Thr Thr Glu Tyr 690 695 700	2112	10
ACA ACA TGG TGT CCT ATT TCC ACC ACA GAA TCG AGG CAA CAA ACA ACG Thr Thr Trp Cys Pro Ile Ser Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Thr Thr 705 710 715 720	2160	
CTA GTT ACT GTT ACT TCC TGC GAA TCT GGT GTG TGT TCC GAA ACT GCT Leu Val Thr Val Thr Ser Cys Glu Ser Gly Val Cys Ser Glu Thr Ala 725 730 735	2208	20
TCA CCT GCC ATT GTT TCG ACG GCC ACG GCT ACT GTG AAT GAT GTT GTT Ser Pro Ala Ile Val Ser Thr Ala Thr Ala Thr Val Asn Asp Val Val 740 745 750	2256	
ACG GTC TAT CCT ACA TGG AGG CCA CAG ACT GCG AAT GAA GAG TCT GTC Thr Val Tyr Pro Thr Trp Arg Pro Gln Thr Ala Asn Glu Glu Ser Val 755 760 765	2304	
AGC TCT AAA ATG AAC AGT GCT ACC GGT GAG ACA ACA ACC AAT ACT TTA Ser Ser Lys Met Asn Ser Ala Thr Gly Glu Thr Thr Thr Asn Thr Leu 770 775 780	2352	30
GCT GCT GAA ACG ACT ACC AAT ACT GTA GCT GCT GAG ACG ATT ACC AAT Ala Ala Glu Thr Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Glu Thr Ile Thr Asn 785 790 795 800	2400	
ACT GGA GCT GCT GAG ACG AAA ACA GTA GTC ACC TCT TCG CTT TCA AGA Thr Gly Ala Ala Glu Thr Lys Thr Val Val Thr Ser Ser Leu Ser Arg 805 810 815	2448	40
TCT AAT CAC GCT GAA ACA CAG ACG GCT TCC GCG ACC GAT GTG ATT GGT Ser Asn His Ala Glu Thr Gln Thr Ala Ser Ala Thr Asp Val Ile Gly 820 825 830	2496	

CAC AGC AGT AGT GTT GTT TCT GTA TCC GAA ACT GGC AAC ACC AAG AGT 2544
 His Ser Ser Ser Val Val Ser Val Ser Glu Thr Gly Asn Thr Lys Ser
 835 840 845

CTA ACA AGT TCC GGG TTG AGT ACT ATG TCG CAA CAG CCT CGT AGC ACA 2592
 Leu Thr Ser Ser Gly Leu Ser Thr Met Ser Gln Gln Pro Arg Ser Thr
 850 855 860

CCA GCA AGC AGC ATG GTA GGA TAT AGT ACA GCT TCT TTA GAA ATT TCA 2640 10
 Pro Ala Ser Ser Met Val Gly Tyr Ser Thr Ala Ser Leu Glu Ile Ser
 865 870 875 880

ACG TAT GCT GGC AGT GCA ACA GCT TAC TGG CCG GTA GTG GTT TAA 2686
 Thr Tyr Ala Gly Ser Ala Thr Ala Tyr Trp Pro Val Val Val
 885 890 895

配列番号：22

配列の長さ：894

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Thr Met Pro His Arg Tyr Met Phe Leu Ala Val Phe Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Thr Ser Val Ala Ser Gly Ala Thr Glu Ala Cys Leu Pro Ala
 20 25 30

Gly Gln Arg Lys Ser Gly Met Asn Ile Asn Phe Tyr Gln Tyr Ser Leu 30
 35 40 45

Lys Asp Ser Ser Thr Tyr Ser Asn Ala Ala Tyr Met Ala Tyr Gly Tyr
 50 55 60

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

Ile Asp Tyr Asn Ile Pro Cys Val Ser Ser Ser Gly Thr Phe Pro Cys 40
 85 90 95

Pro Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Asn Trp Gly Cys Lys Gly Met Gly Ala
 100 105 110

Cys Ser Asn Ser Gln Gly Ile Ala Tyr Trp Ser Thr Asp Leu Phe Gly
 115 120 125

Phe Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Val Thr Leu Glu Met Thr Gly Tyr Phe
 130 135 140

Leu Pro Pro Gln Thr Gly Ser Tyr Thr Phe Lys Phe Ala Thr Val Asp
 145 150 155 160

Asp Ser Ala Ile Leu Ser Val Gly Gly Ala Thr Ala Phe Asn Cys Cys
 165 170 175

Ala Gln Gln Gln Pro Pro Ile Thr Ser Thr Asn Phe Thr Ile Asp Gly
 180 185 190

Ile Lys Pro Trp Gly Gly Ser Leu Pro Pro Asn Ile Glu Gly Thr Val
 195 200 205

Tyr Met Tyr Ala Gly Tyr Tyr Tyr Pro Met Lys Val Val Tyr Ser Asn
 210 215 220

Ala Val Ser Trp Gly Thr Leu Pro Ile Ser Val Thr Leu Pro Asp Gly
 225 230 235 240

Thr Thr Val Ser Asp Asp Phe Glu Gly Tyr Val Tyr Ser Phe Asp Asp
 245 250 255

Asp Leu Ser Gln Ser Asn Cys Thr Val Pro Asp Pro Ser Asn Tyr Ala
 260 265 270

Val Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr
 275 280 285

Ser Thr Ser Thr Glu Met Thr Thr Val Thr Gly Thr Asn Gly Val Pro
 290 295 300

Thr Asp Glu Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu
 305 310 315 320

Ile Ser Thr Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser
 325 330 335

Thr Glu Val Thr Thr Ile Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu
 340 345 350
 Thr Val Ile Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Ile Ser Thr
 355 360 365
 Thr Thr Glu Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met
 370 375 380
 Thr Thr Val Thr Gly Thr Asn Gly Gln Pro Thr Asp Glu Thr Val Ile
 385 390 395 400
 Val Ile Arg Thr Pro Thr Ser Glu Gly Leu Val Thr Thr Thr Thr Glu
 405 410 415
 Pro Trp Thr Gly Thr Phe Thr Ser Thr Ser Thr Glu Met Ser Thr Val
 420 425 430
 Thr Gly Thr Asn Gly Leu Pro Thr Asp Glu Thr Val Ile Val Val Lys
 435 440 445
 Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Gly
 450 455 460
 Gln Ile Thr Ser Ser Ile Thr Ser Ser Arg Pro Ile Ile Thr Pro Phe
 465 470 475 480
 Tyr Pro Ser Asn Gly Thr Ser Val Ile Ser Ser Ser Val Ile Ser Ser
 485 490 495
 Ser Val Thr Ser Ser Leu Phe Thr Ser Ser Pro Val Ile Ser Ser Ser
 500 505 510
 Val Ile Ser Ser Ser Thr Thr Thr Ser Thr Ser Ile Phe Ser Glu Ser
 515 520 525
 Ser Lys Ser Ser Val Ile Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ser Ser
 530 535 540
 Glu Ser Glu Thr Ser Ser Ala Gly Ser Val Ser Ser Ser Ser Phe Ile
 545 550 555 560
 Ser Ser Glu Ser Ser Lys Ser Pro Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Leu Pro
 565 570 575

10

20

30

40

Leu Val Thr Ser Ala Thr Thr Ser Gln Glu Thr Ala Ser Ser Leu Pro
580 585 590

Pro Ala Thr Thr Thr Lys Thr Ser Glu Gln Thr Thr Leu Val Thr Val
595 600 605

Thr Ser Cys Glu Ser His Val Cys Thr Glu Ser Ile Ser Pro Ala Ile
610 615 620

Val Ser Thr Ala Thr Val Thr Val Ser Gly Val Thr Thr Glu Tyr Thr
625 630 635 640

Thr Trp Cys Pro Ile Ser Thr Thr Glu Thr Thr Lys Gln Thr Lys Gly
645 650 655

Thr Thr Glu Gln Thr Thr Glu Thr Thr Lys Gln Thr Thr Val Val Thr
660 665 670

Ile Ser Ser Cys Glu Ser Asp Val Cys Ser Lys Thr Ala Ser Pro Ala
675 680 685

Ile Val Ser Thr Ser Thr Ala Thr Ile Asn Gly Val Thr Thr Glu Tyr
690 695 700

Thr Thr Trp Cys Pro Ile Ser Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Thr Thr
705 710 715 720

Leu Val Thr Val Thr Ser Cys Glu Ser Gly Val Cys Ser Glu Thr Ala
725 730 735

Ser Pro Ala Ile Val Ser Thr Ala Thr Ala Thr Val Asn Asp Val Val
740 745 750

Thr Val Tyr Pro Thr Trp Arg Pro Gln Thr Ala Asn Glu Glu Ser Val
755 760 765

Ser Ser Lys Met Asn Ser Ala Thr Gly Glu Thr Thr Thr Asn Thr Leu
770 775 780

Ala Ala Glu Thr Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Glu Thr Ile Thr Asn
785 790 795 800

Thr Gly Ala Ala Glu Thr Lys Thr Val Val Thr Ser Ser Leu Ser Arg
805 810 815

10

20

30

40

Ser Asn His Ala Glu Thr Gln Thr Ala Ser Ala Thr Asp Val Ile Gly
820 825 830

His Ser Ser Ser Val Val Ser Val Ser Glu Thr Gly Asn Thr Lys Ser
835 840 845

Leu Thr Ser Ser Gly Leu Ser Thr Met Ser Gln Gln Pro Arg Ser Thr
850 855 860

Pro Ala Ser Ser Met Val Gly Tyr Ser Thr Ala Ser Leu Glu Ile Ser
865 870 875 880

Thr Tyr Ala Gly Ser Ala Thr Ala Tyr Trp Pro Val Val Val
885 890

配列番号：23

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーpcrflol

配列：

GAATTCGCTA GCAATTATGC TGTCAGTACC

30

配列番号：24

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分非コーディング配列FL01

配列：

AGTGGTACTG ACAGCATAAT TTGA

24

配列番号：25

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：部分コーディング配列FL01

配列：

AATAAAATTC GCGTTCTTTT TACG

24

配列番号：26

配列の長さ：31

配列の型：核酸

10

20

30

40

50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

直接の起源

クローン名：プライマーpcrflo2

配列：

GAGCTCAAGC TTCGTAAAAA GAACGCGAAT T

31

【図 1】
FIGURE 1, 1/4

α -アグロチニンの DNA 配列：

```
1 AAGCTTTAGG TAAGGGAGGC AGGGGGAAAA GATACTGAAA
41 TGACGGAAAA CGAGAATATG GAGCAGGGAG CAACCTTTTAG
81 AGCTTTACCC GTTAAAGGT CAAATCGAGG CTTCTGCCT
121 TTGTCTGATT TTAGTAGTAC CGGAAGGTTT ATTACGCCCA
161 AGAACAGTGC TTGAATTGAG TTCTCGGGAC ACGGAAAAGA
201 CAATGGAAGA AAAATTTACA TTCAGTAGCC TTATATATGA
241 AATGCTGCCA AGCCACGTCT TTATAAGTAG ATAATGTCCC
281 ATGAGCTGAA CTATGGGAAT TTATGACGCA GTTCATTGTA
321 TATATATTAC ATTAACCTCT TAGTTTAAACA TCTGAATTGT
361 TTTATAAAAT AACTTTTTGA ATTTTTTTAT GATCGCTTAG
401 TTAAGTCTAT TATATCAGGT TTTTTCATTG ATCATAATTG
441 TTCGTTAAAT ATGAGTATAT TTAATACAG GAATTAGTAT
481 CATTTCGAGT CACGAAAAGG GCCGTTTCAT AGAGAGTTTT
521 CTTAATAAAG TTGAGGGTTT CCGTGATAGT TTTGAGGGGT
561 TGTTTTGAAT AGATTTCAGC TTACCTTTCA ACTGATTAAAT
601 TTTTTCAGCG GGCTTATCAT AATCATCCAT CATAGCAGTC
641 TTTCTGGACT TCGTCGAGGA CTGGCTTTCT GAATTTTGAC
681 GGTCCCCTATT AGCTCCAGTT GGAGGAATTG AGTTACCTAC
721 AACTGGCAAG AGGTCTTTGT TTGGATTCAA AATAGGACTT
761 TGTGGTAGCA GTTTGGTTTT ATTCAATCTA AAGATATAGG
801 AAACAGGTTT TAAGTAAATC GATACTATTG TACCAATGTT
841 TAGCTCCAAT TCCTCCAAAA CGGTGGGATC TAATTTTGIG
881 TTCATTCTTA TTAGTGGCAA CTCTCCGTCC AGTACTGATT
921 TTAAGATTTC AAAAGTTATC GCGTTTGATA TACGAGACGT
961 TTTCTGTTAAT GACAGCAATC TCCAATACAT CAGTGTTTTA
1001 TCTCTTAAGT CAGGATTATT TTCGTGATCG GTGCATCCTT
1041 TTAATAAATC CATACAAAGT TCTTCAGTTT CCTTTGTAGG
1081 ATTTCTGATG AAGAATTTTA TTGCTGAGTT CAGAATGGAA
1121 AATTGCACTT CTAGCGTCTC ATTAACATG TTTGAGGAAA
1161 AAACCTCTAA TAACCTCCAGG TAGTTTGGAA TTACATCCGA
1201 ATATTGCGTT ATTATCCAGA TCATAGCGTT TTTTGATTCA
1241 GGTTCCTGTA CAACCTCAGT GTGTTTGACT AGTTCGTGTA
1281 CGTTTGTCTT AAAATTTATT GGATATTTCC TCAAAATATT
1321 TCTGAAAACC GAAATTAATCT CCTGGACGAC ATAATCAACA
1361 CCGAATTCTA ACAAATCTAG TAGCACAGCG ACACAAATCGT
1401 GTACAGAGTC TTCATCTAGC TTAACAGCGA GATTACCAAT
1441 GGCTCTGACT GATTTCCCTG ACATTTGAAT ATCAATATCT
1481 GTAGCATATT GTTCCAACTC TTCTAGAATT CTTGGTAATG
1521 TTTCTTGTG AGCTAAAAGA TATAACACT CTAATTTCTG
1561 GTCTTTGATG TATATGGGGT CATGTGACTC GATGAAAAAA
```

FIGURE 1, 2/4

```
1601 TACGAAATGT CTAGCCTGAG TAGAGATGAC TCCCTACTCA
1641 ATAAAAAGAAG AATAACGTTT CTTAATACTA AAAATTGTAA
1681 TTCAGGCGGC TTATCTAACA AACCTATTAC AGAGTTAGAT
1721 AGCTTTTTCGG CTAGAGTTTC TTTGATGACG TCAACATAAT
1761 TCAACAAGTA CATGATGAAT TTTAAAGAGT TCAACACTAC
1801 GTATGTGTTT ACTTGTGCA GGTACGGTAA AGCTAGTTCC
1841 ATCATTTCAT GGGTATCCAA ATAATGCTGC GGCACAACCG
1881 AAGTCGTCAA AACTTCCAAA ACAGTAGCCT TATTTCCACTC
1921 ATTTAATTTCG GGTAAAAGTT CTAGCATGTC AAAAGCGAGT
1961 TCCAAGGGAA TCCTGAAGGT TCCATGTTAG CGTTTTTTTTC
2001 GTGAATGGAA TATAAAGTAT GTAATGCAGC TACAATGACT
2041 TCTGGAGAGC TCGACTGTGC CTTTACAATG TCATGTAGAA
2081 TGCTTGATAA CCCCATAACC CTTTCATGAT CAATTTTCATC
2121 TAAATCCAAC AGTGCGTAAA TTGCTGTCCCT CGTCACTTGT
2161 TCAGGTGGAG ACTTGTGATT TACCAATGAA ATGATACAGT
2201 CGAAGGCCCTG ATCAGATAGC TCITTCACCG GGACTAATAC
2241 CAGAGTTCTT AGTGCCATTA TTTGTAACCT TTCATCTCTG
2281 CTTTTGAAAT CGTCCATTAT AAATGGCAAA GCCTCTCTGG
2321 CCTGCTGAGG TTTTAATGCG CCGATCACCC TAATATACTC
2361 ATGGCAAATT CTTTTCACTT CTAGATCATC TTCATTTGCG
2401 CAAAAATTCA AGAGCTCAGA AAACAGAGG GACATTTTCGC
2441 CATAGTTTCC TAGAACCAAA TTGGCGATAA TTTTCTCAG
2481 AGCATTTTTC CTTCTGTGTA TATTCGATTT AAACCTTTTTT
2521 ACTCCAAAAT GTTGACAGATC TGTGACGATT TCATTGCTTT
2561 TATATCTGGC AAAAAGTTT TGATCGGACA TAAGCGAAAT
2601 AGCTCCTATT AATGAAGTGA ATGTTCTTGC TGTATTCCCT
2641 TCTGTGTCAG TAGATTAATT CTGTTTCCAG GCTGCGATAC
2681 TTTGATACCC AATACTAAAA GTTGATGATT TGAACGATCT
2721 CCTATTTCCT CGCACATTTT TGGAGCGATA CCCGGAAGAC
2761 AGAATCGCGA TGTTAAGAAA ATAGTTCTGA TGGCACTAAA
2801 GAGATCATGA TTAAGGAAAG GTAAGTGATA TGCATGAATG
2841 GGAATAGGCT TTCGAACTTG ACGATTTAGT TCCTTATTTT
2881 TATCCATCTA ATCCTCCAAC TTCATAGGC CTTATCTAGC
2921 TCAGAGCAGT ATTTAATTGA GAATAGTAGC TTAATTGAAA
2961 CCTTACTAAA AAAGTGTATG GTTACATAAG ATAAGCGCTT
3001 AAGAAGAGTA TACATATGCA TTATTCATTA CCAAGACCAC
3041 TATGAATAGT AATACCATAT TTAGCTTTTG AAACCTCATGT
3081 TTTCTATTGT GTTGTTTCAA ATTCCTCTGT TAGGCTCAAT
3121 TTAGGTTAAT TAAATTATAA AAAAATATAA AAAATAAAGA
3161 AAGTTTATCC ATCGGCACCT CAATTCAATG GAGTAAACAG
3201 TTTCAACACT GAGTGGTGAA ACATTGAACA ACTACATGCA
3241 GTTCCCCGCC ACGAGGCAAG TGTAGGTCTT TGTCTCATTT
```

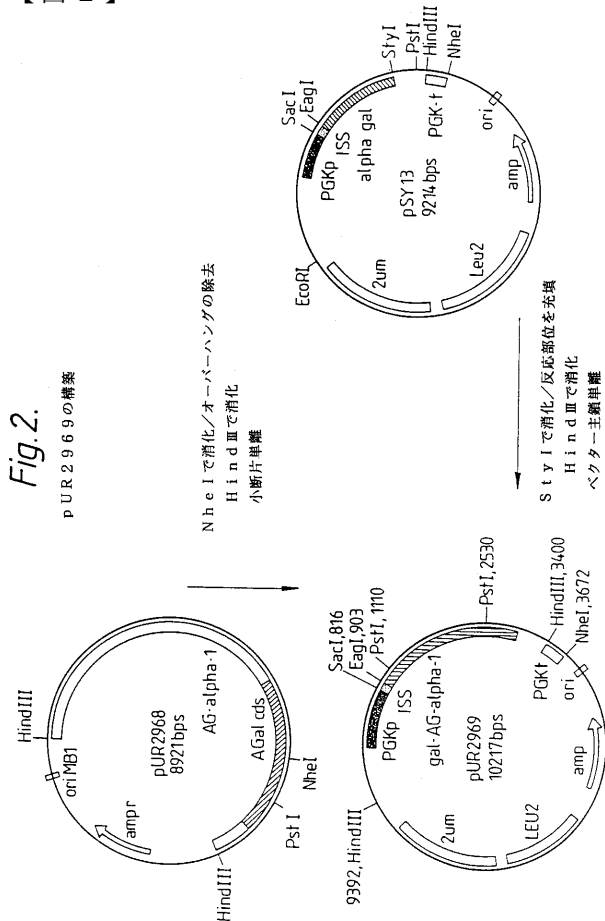
FIGURE 1, 3/4

3281 CGCTTTGTTT TGCAGGTCAT TGATGACCTA ATTAGGAAGG
 3321 TAGAAGCCGC TCCAGCTCAA TAAGGAAATG CTAAGGGTAC
 3361 TCGCCTTTGG TGTTTTACCA TACAATGGCA GCTTTATGTC
 3401 ACTTCATTCT TCAGTAACGG CGCTTAAATA TTCCCAAAAA
 3441 CGTTACAATG GAATTGTTTG ATCATGTAAC GAAATGCAAT
 3481 CTTCATAAAA AAAAGCCATG TGAATCAAAA AAAGATTCCCT
 3521 TTAGCATAC TATAAATATG CAAAATGCCC TCTATTATT
 3561 CTAGTAATCG TCCATTCTCA TATCTTCCTT ATATCAGTCG
 3601 CCTCGCTTAA TATAGTCAGC ACAAAGGAA CAACAATTCG
 3641 CCAGTTTTCA AAATGTTTCA TTTTCTCAA ATTATCTGT
 3681 GGCTTTTTTC CTGGCATTTG GCCTCTGCTA TAAATATCAA
 3721 CGATATCACA TTTTCCAATT TAGAAATTAC TCCACTGACT
 3761 GCAAAATAAC AACCTGATCA AGGTTGGACT GCCACTTTTG
 3801 ATTTTAGTAT TGCAGATGCG TCTTCCATTA GGGAGGGCGA
 3841 TGAATTCACA TTATCAATGC CACATGTTTA TAGGATTAAAG
 3881 CTATTAACAT CATCGCAAC AGCTACTATT TCCTTAGCGG
 3921 ATGGTACTGA GGCCTTCAA TGTCTATGTT CGCAACAGGC
 3961 TGCATACTTG TATGAAAATA CTACTTTCAC ATGTACTGCT
 4001 CAAAATGACC TGTCCTCCTA TAATACGATT GATGGATCCA
 4041 TAACATTTTC GCTAAATTTT AGTGATGGTG GTTCCAGCTA
 4081 TGAATATGAG TTAGAAAACG CTAAGTTTTT CAAATCTGGG
 4121 CCAATGCTTG TTAAACTTGG TAATCAAATG TCAGATGTGG
 4161 TGAATTTTCA TCCTGCTGCT TTACAGAGA ATGTTTTTCA
 4201 CTCTGGGCGT TCAACTGGTT ACGGTTCTTT TGAAAGTTAT
 4241 CATTTGGGTA TGTATTGTCC AAACGGATAT TTCTGGGTG
 4281 GTACTGAGAA GATTGATTAC GACAGTTCCA ATAACAATGT
 4321 CGATTTGGAT TGTCTTTCAG TTCAGGTTTA TTCATCCAAT
 4361 GATTTTAATG ATTGGTGGTT CCCGCAAAGT TACAATGATA
 4401 CCAATGCTGA CGTCACTTGT TTTGGTAGTA ATCTGTGGAT
 4441 TACACTTGAC GAAAAACTAT ATGATGGGGA AATGTTATGG
 4481 GTTAATGCAT TACAATCTCT ACCCGCTAAT GTAAACACAA
 4521 TAGATCATGC GTTAGAATTT CAATACACAT GCCTTGATAC
 4561 CATAGCAAAT ACTACGTACG CTACGCAATT CTCGACTACT
 4601 AGGGAATTTA TTGTTTATCA GGGTCGGAAC CTCGGTACAG
 4641 CTAGCGCCAA AAGCTCTTTT ATCTCAACCA CTACTACTGA
 4681 TTAAACAAGT ATAAACACTA GTGCGTATTC CACTGGATCC
 4721 ATTTCCACAG TAGAACAGG CAATCGAACT ACATCAGAAG
 4761 TGATCAGTCA TGTGGTGAAT ACCAGCACAA AACTGTCTCC
 4801 AACTGCTACT ACCAGCCTGA CAATTGCACA AACCAGTATC
 4841 TATTCTACTG ACTCAAATAT CACAGTAGGA ACAGATATT
 4881 ACACCACATC AGAAGTGATT AGTGATGTGG AAACCATTAG
 4921 CAGAGAAACA GCTTCGACCG TTGTAGCCGC TCCAACCTCA

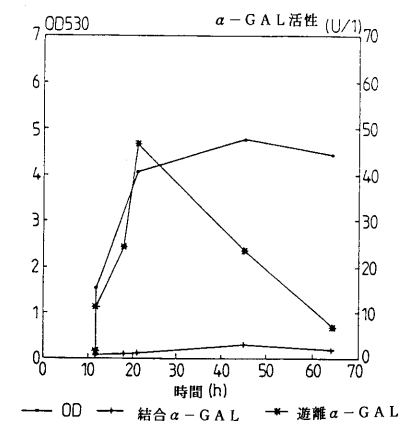
FIGURE 1, 4/4

4961 ACAACTGGAT GGACAGGCGC TATGAATACT TACATCCCCG
 5001 AATTTACATC CTCTTCTTTC GCAACAATCA ACAGCACACC
 5041 AATAATCTCT TCATCAGCAG TATTGAAAC CTCAGATGCT
 5081 TCAATTGTCA ATGTGCACAC TGAAATATC ACGAATACTG
 5121 CTGCTGTTCC ATCTGAAGAG CCCACTTTTG TAAATGCCAC
 5161 GAGAAACTCC TTAAATTCCT TCTGCAGCAG CAAACAGCCA
 5201 TCCAGTCCCT CATCTTATAC GTCTTCCCA CTCGTATCGT
 5241 CCCTCTCCGT AAGCAAAACA TTACTAAGCA CCAGTTTTAC
 5281 GCCTTCTGTG CCAACATCTA ATACATATAT CAAAACGGAA
 5321 AATACGGGTT ACTTTGAGCA CACGGCTTTG ACAACATCTT
 5361 CAGTTGGCCT TAATCTTTT AGTGAACAG CACTCTCATC
 5401 TCAGGGAACG AAAATTGACA CCTTTTAGT GTCATCCTTG
 5441 ATCGCATATC CTCTTCTGCG ATCAGGAAGC CAATTGTCG
 5481 GTATCCAACA GAATTCACA TCAACTTCTC TCATGATTC
 5521 AACCTATGAA GGTAAAGCGT CTATATTTT CTCAGCTGAG
 5561 CTGGGTTCTG TCATTTTCT GCTTTTGTG TACCTGCTAT
 5601 TCTAAAACGG GTACTGTACA GTTAGTACAT TGAGTCGAAA
 5641 TATACGAAAT TATTGTTTAT AATTTTCATC CTGGCTCTTT
 5681 TTTTCTTCAA CCATAGTTAA ATGGACAGT CATATCTTAA
 5721 ACTCTAATAA TACTTTTCTA GTTCTTATCC TTTTCCGTCT
 5761 CACCGCAGAT TTTATCATAG TATTAATTT ATATTTTGTT
 5801 CGTAAAAAGA AAAATTGTG AGCGTTACCG CTCGTTTAT
 5841 TACCCGAAGG CTGTTTCAGT AGACCACTGA TTAAGTAAGT
 5881 AGATGAAAAA ATTTTCATC CATGAAAGAG TTCGATGAGA
 5921 GCTACTTTTT CAAATGCTTA ACAGCTAACC GCCATTCAAT
 5961 AATGTTACGT TCTCTTCAT CTGCGGTAC GTTATCTAAC
 6001 AAGAGGTTTT ACTCTCTCAT ATCTCATCA AATAGAAAGA
 6041 ACATAATCAA AAAGCTT 6057

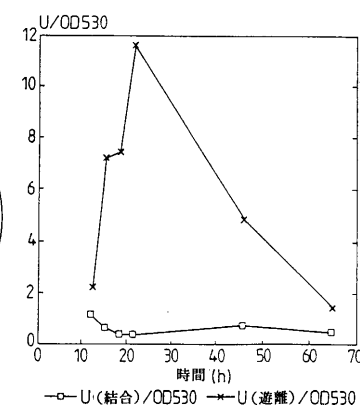
【図 2】



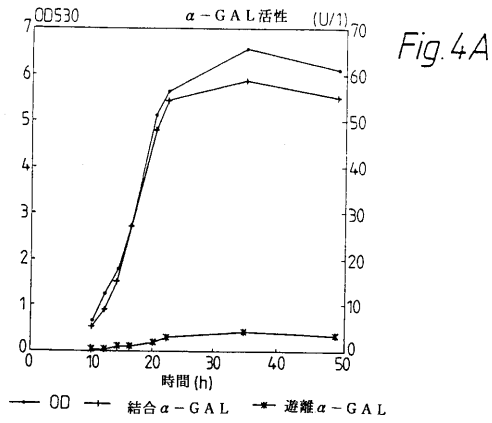
【図 3 A】

pSY13を保有するMT302/1cの α -ガラクトシダーゼ活性

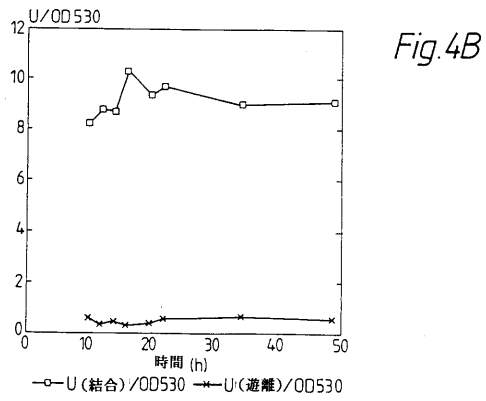
【図 3 B】

pSY13を保有するMT302/1cの α -ガラクトシダーゼ活性

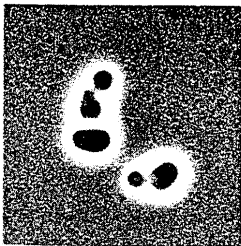
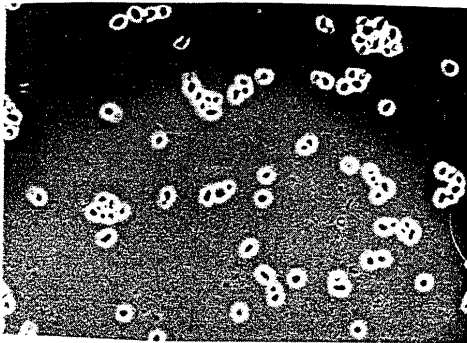
【図 4 A】
pUR2969を保有するMT302/1cの α -ガラクトシダーゼ活性



【図 4 B】
pUR2969を保有するMT302/1cの α -ガラクトシダーゼ活性



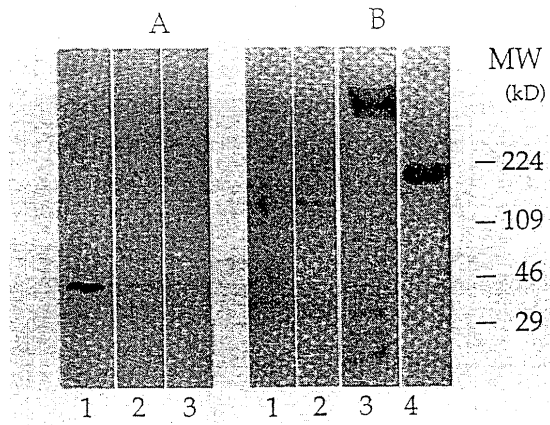
【図 6】
Fig. 6. (1/2)



(2/2)

【図 5】

Fig. 5.



【図 7】

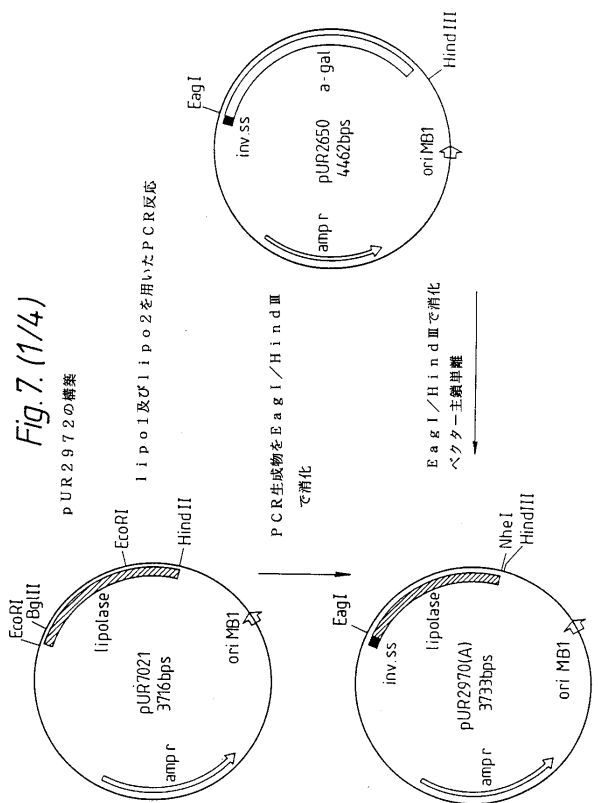


Fig.7(2/4)

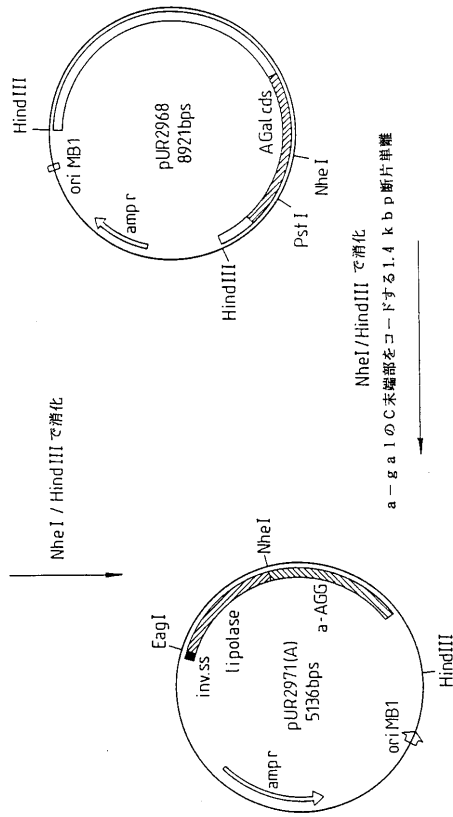


Fig.7(3/4)

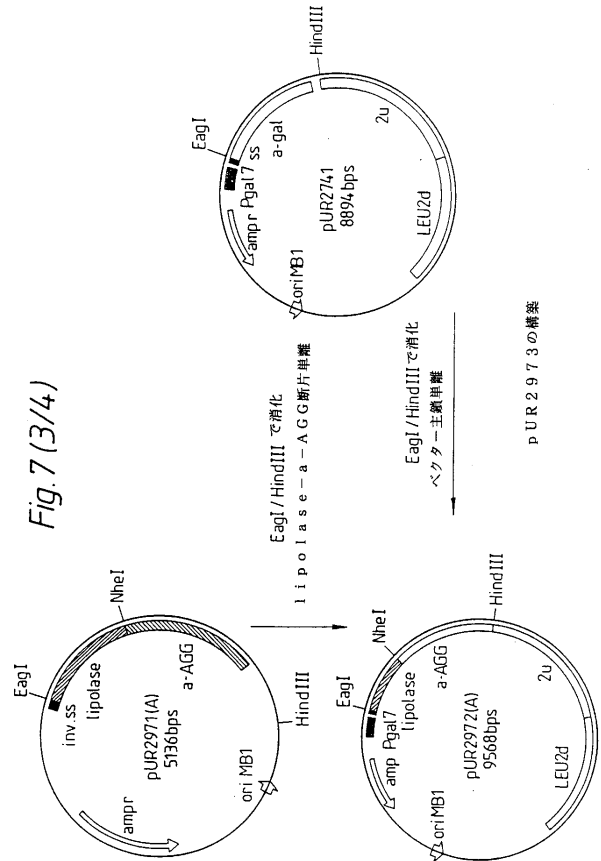
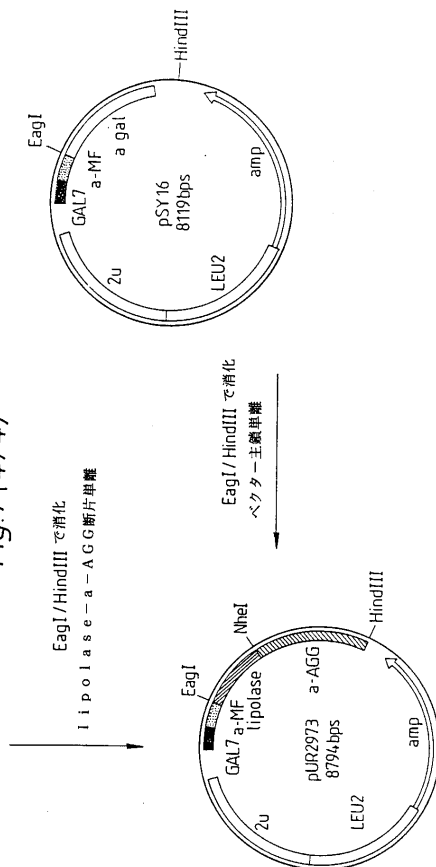


Fig.7(4/4)



【図8】

FIGURE 8, 1/2

リパーゼBのDNA配列

1	AATTCGGCAC	GAGATTCCTT	TGATTTGCAA	CTGTTAATCA
41	TGGTTTTCCAA	AAGCTTTTTT	TTGGCTGCGG	CGCTCAACGT
81	AGTGGGCACC	TTGGCCCAGG	CCCCACGGC	CGTTCTTAAT
121	GGCAACGAGG	TCATCTCTGG	TGTCCTTGAG	GGCAAGGTTG
161	ATACCTTCAA	GGGAATCCCA	TTTGCTGACC	CTCCTGTGG
201	TGACTTGCGG	TTCAAGCACC	CCCAGCCTTT	CACTGGATCC
241	TACCAGGGTC	TTAAGGCCAA	CGACTTCAGC	TCTGCTTGTA
281	TGCAGCTTGA	TCCTGGCAAT	GCCTTTTCTT	TGCTTGACAA
321	AGTAGTGGGC	TTGGGAAAGA	TTCTTCCTGA	TAACCTTAGA
361	GGCCCTCTTT	ATGACATGGC	CCAGGGTAGT	GTCCTCCATGA
401	ATGAGGACTG	TCTCTACCTT	AACGTTTTCC	GCCCCGCTGG
441	CACCAAGCCT	GATGCTAAGC	TCCCCGTCA	GCTTTGGATT
481	TACGGTGGTG	CCTTTGTGTT	TGGTCTTCT	GCTTCTTACC
521	CTGGTAACGG	CTACGTCAAG	GAGAGTGTGG	AAATGGGCCA
561	GCCTGTGTGT	TTTGTTTCCA	TCAACTACCG	TACCGCCCCC
601	TATGGATTCT	TGGGTGGTGA	TGCCATCACC	GCTGAGGGCA
641	ACACCAACGC	TGGTCTGCAC	GACCAGCGCA	AGGGTCTCGA
681	GTGGGTTAGC	GACAACATTG	CCAACCTTGG	TGGTGATCCC
721	GACAAAGTCA	TGATTTTCGG	TGAGTCCGCT	GGTGCCATGA
761	TGTTTGCTCA	CCAGCTTGTT	GCCTACGGTG	GTGACAACAC
801	CTACAACGGA	AAGCAGCTTT	TCCACTCTGC	CATTCTTCAG
841	TCTGGCGGTC	CTCTTCCTTA	CTTTGACTCT	ACTTCTGTTG
881	GTCCCGAGAG	TGCCTACAGC	AGATTTGCTC	AGTATGCCGG
921	ATGTGACACC	AGTGCCAGTG	ATAATGACAC	TCTGGCTTGT
961	CTCCGACGCA	AGTCCAGCGA	TGTCTTGAC	AGTGCGCAGA
1001	ACTCGTATGA	TCTTAAGGAC	CTGTTTGCTC	TGCTCCCTCA
1041	ATTCCCTTGA	TTTGGTCCCA	GACCCGACGG	CAACATTATT
1081	CCCGATGCCG	CTTATGAGCT	CTACCGCAGC	GGTAGATACG
1121	CCAAGGTTCC	CTACATTACT	GGCAACCAGG	AGGATGAGGG
1161	TACTATTCTT	GCCCCCGTTG	CTATTAATGC	TACCACTACT
1201	CCCCATGTTA	AGAAGTGGTT	GAAGTACATT	TGTAGCCAGG
1241	CTTCTGACGC	TTCGCTTGAT	CGTGTGTTGT	CGCTCTACCC
1281	CGGCTCTTGG	TCGGAGGGTT	CACCAATCCG	CACTGGTATT
1321	CTTAATGCTC	TTACCCCTCA	GTTCAAGCGC	ATTGCTGCCA
1361	TTTTCACTGA	TTTGCTGTTC	CAGTCTCCTC	GTCGTGTTAT
1401	GCTTAACGCT	ACCAAGGACG	TCAACCCTCG	GACTTACCTT
1441	GCCACCCAGC	TCCATAACCT	CGTTCATT	TTGGGTACTT
1481	TCCATGGCAG	TGATCTTCTT	TTTCAATACT	ACGTGGACCT
1521	TGGCCCATCT	TCTGCTTACC	GCCGCTACTT	TATCTCGTTT
1561	GCCAACCACC	ACGACCCCAA	CGTTGGTACC	AACCTCCAAC

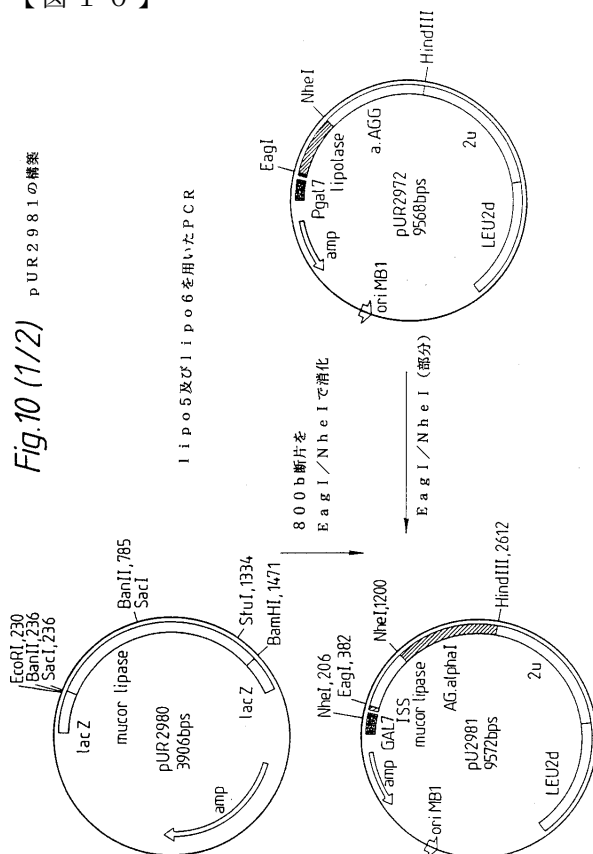
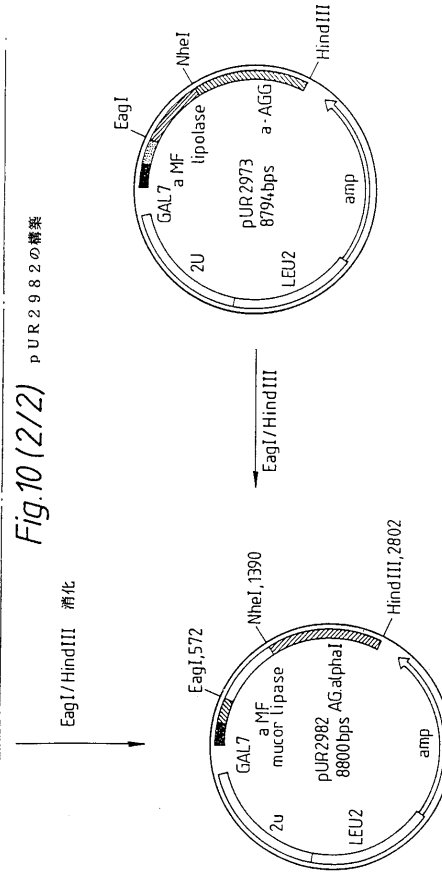
FIGURE 8, 2/2

1601 AGTGGGATAT GTACACTGAT GCAGGCAAGG AGATGCTTCA
 1641 GATTTCATATG ATTGGTAACT CTATGAGAAC TGACGACTTT
 1681 AGAATCGAGG GAATCTCGAA CTTTGAGTCT GACGTACTC
 1721 TCTTCGGTTA ATCCCATTTA GCAAGTTTGG TGTATTTCAA
 1761 GTATACCAGT TGATGTAATA TATCAATAGA TTACAAATTA
 1801 ATTAGTGAAG AAAAAAAAAA AAAAAAAC 1828

【図9】



【図10】

Fig.10 (1/2) pUR2981の構築**Fig.10 (2/2)** pUR2982の構築

【図 11】
FIGURE 11, 1/2

FLO1のDNA配列:

```

1  ATGACAATGC  CTCATCGCTA  TATGTTTTTG  GCAGTCTTTA
41  CACTTCTGGC  ACTAACTAGT  GTGGCCCTCAG  GAGCCACAGA
81  GCGGTGCTTA  CCAGCAGGCC  AGAGGAAAAG  TGGGATGAAT
121  ATAAATTTTT  ACCAGTATTC  ATTGAAAGAT  TCCTCCACAT
161  ATTCGAATGC  AGCATATATG  GCTTATGGAT  ATGCCTCAAA
201  AACCAAACTA  GGTTCGTGCG  GAGGACAAAC  TGATATCTCG
241  ATTGATTATA  ATATTCCCTG  TGTAGTTCA  TCAGGCACAT
281  TTCCTTGTC  TCAAGAAGAT  TCCTATGGAA  ACTGGGGATG
321  CAAAGGAATG  GGTGCTTGTT  CTAATAGTCA  AGGAATTGCA
361  TACTGGAGTA  CTGATTTAT  TGGTTTCTAT  ACTACCCCAA
401  CAAACGTAAC  CCTAGAAATG  ACAGGTTATT  TTTTACCACC
441  ACAGACGGGT  TCTTACACAT  TCAAGTTTGC  TACAGTTGAC
481  GACTCTGCAA  TTCTATCAGT  AGGTGGTGCA  ACCGCGTTCA
521  ACTGTTGTGC  TCAACAGCAA  CCGCCGATCA  CATCAACGAA
561  CTTTACCATT  GACGGTATCA  AGCCATGGGG  TGGAAAGTTG
601  CCACCTTAATA  TCGAAGGAAC  CGTCTATATG  TACGCTGGCT
641  ACTATTATCC  AATGAAGGTT  GTTACTCGA  ACGTGTGTTT
681  TTGGGGGTACA  CTTCCAATTA  GTGTGACACT  TCCAGATGGT
721  ACCACTGTAA  GTGATGACTT  CGAAGGGTAC  GTCTATTCTT
761  TTGACGATGA  CCTAAGTCAA  TCTAACTGTA  CTGTCCCTGA
801  CCCTTCAAAT  TATGCTGTCA  GTACCACTAC  AACTACAACG
841  GAACCATGGA  CCGGTACTTT  CACTTCTACA  TCTACTGAAA
881  TGACCACCGT  CACCGGTACC  AACGGCGTTC  CAACTGACGA
921  AACCGTCATT  GTCATCAGAA  CTCCAACGAG  TGAAGGTCTA
961  ATCAGACCCA  CCACTGAACC  ATGGACTGGC  ACTTTCACCT
1001  CGACTTCCAC  TGAGGTTACC  ACCATCACTG  GAACCAACGG
1041  TCAACCAACT  GACGAAACTG  TGATTGTTAT  CAGAACTCCA
1081  ACCAGTGAAG  GTCTAATCAG  CACCACCACT  GAACCATGGA
1121  CTGGTACTTT  CACTTCTACA  TCTACTGAAA  TGACCACCGT
1161  CACCGGTACT  AACGGTCAAC  CAACTGACGA  AACCGTGATT
1201  GTTATCAGAA  CTCCAACGAG  TGAAGGTTTG  GTTACAACCA
1241  CCACTGAACC  ATGGACTGGT  ACTTTTACTT  CGACTTCCAC
1281  TGAATGTCT  ACTGTCACCT  GAACCAATGG  CTTGCCAACT
1321  GATGAAACTG  TCATTGTTGT  CAAAACCTCA  ACTACTGCCA
1361  TCTCATCCAG  TTTGTCATCA  TCATCTTCAG  GACAAATCAC
1401  CAGCTCTATC  ACGTCTTCGC  GTCCAATTAT  TACCCCATTC
1441  TATCCTAGCA  ATGGAACCTC  TGTGATTCTT  TCCTCAGTAA
1481  TTTCTTCTC  AGTCACTTCT  TCTCTATTCA  CTCTCTCTCC
1521  AGTCATTTCT  TCCTCAGTCA  TTTCTTCTTC  TACAACAACC
1561  TCCACTTCTA  TATTTTCTGA  ATCATCTAAA  TCATCCGTCA

```

FIGURE 11, 2/2

```

1601  TTCCAACCAG  TAGTTCACC  TCTGGTTCTT  CTGAGAGCGA
1641  AACGAGTTCA  GCTGGTTCTG  TCTCTTCTTC  CTCTTTTATC
1681  TCTTCTGAAT  CATCAAAATC  TCCTACATAT  TCTTCTTCAT
1721  CATTACCACT  TGTACCAGT  GCGACAACAA  GCCAGGAAAC
1761  TGCTTCTTCA  TTACCACCTG  CTACCCTAC  AAAAACGAGC
1801  GAACAAACCA  CTTTGGTTAC  CGTGACATCC  TGCGAGTCTC
1841  ATGTGTGCAC  TGAATCCATC  TCCCCTCGCA  TTGTTTCCAC
1881  AGCTACTGTT  ACTGTTAGCG  GCCTCACAAC  AGAGTATACC
1921  ACATGGTGCC  CTATTTCTAC  TACAGAGACA  ACAAAGCAAA
1961  CCAAAGGGAC  AACAGAGCAA  ACCACAGAAA  CAACAAAACA
2001  AACCACGGTA  GTTACAATT  CTTCTTGTGA  ATCTGACGTA
2041  TGCTCTAAGA  CTGCTTCTCC  AGCCATTGTA  TCTACAAGCA
2081  CTGCTACTAT  TAACGGCGTT  ACTACAGAAT  ACACAACATG
2121  GTGTCCTATT  TCCACCACAG  AATCGAGGCA  ACAAACAACG
2161  CTAGTTACTG  TTACTTCTCG  CGAATCTGGT  GTGTGTTCCG
2201  AAATGCTTTC  ACCTGCCATT  GTTTCGACGG  CCACGGCTAC
2241  TGTGAATGAT  GTTGTACGG  TCTATCCTAT  ATGGAGGCCA
2281  CAGACTGCGA  ATGAAGAGTC  TGTCACTCT  AAAATGAACA
2321  GTGCTACCGG  TGAGACAACA  ACCAATACTT  TAGCTGCTGA
2361  AACGACTACC  AATACTGTAG  CTGCTGAGAC  GATTACCAAT
2401  ACTGGAGCTG  CTGAGACGAA  AACAGTAGTC  ACCTCTTCGC
2441  TTTCAAGATC  TAATCACGCT  GAAACACAGA  CGGCTTCCGC
2481  GACCGATGTG  ATTGGTCACA  GCAGTAGTGT  TGTCTTCTGA
2521  TCCGAAACTG  GCAACACCAA  GAGTCTAACA  AGTTCCGGGT
2561  TGAGTACTAT  GTCGCAACAG  CCTCGTAGCA  CACCAGCAAG
2601  CAGCATGGTA  GGATATAGTA  CAGCTTCTTT  AGAAATTTCA
2641  ACGTATGCTG  GCAGTGCAAC  AGCTTACTGG  CCGGTAGTGG
2681  TTAA 2685

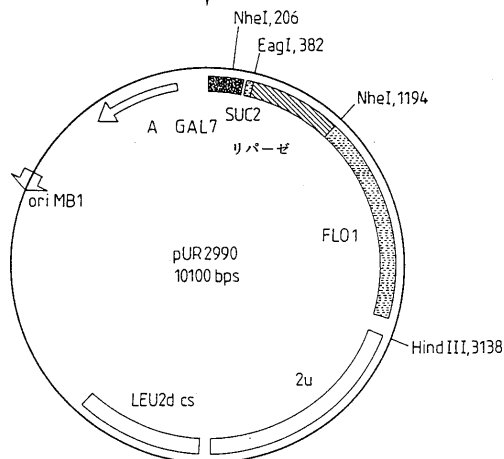
```

【図 12】

Fig.12.

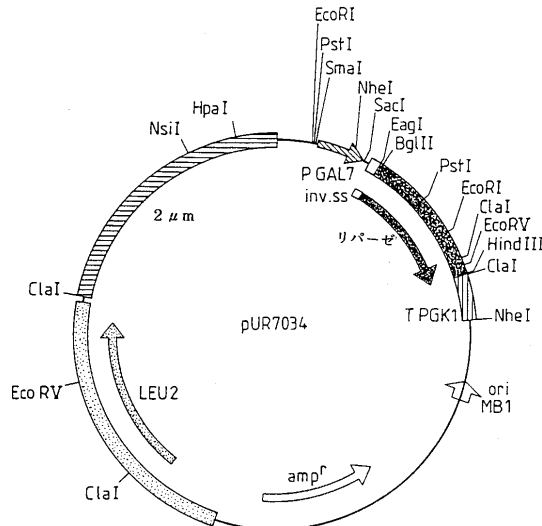
pUR2990の構築

オリゴヌクレオチド pcrf102 及び
pcrf102 を用いた PCR
1950bp 断片単離
NheI 及び HindIII で切断
HindIII/NheI (部分) で消化した
pUR2972 中に連結



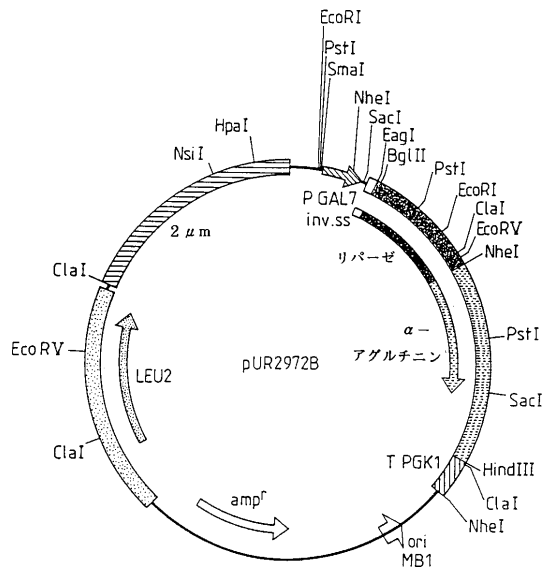
【図 13】

Fig.13.



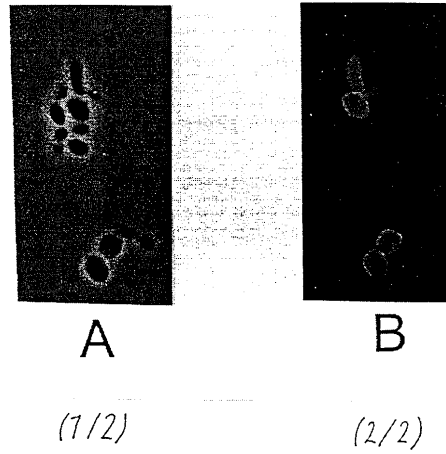
【図 14】

Fig.14.



【図 15】

Fig.15.



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
C 1 2 N 11/16 C 1 2 N 11/16

(72)発明者 トシユカ, ホルガー・ヨーク
オランダ国、エヌ・エル- 3 1 3 2 ・ヘー・ベール・フラーデインヘン、コールンヘルトストラート
・ 7 7

(72)発明者 フェリツプス, コルネリス・テオドリス
オランダ国、エヌ・エル- 3 1 4 2 ・カー・ベール・マースルイス、ハーグドールン・ 1 8

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第 8 9 / 0 0 7 1 4 0 (WO, A 1)
Yeast, Vol. 9, No. 4 (1993. Apr.) p. 399-409
Yeast, Vol. 9, No. 4 (1993. Apr.) p. 423-427
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, No. 7 (1992. Apr.) p. 2713-2717
J. Bacteriol., Vol. 171, No. 9 (1989) p. 4569-4576
J. Cell Biol., Vol. 107, No. 3 (1988) p. 865-876
Mol. Cell. Biol., Vol. 8, No. 4 (1988) p. 1709-1714
Mol. Cell. Biol., Vol. 9, No. 8 (1989) p. 3155-3165

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
BIOSIS/WPI (DIALOG)