世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7
C12N 15/31, 1/21 // (C12N 15/31, C12R 1:465) (C12N 1/21, C12R 1:465)

A1

(11) 国際公開番号 WO00/56892

(43) 国際公開日 2000年9月28日(28.09.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01698

(22) 国際出願日 2000年3月21日(21.03.00)

(30) 優先権データ
特願平11/77445 1999年3月23日(23.03.99) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
チッソ株式会社(CHISSO CORPORATION)[JP/JP]
〒530-0005 大阪府大阪市北区中之島三丁目6番32号
Osaka, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
井上 敏(INOUE, Satoshi)[JP/JP]
〒236-0024 神奈川県横浜市金沢区乙舳町10-2-2206
Kanagawa, (JP)
高木博史(TAKAGI, Hiroshi)[JP/JP]
〒910-0845 福井県福井市志比口1丁目7番1号803 Fukui, (JP)
中森 茂(NAKAMORI, Shigeru)[JP/JP]
〒910-1142 福井県吉田郡松岡町兼定島38-7, B-103 Fukui, (JP)

(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: METHOD FOR DETECTING ε-POLYLYSINE-PRODUCING BACTERIUM, PROCESS FOR PRODUCING ε-POLYLYSINE AND ε-POLYLYSINE-PRODUCING BACTERIUM

(54)発明の名称 ε－ポリリジン生産菌の検出方法、ε－ポリリジンの製造方法、およびε－ポリリジン生産菌

(57) Abstract

A method for detecting an ε-polylysine-producing bacterium which comprises detecting a bacterial strain having a base sequence originating in plasmid pN033; and a process for producing ε-polylysine characterized by using the strain detected by the above detection method. By using the detection method as described above, an ε-polylysine-producing bacterium can be easily detected. By using the process for producing ε-polylysine by using the strain obtained by the above detection method, ε-polylysine can be produced at a high efficiency.

(57)要約

本発明は、プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有する菌株を検出するε－ポリリジン生産菌の検出方法、および該検出方法で検出された菌株を用いることを特徴とするε－ポリリジンの製造方法である。

本発明のε－ポリリジン生産菌の検出方法であれば、ε－ポリリジン生産菌を容易に検出することができる。また、該検出方法によって得られた菌株を用いるε－ポリリジンの生産方法であれば、高い効率でε－ポリリジンを生産することが可能である。

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

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

明細書

εーポリリジン生産菌の検出方法、εーポリリジンの製造方法、およびεーポリリジン生産菌

技術分野

本発明は、εーポリリジン生産菌の検出方法、εーポリリジンの製造方法、おとびεーポリリジン生産菌に関する。更に詳しくは、特定の塩基配列を有する菌株を検出するεーポリリジン生産菌の検出方法、該検出方法によって得られた菌株を用いるεーポリリジンの製造方法、および特定の塩基配列を有するεーポリリジン生産菌に関する。

背景技術

抗菌物質として有用なεーポリリジンは、ストレプトマイセス アルブラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｌｂｕｌｕｓ）ＩＦＯ１４１４７株、更に、ストレプトマイセス アルブラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｌｂｕｌｕｓ）ＩＦＯ１４１４７株を親株とし変異剤処理によって得られた菌株をもちいて、生産されている。

現在使用されている前述のεーポリリジン生産菌株は、液体培地で２～４日間培養した培養液の上清に、ドラゲンドルフ試薬を添加し、その時の沈殿の有無によってεーポリリジン生産能を有するか否かを確認し、検出、選抜されたものである。

発明の開示

前述の従来技術の問題点に鑑み、本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、εーポリリジン高生産株ＩＦＯ１４１４７株内に存

在する環状プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有する菌株であれば、ε－ポリリジンを生産する能力があることを知見した。更に、この知見に基づいて更に研究を重ねたところ、該塩基配列を有する菌株を検出する方法であれば、容易にε－ポリリジン生産菌を検出することが可能であることを知見し、この知見に基づいて本発明を完成させた。

以上の記述から明らかなように、本発明の目的は、ε－ポリリジン生産菌を容易に検出することができる、新規のε－ポリリジン生産菌検出方法、該検出方法によって得られた菌株を用いるε－ポリリジンの生産方法、および新規のε－ポリリジン生産菌を提供することにある。

本発明は、下記（１）～（６）の構成からなる。

（１）図１で示されるプラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有する菌株を検出するε－ポリリジン生産菌の検出方法。

（２）該菌株の検出においてポリメラーゼ連鎖反応法を用いることを特徴とする前記第１項に記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法。

（３）該菌株の検出をハイブリダイゼーション法によって行うことを特徴とする前記第１項記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法。

（４）図１で示されるプラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列が、配列番号１で示される塩基配列である前記第１項～第３項の何れか１項記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法。

（５）前記第１項～第４項の何れか１項記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法で検出された菌株を用いることを特徴とするε－ポリリジンの製造方法。

（６）配列番号１で示される塩基配列を有するε－ポリリジン生産菌。

図面の簡単な説明

図１は、プラスミドｐＮＯ３３の制限酵素地図を示す。黒色部分は、配列番号１の決定部分である。

発明を実施するための最良の形態

第１の発明は、図１で示されるプラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有する菌株を検出するε－ポリリジン生産菌の検出方法である。

プラスミドｐＮＯ３３は、ε－ポリリジン高生産菌株ストレプトマイセス　アルブラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ａｌｂｕｌｕｓ）ＩＦＯ１４１４７株から得ることができ、全長約３７ｋｂよりなり、且つ表１、表２及び図１に示す制限酵素認識部位をもつ複製可能な環状プラスミドであり、配列番号１に示す塩基配列を有する。

表１

制限酵素	切断塩基配列	切断部位数	生成断片のサイズ（kb）
PstI	CTGCA|G	0	0
StuI	AGG|CCT	0	0
ScaI	AGT|ACT	0	0
XhoI	C|TCGAG	0	0
XbaI	T|CTAGA	0	0
HindIII	A|AGCTT	1	37.3
EcoRV	GAT|ATC	1	37.3
EcoT22I	ATGCA|T	1	37.3
SpeI	A|CTAGT	1	37.3
NspV	TT|CGAA	1	37.3
PvuII	CAG|CTG	2	21.6, 15.7
ClaI	AT|CGAT	3	17.4, 11.2, 8.7
BamHI	G|GATCC	4	16.0, 11.4, 6.9, 3.0
EcoRI	G|AATTC	5	14.3, 12.7, 5.6, 1.9, 1.8

図１において、決定された制限酵素の位置は、制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩの位置を起点として、時計周りの距離は表２のとおりである。

表２

制限酵素	距離(kp)
HindIII	0
EcoRV	0.5
ClaI	1.0
BamHI	1.7
BamHI	8.56
PvuII	8.8
EcoRI	10.8
BamHI	11.6
EcoRI	12.7
EcoT22I	14.4
ClaI	18.4
BamHI	23.0
EcoRI	25.4
SpeI	26.6
ClaI	29.6
PvuII	30.4
EcoRI	32.0
SmaI	33.1
EcoRI	33.8
SmaI	36.6

プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有する菌株の検出方法は、特に限定されるものではないが、具体的には、被検出菌株の全核酸画分をテンプレートとし、プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列に、特異的にハイブリダイズするように作製した

オリゴヌクレオチド（プライマー）を用いて、標的とする塩基配列の遺伝子増幅反応を行い、この増幅された標的塩基配列をゲル電気泳動にかけることによって、該増幅された塩基配列の長さが、予想される標的塩基配列の長さと同じであるか否かを確認し、被検出菌株がプラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有するか否かを判断する方法（ポリメラーゼ連鎖反応法、以下「ＰＣＲ法」と記述する。）や、^{32}Ｐで放射線ラベルしたＤＮＡプローブを用いたハイブリダイゼーション法を挙げることができる。

被検出菌株が、プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列を有する菌株であれば、該菌株はε－ポリリジンを生産する能力を有することから、被検出菌株を前述のような検出方法にかけることによって、被検出菌株がε－ポリリジン生産菌であるか否かが容易に判定できる。

ＰＣＲ法は、Ｓａｉｋｉらが開発した方法であり、Ｓｃｉｅｎｃｅ２３０巻，ｐｐ１３５０，１９８５に基づき行うことができる。

この方法は、特定の遺伝子配列を増幅させる方法で、迅速、高感度、高い特異性をもち、かつ簡便であることから、遺伝子関連の研究のみならず、既に、医療分野における病原菌の迅速判定や、遺伝病疾患の判定、また、食品分野における有害菌の迅速検定に利用されている。

ＰＣＲ法は、被検出菌株に微量しか存在しない標的塩基配列であっても、2つのプライマーが挟む標的塩基配列は増幅され、簡易アガロース電気泳動法により、容易に検出が可能になる。また、ＰＣＲ法においては、標的配列が１分子以上存在すれば増幅反応が可能であり、被検出菌株を溶菌酵素や界面活性剤等で前処理するだけで、容易に試料として供することができ、従

来の検出法に比べ価値が高い。

被検出菌株は、特に限定されるものではないが、自然界から採取された菌株、あるいは既に採取され保存されている菌株を挙げることができる。

本発明において、該被検出菌株は単離されたものであってもよく、単離以前の複数の菌株を含む状態のものであっても良い。

プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは、選択性や検出感度および再現性から考えて、プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列で、１０塩基以上、望ましくは１５塩基以上の長さをもったオリゴヌクレオチド断片や、プラスミドｐＮＯ３３由来の塩基配列に特異的にハイブリダイズするように化学合成されたものを使用することができる。

また、本発明において行うＰＣＲ法においてプライマーは、特に検出用として^{32}Ｐなどで放射線ラベルされてなくても良い。プライマーが規定しているｐＮＯ３３由来の塩基配列の増幅領域は、５０から４６００塩基、好ましくは１００塩基から１０００塩基となれば良い。

ＰＣＲ法における遺伝子増幅反応は、前述のプライマー、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ、ｄＮＴＰ（これは何かの略称でしょうか？デオキシリボヌクレオチド三リン酸）溶液（Ｎ＝Ｇ，Ａ，Ｔ，Ｃ）、および反応用緩衝液を含む遺伝子増幅反応液中にて行う。反応用緩衝液は、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，$MgCl_2$，ＫＣｌ，Ｔｗｅｅｎ２０などからなるものを使用すればよい。遺伝子増幅反応に用いるＤＮＡポリメラーゼは、９０℃以上の温度に耐熱性があればよく、生物種起源は問わない。

更に、遺伝子増幅反応において、２本鎖ＤＮＡを１本鎖にする熱変性は９０～９８℃、プライマーをハイブリダイズさせるアニーリング反応は３７～６８℃、ＤＮＡポリメラーゼを作用

させる鎖長反応は５０～７５℃の温度で行い、これを１サイクルとしたものを数十サイクル行わせることにより、標的塩基配列を増幅させることができる。

遺伝子増幅反応後、反応生成物を電気泳動により分離し、臭化エチジウムブロマイド等で核酸を染色し、増幅させた塩基配列の長さが、配列番号１から予想される標的塩基配列の長さと等しければ、被検出菌体中にε－ポリリジンの高生産菌の存在を判定できる。増幅された標的塩基配列の検出には、クロマトグラフィー法や直接塩基配列を決定する方法も有効である。

第２の発明は、第１の発明であるε－ポリリジン生産菌の検出方法で検出された菌株を用いるε－ポリリジンの製造方法である。本発明製造方法は、第１の発明であるε-ポリリジン生産菌の検出方法で検出された菌株を液体培地中で培養し、培養液中に生成蓄積したε-ポリリジンを採取することを特徴とする。

液体培地は、炭素源、窒素源、無機塩及びその他の栄養物が含まれていれば、いかなるものでもよい。好ましくは、炭素源としてブドウ糖又はグリセリンを含み、窒素源としては硫酸アンモニウム又は酵母エキスもしくはポリペプトンを含み、無機塩としてはリン酸イオン。カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン等を与えられるものが挙げられる。

培養は好気的条件下で培養し振盪培養、撹拌培養等を行うことによりできる。培養温度は20～40℃、培地のpHは3～9、培養期間は1～10日が好ましい。このような培養により培養液中にε-ポリリジンが生成蓄積する。培養液中に生成蓄積したε-ポリリジンの採取は培養液を遠心分離やフィルター濾過で菌体を取り除き、得られた菌体除去液から公知の方法によってε-ポリリジン単離することによって行うことができる。具体的には

例えば菌体除去液をアニオン交換樹脂のカラムを通して不純物の大部分を除き、カチオン交換樹脂のカラムを通して精製、濃縮する。こうすることでε-ポリリジンが得られる。

次に実施例をもって本発明を詳細に説明する。

（１）プラスミドｐＮＯ３３の検出

プラスミドｐＮＯ３３の単離液体培地（バクトトリプトン１０ｇ、イーストエクストラクト５ｇ、食塩５ｇを１Ｌの水道水に溶解後、ｐＨを７．３に調整した培地）５０ｍｌを入れた、５００ｍｌ容量の坂口フラスコに、ストレプトマイセス　アルブラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ａｌｂｕｌｕｓ）ＩＦＯ１４１４７および同ＩＦＯ１３４１０の灰色胞子をそれぞれ一白金耳分接種し、振盪速度１４０ｒｐｍ、３０℃で１６時間培養した。

該培養液から菌体を遠心５０００Ｇにて集菌し、ＴＥ緩衝液（２５ｍＭトリス（ヒドロキシ）アミノメタン（以下「トリス」と記述する。）、２５ｍＭ　ＥＤＴＡ：ｐＨ８．０）で洗浄後、該菌体を溶菌液（０．３Ｍ　ショ糖、２５ｍＭトリス、２５ｍＭ　ＥＤＴＡ、２ｍｇ／ｍｌリゾチーム）２０ｍｌに懸濁させ、４℃で５分間放置し、２％ラウリル硫酸ナトリウムと０．３Ｎ水酸化ナトリウムからなる溶液１０ｍｌを添加し、ゆっくり混合後、さらに４℃で５分放置し菌体溶菌液を得た。

該菌体溶菌液に１５ｍｌの５Ｍ酢酸アンモニウムを中和混合し、４℃で１０分放置した後、１０分間１２０００Ｇで高速遠心分離し、上清を分取した。この上清に等量のＴＥ緩衝液飽和のフェノールを加え、５分間激しく混合し、１０分間１２０００Ｇで高速遠心分離後、水溶性画分Ａを分取した。この水溶性画分Ａに等量のクロロホルムを添加後、５分間激しく混合し、１０分間１２０００Ｇで高速遠心分離後、水溶性画分Ｂを分取

した。

分取した水溶性画分Bに、０．１倍容の３M酢酸ナトリウムと２倍容のエタノールを添加し、－２０℃に３０分放置後、析出した白色沈殿物（核酸画分）を１２０００Gで高速遠心により回収し、この回収された白色沈殿物（核酸画分）５００μlのＴＥ緩衝液に溶解させた。

リボ核酸除去のため、該溶解液に、最終濃度が５０μg／ml になるように、リボ核酸分解酵素を加え、３７℃で３０分反応させ、さらに、０．６倍容の２０％ポリエチレングリコール／５M食塩混合液を加え、４℃で１時間放置した。

生成した白色沈殿物を高速遠心により回収し、１００μlのＴＥ緩衝液に溶解した。これを０．７％アガロースゲル電気泳動（１００ボルト、２０分）に供し、ゲルを臭化エチジュウムで染色することにより高分子核酸の存在を確認した。

さらに、この高分子核酸画分を制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（日本ジーン社製）で消化後、バイオラッド社製のパルスフィールド電気泳動装置（泳動条件は、バイオラッド社製により提供されている条件、２００ボルト、１６時間）に供した。分子量マーカーは酵母染色体を使用した。

ε－ポリリジン高生産菌ＩＦＯ１４１４７からの高分子核酸画分においては、全長約３７ｋｂｐのプラスミドｐＮＯ３３のＤＮＡ断片が確認された。一方、ε－ポリリジン低生産菌ＩＦＯ１３４１０からのプラスミド画分には、約３７ｋｂｐに相当するプラスミド様核酸は検出できなかった。

（２）プラスミドｐＮＯ３３の詳細な制限酵素地図の作製

「（１）プラスミドｐＮＯ３３の検出」で取得したしたプラスミドｐＮＯ３３の詳細な制限酵素地図作製は、市販の各種制限酵素（日本ジーン社製あるいは宝酒造社製）によってｐＮＯ

３３を単一消化、二重消化、あるいは三重消化して得られたＤＮＡ断片を０．７％のアガロースゲル電気泳動あるいはバイオラッド社製のパルスフィールド電気泳動に供し、その移動度から分子量を求めることによって作成した。

酵素の反応条件は、供給者によって決められた条件に従った。また、分子量は、ラムダファージＤＮＡを制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩで消化して得られた分子量マーカー（日本ジーン社製）および酵母染色体を分子量マーカー（バイオラッド社製）の標準移動度をもとに決定した。これらの結果から、前記載の図１であるプラスミドｐＮＯ３３の詳細な制限酵素地図を決定した。

（３）プラスミドｐＮＯ３３の塩基配列の決定

「（１）プラスミドｐＮＯ３３の検出」で取得したプラスミドｐＮＯ３３の塩基配列を決定するため、プラスミドｐＮＯ３３ＤＮＡを制限酵素、ＥｃｏＲＩおよびＳｍａＩで消化後、その断片を大腸菌で複製可能な公知プラスミドベクターｐＧｒｅｅｎ１９（Ｉｎｏｕｙｅら、Ｇｅｎｅ　ｖｏｌ．１８９、ｐｐ１５９－１６２：１９９７）あるいはｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＳＫ＋（ストラッテジーン社製）のＥｃｏＲＩおよびＳｍａＩ部位に、常法によりサブクローン化を行った。挿入断片の確認は、実施例１記載のプラスミド単離法に基づきプラスミド分離し、ＥｃｏＲＩまたはＳｍａＩで消化後、０．７％のアガロースゲル電気泳動法により確認した。

挿入断片の塩基配列は、ダイターミネーターサイクルシークエンシング法を用い、アプライド　バイオシステム社の蛍光シークセンサー（ＡＢＩ３７３）にて、配列番号１を決定した。配列番号１に基づき、宝酒造社製のＤＮＡＳＩＳ　Ｖｅｒ．３．６遺伝子解析ソフトウエアを使用することにより、翻訳可能領域を検索し、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号

５に示した翻訳可能領域を見い出した。これらの翻訳可能領域は十分機能しえる蛋白質と推定される。

実施例１：ε－ポリリジン生産菌の検出

「（１）プラスミドｐＮＯ３３の検出」で得られた、ε－ポリリジン高生産菌ＩＦＯ１４１４７株とε－ポリリジン低生産菌ＩＦＯ１３４１０の培養菌体の一部、および特開平２０００－６９９８８に開示のストレプトマイセスｓｐ．SP-72株（FERM P-16810）を「（１）プラスミドｐＮＯ３３の検出」で行ったε－ポリリジン高生産菌ＩＦＯ１４１４７株の培養方法に準拠し培養して得られた培養菌体の一部を熱処理により細胞壁を壊して得た核酸画分のうち、約２０ｎｇをテンプレートとして、表３に示すプラスミドｐＮＯ３３由来の化学合成プライマー用いて、遺伝子増幅処理（ＰＣＲ法）を行った。

遺伝子増幅処理（ＰＣＲ法）は、試供ＤＮＡ溶液（上記方法で得たテンプレート）５μｌ、１０×ＰＣＲバッファー（１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．３，５００ｍＭ　ＫＣｌ，１５ｍＭ　$MgCl_2$）１０μｌ、２．５ｍＭ　ｄＮＴＰ（Ｎ＝Ｇ，Ａ，Ｔ，Ｃ）混合溶液８μｌ、プラス鎖のプライマー（センスプライマー）１００ｐｍｏｌ、マイナス鎖のプライマー（アンチセンスプライマー）１００ｐｍｏｌ、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ０．５μｌを反応用のサンプルチューブに入れ、ついで蒸留水を加えて全量を１００μｌにした（反応液）。

処理条件は、変性９６℃で１分間、アニーリングは５９℃にて１分間、伸長は７２℃にて１分間で２５サイクル行った。

増幅反応処理後、反応液１０μｌを、１．２％アガロース電気泳動に供し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線を照射することにより標的塩基配列の検出を行った。

その結果、ε－ポリリジン高生産菌ＩＦＯ１４１４７株と、特開平２０００－６９９８８に開示の、ストレプトマイセスｓｐ．SP-72株（FERM P-16810）由来の高分子核酸画分をテンプレートとした場合に、表４に示すように、表３のプライマーとの組み合わせにおいて、増幅される塩基配列の長さに相当する増幅配列をアガロース電気泳動上で確認した。

一方、ε－ポリリジン低生産菌ＩＦＯ１３４１０においては、それぞれのプライマーの組み合わせにおいて、増幅される遺伝子配列は検出されなかった。

表３

No.	プライマーの名称	配列（5' → 3'）	配列番号1における位置
1.	T3-1	AGGGCACAACTGGGTGCGCT	327-346
2.	T3-2	CTGGACCGAAGCAAGTGCGC	673-692
3.	T7-2	AGGCCCACGAGCGCATCGAG	1041-1022
4.	S35T7-1	ATTGCCTACGCCCTTACCCA	4406-4387
5.	S37T7-4	AGTTGGAGTGCTTCACCGGC	3373-3354
6.	P811	CACACATGCTTGGTGACGAC	1754-1735
7.	P812	GTGACGCTTCAGGTCGTTCC	1334-1353

表４

プライマーの組み合わせ	PCR増幅塩基配列の長さ（bp）
1. T3-1とT7-2	715
2. T3-2とT7-2	369
3. T3-1とS35T7-1	4080
4. T3-1とS37T7-4	3047
5. T3-2とS37T7-4	2701
6. P811とP812	421

すなわち、ε－ポリリジン高生産菌ＩＦＯ１４１４７株由来のプラスミドｐＮＯ３３の遺伝子の部分配列をプライマーとして、ＰＣＲ法により容易にε－ポリリジン生産菌の検出が可能になった。

産業上の利用可能性

本発明のε－ポリリジン生産菌の検出方法であれば、ε－ポリリジン生産菌を容易に検出することができる。また、該検出方法によって得られた菌株を用いるε－ポリリジンの生産方法であれば、高い効率でε－ポリリジンを生産することが可能である。

請求の範囲

1．図1で示されるプラスミドpNO33由来の塩基配列を有する菌株を検出するε－ポリリジン生産菌の検出方法。

2．該菌株の検出においてポリメラーゼ連鎖反応法を用いることを特徴とする請求項1に記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法。

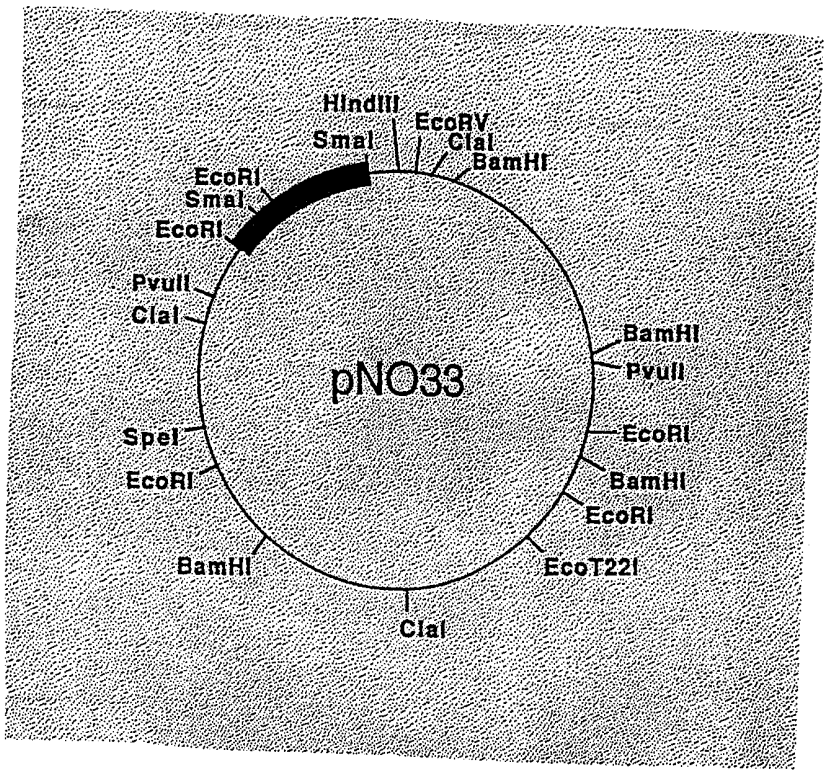
3．該菌株の検出をハイブリダイゼーション法によって行うことを特徴とする請求項1記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法。

4．図1で示されるプラスミドpNO33由来の塩基配列が、配列番号1で示される塩基配列である請求項1～3の何れか1項記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法。

5．請求項1～4の何れか1項記載のε－ポリリジン生産菌の検出方法で検出された菌株を用いることを特徴とするε－ポリリジンの製造方法。

6．配列番号1で示される塩基配列を有するε－ポリリジン生産菌。

第１図


HIndIII
SmaI
EcoRV
ClaI
BamHI
EcoRI
SmaI
EcoRI
PvuII
ClaI
pNO33
BamHI
PvuII
EcoRI
BamHI
EcoRI
EcoT22I
ClaI
BamHI
EcoRI
SpeI

SEQUENCE LISTING

<110> Chisso Corporation

<120> Detection method of ε-polylisine producing microorganism

<130> CS-4420

<140>
<141>

<150> JP P1999-077445
<151> 1999-03-23

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 4601
<212> DNA

<400> 1
gaattcgatg gtggcccggg gcggacacca caggatcggc cccagcgtca cgccgttcgt 60
ggtcagggcc tcgatcgcgt cccaaccaac ggtggcggtc acccgcaaca cgtcccagct 120
ccgcccgatc ggcacgtcaa cggcgtgccc ggcggcccat gcagcgtgta cgtcatgctt 180
gtccgctcct gcggctgttg cccatcggag cgcgcggacg aagtgctgtc cgatcgtcat 240
cgcgcgccct cctcgtgctc cgggcacgcc cgcacgtccc aactgatgcc ggcgcccgat 300
gcggagacgg tgcgcacgcg cccggcaggg cacaactggg tgcgctggtt gcgggtccgc 360
ccgcagacga tgcaggcgtg cccctgaagt tgccctaacg cggggaaatc agggtctccg 420
acccgatatg cgcgcttgat cggcttttgc tgtgtggtca gtgccattgc tgcactccgc 480
tcactagccc aggtgctccc acgatcagca acggaaccgc tacgtcgcgt atcgggatta 540
cccctagagt gacccctcac acacgtgccg cgcaagtgtc acgcacgtgc gtagcacgtg 600
cgtgacgttc gtacaggtgg acggagaggc ggagaaccct atgtgtgcag ctcgtcgagg 660
tgatacggca gactggaccg aagcaagtgc gcgcaaacga cgcagacgga ggggggcggg 720
tatgccaccg gagccgacca gcccgacggt tcaccgtcgc caactgggcc gcgaactgcg 780
ccaactgagg caggcggcgg ggaaagagat cgaggatgcg gcccagacgt tgggctgtca 840
ccgaagccgg gttagccgga tcgagaacgg gcggggcggc gcggtcgcaa agccgcaaga 900
tgtaaaagac ctgctcacgc tctacggcgt ggacgacgcc ataaagctcg cccgactcct 960
ggcactgctg aacgactccc agaagcccgg atggtgggag agcctggagt ttccgccggg 1020
actcgatgcg ctcgtgggcc tggagaccga tgcgcgcaag gaatcggctt ttgagccgtt 1080
gctgatcccc gggccgctac aggttcctga ctacgcgcgg gctgtgatcc atgcagctcg 1140
ctctcagcat ccggacgagg tcgaagacct ggttcagctc cgggacgggc gcctacgcct 1200
gctgacacgt tctcaaaacc cgttggagct gtgggccgta gtagatgagt ccgtgatccg 1260
tcggcccgtc ggcggcgctc ggacactccg tgatcaactg cggcatctga tggaaatcgc 1320
ggcattgccg aacgtgacgc ttcaggtcgt tccttttgag aaagagagtc accccggact 1380
cggcggctcc tttgcactct tggagttcga ggatgatccg gcggtggtct atgtggacag 1440
catggccggg aacctgtacc tggaaaaagc acgcgacgtg aggcgcttcg tgcgggcctt 1500
cgatctgctg aaggcgtgcg cgctcgaccc tgacgactca gcggccttga tcaaccgtgc 1560
cgcaaaggag agcaaatgag taacaccacc ccgacgccga acgccctgct ggctggcgcc 1620
cagtggttca agtccgaggc gtcaagcgca agcgggggtt gcctcgaagt ggcgtttcta 1680
cccggcgatc tcgtcggcat ccgagacaac gaggacctga ccaacccgcc ctttgtcgtc 1740
accaagcatg tgtggaactg ctgggtcgcc ggcgccaagg caggagaatt cgacccgccc 1800
gcctgatcac cgaccgcccg cagagtccgc gtgccacgtc cagggccggc ccgaatgatt 1860
cgggccggcc ctgctgcgtg tacctggtcg tcgactgcga gcacgcttgc ccgcgtgcgg 1920
tcacttgcgc ttgcgccgct tcttcttcgt ggtggtcgct acgacgttcc gcggggcctt 1980
ccccgtggtc gacggcggcc ggctctcggc cggcggctca accgcgtgtt gtgtctgctc 2040
gatctccgcc cggagtacgg cgatccggtg cctggcgtcc tgccgggact cctcgaccgc 2100
ggcccggtcg accgcggcta ccgtacgggc ctcctcggcc tcgtgccgcg cttgctcgac 2160
tcggcgggcg ccttcttctc ggtctcggtg tgcctgctcc tcagcggccg tgcgggcctc 2220
cttctcccgg tgtgcctcgg cacgcgcggc ggtgagttcg cgctgtgcct ccttggcaca 2280
cgcggcttcg gcacgcttgt gccgttgtgc ctcctcggca cactcggtga gttgctgctc 2340
ggcttgcgcg gctcgctgtt cggcggcctc gcgtgccgtc cgctcgacgg cgagctgttc 2400
gcgtgccgtc tgcgcttggg cgtgtgcttc ctgggcggcg cgctgggcct ggtggcccaa 2460
ctccagcgcg gcggccctgg cgccctcggc acaacgttgt gcctcgcgtg cggtgtgcag 2520
ctcggccgcc gtacgttcgc gggtctcctg gagttcctgg tgcagctcgg cgagctgctg 2580
gcgtgcctgc tccaactcgc cgcgcagcct acccccttcc gcttccagtc gctcggtctg 2640
ctcgcggtgc tcgtcggcgt cctgccgtgc cgcctccgcc tcacgctcgg cccactccgc 2700

ggcggccctg gcgccggcgc tctcggcccg tgccgtctgg gcgtcctgct gtgccttggc 2760
gctggcacgc tcggcctgct cgatccgggc atgcaggtgc agggatcgcc ggatgcggcc 2820
ctcggcgacc gccagccgtg ccgcccactc cccgtgtgcc gttgcgtccg ccggcggctt 2880
cgccgaggtc cctcggtcgt cgttcacccg tccccctacc aacgtttggt ggcacacccg 2940
tggcacagac ggcacagtct gtgccacggg tcggtgtgcc ggtgtcatgc gctcttgtgc 3000
cgctcggcaa cggcacggtt ggccgcggcc cggtcgtagg tgatgccctg gactttgagg 3060
cgcgtcacca gcgattgcgc gatcgcgttg gtagtccgcg ggtcgcccgg cttgatcgtc 3120
gcgtcgtaga gggccagcag cgccgctttc ttggtggagt aggcgctgag gtccggcaca 3180
tcgccggcgg ccggctcgtc ggcgtcgtcc tcgtcggcgg cctccggctc ggtgttcccc 3240
ggctcgtcgt cctggaggcg gacggtgatg cggggctcgg cggcgccgcg ggctgctgcg 3300
gtccgcccgg ccccggtcga ctccggcacg tcgccggcgt cctggtccgc gtcgccggtg 3360
aagcactcca actcgcgctg ttcggcacgc tgctgcggga ggggctgcgc gtgtgccgtg 3420
ccgtgcccgg caagcacctg ttcagtccgg ttggccagct cctccacctg ctcgacgtac 3480
gccgcgaacg cctcgtgctg tgcctgtgcc tcggccggcg gcgcgatctg tgccgcctcc 3540
gtcaacagcg gctccagcgc caggggggtgt gccgcgtcct cgggcatctc gcgtgccgcc 3600
tcggcacgcg cgtacggggc gagcacggta gccagcgccg cggcgggagc cgttgtgcca 3660
ctgggcagag agagcacggg ctgagccatg gaaaccaccg tgcgccggcg ccaccagtgt 3720
gccggcgcct gtgccgcggc ctgggccttc gcggtccgct gggcgtcctt ctgtgccgcc 3780
cgcagcgcac ggcgcacgcg gatcgcggcc aacgcctcct cttcggtccg gatgaccggc 3840
tcggtgatgg ccagccgcat catgccggcg gtctcgcggg gggcggtggc ccaacggagc 3900
aatccgacac ggggaagcgg ccggcggcct gtgccgttcg ccttgttctg tgctcggcgg 3960
acgttgacca aaccgcgctc gaagaggatg ccggcggcaa ggctcatcgc ggcgaagaac 4020
tgtggggcgc cttggtggct ttcaccacgt ggggcctgaa tccagttgaa ccaagctgag 4080
ccacccgcga atgcccagac aaggagtcgg ttgacggcgc tcgactcccc cgcatcaacg 4140
tcgttgaatg cgagcatcat cagataaagc gcggcctcat ccagggccag cggcaccagg 4200
tactccagtc ccccggtcaa tccaagggac tgcgtggcgt agtcgatcag gtgggcgtac 4260
gagatcgaag cgggcaccgc gctgaacacg aacaagaacg caaggttctt cagccggccg 4320
cgggccagta cccgcgcctt ggcggcgtcc tccgagtccg ccccttcgg ccgcatggct 4380
cggatctggg taagggcgta ggcaatggcc ttagtgccca gagtcaacgc aaggcccaga 4440
cacaccaggg ccaccaggac cgtaaccacg atccgaacag tggggtcgct caccggccct 4500
cctccatcgt gattgagccg tgtgcacgct gcccccggtc gggggccgta ccgtagaggt 4560
gcatagggag attccttctc ctggtggtga tggtccccgg g 4601

<210> 2
<211> 76
<212> PRT

<400> 2
Met Ser Asn Thr Thr Pro Thr Pro Asn Ala Leu Leu Ala Gly Ala Gln
1 5 10 15

Trp Phe Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ala Ser Gly Gly Cys Leu Glu Val
20 25 30

Ala Phe Leu Pro Gly Asp Leu Val Gly Ile Arg Asp Asn Glu Asp Leu
35 40 45

Thr Asn Pro Pro Phe Val Val Thr Lys His Val Trp Asn Cys Trp Val
50 55 60

Ala Gly Ala Lys Ala Gly Glu Phe Asp Pro Pro Ala
65 70 75

<210> 3
<211> 312
<212> PRT

<400> 3
Met Cys Ala Ala Arg Arg Gly Asp Thr Ala Asp Trp Thr Glu Ala Ser
1 5 10 15

Ala Arg Lys Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Gly Met Pro Pro Glu Pro
20 25 30

```
Thr Ser Pro Thr Val His Arg Arg Gln Leu Gly Arg Glu Leu Arg Gln
        35                  40                  45

Leu Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Ile Glu Asp Ala Ala Gln Thr Leu
    50                  55                  60

Gly Cys His Arg Ser Arg Val Ser Arg Ile Glu Asn Gly Arg Gly Gly
65                  70                  75                  80

Ala Val Ala Lys Pro Gln Asp Val Lys Asp Leu Leu Thr Leu Tyr Gly
                85                  90                  95

Val Asp Asp Ala Ile Lys Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asp
            100                 105                 110

Ser Gln Lys Pro Gly Trp Trp Glu Ser Leu Glu Phe Pro Pro Gly Leu
        115                 120                 125

Asp Ala Leu Val Gly Leu Glu Thr Asp Ala Arg Lys Glu Ser Ala Phe
    130                 135                 140

Glu Pro Leu Leu Ile Pro Gly Pro Leu Gln Val Pro Asp Tyr Ala Arg
145                 150                 155                 160

Ala Val Ile His Ala Ala Arg Ser Gln His Pro Asp Glu Val Glu Asp
                165                 170                 175

Leu Val Gln Leu Arg Asp Gly Arg Leu Arg Leu Leu Thr Arg Ser Gln
            180                 185                 190

Asn Pro Leu Glu Leu Trp Ala Val Val Asp Glu Ser Val Ile Arg Arg
        195                 200                 205

Pro Val Gly Gly Ala Arg Thr Leu Arg Asp Gln Leu Arg His Leu Met
    210                 215                 220

Glu Ile Ala Ala Leu Pro Asn Val Thr Leu Gln Val Val Pro Phe Glu
225                 230                 235                 240

Lys Glu Ser His Pro Gly Leu Gly Gly Ser Phe Ala Leu Leu Glu Phe
                245                 250                 255

Glu Asp Asp Pro Ala Val Val Tyr Val Asp Ser Met Ala Gly Asn Leu
            260                 265                 270

Tyr Leu Glu Lys Ala Arg Asp Val Arg Arg Phe Val Arg Ala Phe Asp
        275                 280                 285

Leu Leu Lys Ala Cys Ala Leu Asp Pro Asp Asp Ser Ala Ala Leu Ile
    290                 295                 300

Asn Arg Ala Ala Lys Glu Ser Lys
305                 310


<210> 4
<211> 502
<212> PRT

<400> 4
Val Ser Asp Pro Thr Val Arg Ile Val Val Thr Val Leu Val Ala Leu
  1               5                  10                  15

Val Cys Leu Gly Leu Ala Leu Thr Leu Gly Thr Lys Ala Ile Ala Tyr
             20                  25                  30

Ala Leu Thr Gln Ile Arg Ala Met Arg Pro Lys Gly Ala Asp Ser Glu
        35                  40                  45
```

Asp Ala Ala Lys Ala Arg Val Leu Ala Arg Gly Arg Leu Lys Asn Leu
50 55 60

Ala Phe Leu Phe Val Phe Ser Ala Val Pro Ala Ser Ile Ser Tyr Ala
65 70 75 80

His Leu Ile Asp Tyr Ala Thr Gln Ser Leu Gly Leu Thr Gly Gly Leu
85 90 95

Glu Tyr Leu Val Pro Leu Ala Leu Asp Glu Ala Ala Leu Tyr Leu Met
100 105 110

Met Leu Ala Phe Asn Asp Val Asp Ala Gly Glu Ser Ser Ala Val Asn
115 120 125

Arg Leu Leu Val Trp Ala Phe Ala Gly Gly Ser Ala Trp Phe Asn Trp
130 135 140

Ile Gln Ala Pro Arg Gly Glu Ser His Gln Gly Ala Pro Gln Phe Phe
145 150 155 160

Ala Ala Met Ser Leu Ala Ala Gly Ile Leu Phe Glu Arg Gly Leu Val
165 170 175

Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Lys Ala Asn Gly Thr Gly Arg Arg Pro
180 185 190

Leu Pro Arg Val Gly Leu Leu Arg Trp Ala Thr Ala Pro Arg Glu Thr
195 200 205

Ala Gly Met Met Arg Leu Ala Ile Thr Glu Pro Val Ile Arg Thr Glu
210 215 220

Glu Glu Ala Leu Ala Ala Ile Arg Val Arg Arg Ala Leu Arg Ala Ala
225 230 235 240

Gln Lys Asp Ala Gln Arg Thr Ala Lys Ala Gln Ala Ala Ala Gln Ala
245 250 255

Pro Ala His Trp Trp Arg Arg Arg Thr Val Val Ser Met Ala Gln Pro
260 265 270

Val Leu Ser Leu Pro Ser Gly Thr Thr Ala Pro Ala Ala Ala Leu Ala
275 280 285

Thr Val Leu Ala Pro Tyr Ala Arg Ala Glu Ala Ala Arg Glu Met Pro
290 295 300

Glu Asp Ala Ala His Pro Leu Ala Leu Glu Pro Leu Leu Thr Glu Ala
305 310 315 320

Ala Gln Ile Ala Pro Pro Ala Glu Ala Gln Ala Gln His Glu Ala Phe
325 330 335

Ala Ala Tyr Val Glu Gln Val Glu Glu Leu Ala Asn Arg Thr Glu Gln
340 345 350

Val Leu Ala Gly His Gly Thr Ala His Ala Gln Pro Leu Pro Gln Gln
355 360 365

Arg Ala Glu Gln Arg Glu Leu Glu Cys Phe Thr Gly Asp Ala Asp Gln
370 375 380

Asp Ala Gly Asp Val Pro Glu Ser Thr Gly Ala Gly Arg Thr Ala Ala
385 390 395 400

Ala Arg Gly Ala Ala Glu Pro Arg Ile Thr Val Arg Leu Gln Asp Asp

405 410 415

Glu Pro Gly Asn Thr Glu Pro Glu Ala Ala Asp Glu Asp Asp Ala Asp
420 425 430

Glu Pro Ala Ala Gly Asp Val Pro Asp Leu Ser Ala Tyr Ser Thr Lys
435 440 445

Lys Ala Ala Leu Leu Ala Leu Tyr Asp Ala Thr Ile Lys Pro Gly Asp
450 455 460

Pro Arg Thr Thr Asn Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Thr Arg Leu Lys
465 470 475 480

Val Gln Gly Ile Thr Tyr Asp Arg Ala Ala Ala Asn Arg Ala Val Ala
485 490 495

Glu Arg His Lys Ser Ala
500

<210> 5
<211> 355
<212> PRT

<400> 5
Met Thr Pro Ala His Arg Pro Val Ala Gln Thr Val Pro Ser Val Pro
1 5 10 15

Arg Val Cys His Gln Thr Leu Val Gly Gly Arg Val Asn Asp Asp Arg
20 25 30

Gly Thr Ser Ala Lys Pro Pro Ala Asp Ala Thr Ala His Gly Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Arg Leu Ala Val Ala Glu Gly Arg Ile Arg Arg Ser Leu His
50 55 60

Leu His Ala Arg Ile Glu Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ala Lys Ala Gln
65 70 75 80

Gln Asp Ala Gln Thr Ala Arg Ala Glu Ser Ala Gly Ala Arg Ala Ala
85 90 95

Ala Glu Trp Ala Glu Arg Glu Ala Glu Ala Ala Arg Gln Asp Ala Asp
100 105 110

Glu His Arg Glu Gln Thr Glu Arg Leu Glu Ala Glu Gly Gly Arg Leu
115 120 125

Arg Gly Glu Leu Glu Gln Ala Arg Gln Gln Leu Ala Glu Leu His Gln
130 135 140

Glu Leu Gln Glu Thr Arg Glu Arg Thr Ala Ala Glu Leu His Thr Ala
145 150 155 160

Arg Glu Ala Gln Arg Cys Ala Glu Gly Ala Arg Ala Ala Ala Leu Glu
165 170 175

Leu Gly His Gln Ala Gln Arg Ala Ala Gln Glu Ala His Ala Gln Ala
180 185 190

Gln Thr Ala Arg Glu Gln Leu Ala Val Glu Arg Thr Ala Arg Glu Ala
195 200 205

Ala Glu Gln Arg Ala Ala Gln Ala Glu Gln Gln Leu Thr Glu Cys Ala
210 215 220

Glu Glu Ala Gln Arg His Lys Arg Ala Glu Ala Ala Cys Ala Lys Glu
225 230 235 240

Ala Gln Arg Glu Leu Thr Ala Ala Arg Ala Glu Ala His Arg Glu Lys
245 250 255

Glu Ala Arg Thr Ala Ala Glu Glu Gln Ala His Arg Asp Arg Glu Glu
260 265 270

Gly Ala Arg Arg Val Glu Gln Ala Arg His Glu Ala Glu Glu Ala Arg
275 280 285

Thr Val Ala Ala Val Asp Arg Ala Ala Val Glu Glu Ser Arg Gln Asp
290 295 300

Ala Arg His Arg Ile Ala Val Leu Arg Ala Glu Ile Glu Gln Thr Gln
305 310 315 320

His Ala Val Glu Pro Pro Ala Glu Ser Arg Pro Pro Ser Thr Thr Gly
325 330 335

Lys Ala Pro Arg Asn Val Val Ala Thr Thr Thr Lys Lys Lys Arg Arg
340 345 350

Lys Arg Lys
355

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/01698

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/31, C12N1/21 // (C12N15/31, C12R1:465), (C12N1/21, C12R1:465)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/31, C12N1/21

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	Takagi H. et al., "Isolation and sequence analysis of plasmid pNO33 in the epsilon-poly-lisine-producing actinomycete Streptomyces albulus IFO14147", Journal of Bioscience and Bioengineering, (Jan,2000), Vol. 89, No. 1, p.94-96	1-6
A	JP, 10-210995, A (CHISSO CORPORATION), 11 August, 1998 (11.08.98) (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 June, 2000 (13.06.00)	11 July, 2000 (11.07.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０１６９８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7]　C12N15/31, C12N1/21 // (C12N15/31, C12R1:465), (C12N1/21, C12R1:465)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7]　C12N15/31, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P,A	Takagi H.et al."Isolation and sequence analysis of plasmid pNO33 in the epsilon-poly-lisine-producing actinomycete Streptomyces albulus IFO14147" Journal of Bioscience and Bioengineering,(Jan,2000) 第89巻 第1号, p.94-96	1-6
A	JP,10-210995,A （チッソ株式会社）11.8月.1998 (11.08.98) ファミリーなし	1-6

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１３．０６．００	11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	加藤　浩　印	４Ｂ	９０５０
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		