

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3553948号

(P3553948)

(45) 発行日 平成16年8月11日(2004.8.11)

(24) 登録日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(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 9/88

C 1 2 N 9/88

// C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 13 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-511305
 (86) (22) 出願日 平成6年10月15日(1994.10.15)
 (65) 公表番号 特表平9-506765
 (43) 公表日 平成9年7月8日(1997.7.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1994/003399
 (87) 国際公開番号 WO1995/010618
 (87) 国際公開日 平成7年4月20日(1995.4.20)
 審査請求日 平成13年7月16日(2001.7.16)
 (31) 優先権主張番号 9321301.5
 (32) 優先日 平成5年10月15日(1993.10.15)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

微生物の受託番号 NCIMB 40652
 微生物の受託番号 NCIMB 40653
 微生物の受託番号 CCAP 1373/1

(73) 特許権者
 ダニスコ エイ/エス
 デンマーク国 コペンハーゲン ケイ デ
 ィーケー 1001, ピー. オー. ボッ
 クス 17, ランゲプロガード 1

(74) 代理人
 弁理士 山本 秀策

(72) 発明者
 ユ, シュークン
 スウェーデン国 マルモ エスー 212
 40, グナー ヘジデマンス ガータ 2
 9

(72) 発明者
 ボジュセン, カーステン
 デンマーク国 アレロッド ディーケー
 3450, フビデフスベ 13

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 菌類感染藻類由来の α -1, 4-グルカンリアーゼ、その精製、遺伝子クローニングおよび微生物における発現

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵素 α -1,4-グルカンリアーゼ(GL)の調製方法であって、該酵素を菌類感染藻類から単離する工程を包有し、該酵素が、 α -1,4-グルカンリアーゼ活性を有する、配列番号1または配列番号2あるいは1個またはいくつかのアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するそれらの変異体のアミノ酸配列を有する、方法。

【請求項2】

前記酵素が、該酵素により分解されないゲルを用いて単離および/またはさらに精製される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ゲルが、デキストリンまたはその誘導体に基づく、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

α -1,4-グルカンリアーゼ活性を有する、配列番号1または配列番号2あるいは1個またはいくつかのアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するそれらの変異体のアミノ酸配列を有するGL酵素であって、該酵素が請求項1から3のいずれか1項に記載の方法により調製される、GL酵素。

【請求項5】

α -1,4-グルカンリアーゼ活性を有する、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列、あるいは1個またはいくつかのアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するそれらの変異体を含む酵素。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の酵素 α -1,4-グルカンリアーゼをコードするヌクレオチド配列。

【請求項 7】

前記配列が DNA 配列である、請求項 6 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 8】

前記 DNA 配列が、配列番号 3 または配列番号 4 に同一または相補的であるか、あるいは配列番号 3 または配列番号 4 のコドンのうちのいずれかについて適正なコドン置換を含む配列を含む、請求項 7 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 9】

請求項 6 から 8 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列を発現させる工程を包含する、酵素 α -1,4-グルカンリアーゼの調製方法。

【請求項 10】

前記藻類が *Gracilariopsis lemaneiformis* である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

DNA 配列が、配列番号 3 または配列番号 4 に同一または相補的であるか、あるいは配列番号 3 または配列番号 4 のコドンのうちのいずれかについて適正なコドン置換を含む配列を含む、ヌクレオチド配列。

【請求項 12】

前記ゲルがシクロデキストリンに基づく、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

前記シクロデキストリンが β -シクロデキストリンである、請求項 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は酵素、特に α -1,4-グルカンリアーゼ（「GL」）酵素に関する。本発明はまた同酵素を抽出する方法に関する。本発明はまた、 α -1,4-グルカンリアーゼをコードするヌクレオチド配列に関する。

FR-A-2617502 および Baute ら、(Phytochemistry [1988] vol.27 No.11 pp3401-3403) は *Morchella vulgaris* における 1,5-D-アナンヒドロフルクトース（「AF」）の見かけの酵素反応による産生について報告している。この AF の生産量は非常に少ない。可能な酵素反応に言及しているのにもかかわらず、これらの 2 つの文献は、ヌクレオチド配列の情報はもちろんのこと、いかなる酵素についてのアミノ酸配列も示していない。これらの文献は、AF が抗生物質ピロンミクロテシン (pyrone microthecin) の調製のための前駆体になり得ることを報告する。

Yu ら、(Biochimica et Biophysica Acta [1993] vol 1156 pp313-320) は紅海藻からの GL の調製および AF を生産するために α -1,4-グルカンリアーゼを分解する GL の使用について報告している。この AF の生産量は非常に少ない。GL 酵素に言及するのにも関わらず、この文献は同酵素をコードするヌクレオチド配列の情報はもちろんのことその酵素についてのいかなるアミノ酸配列データも示していない。この文献は GL の供給源は藻類であることも示唆している。

本発明では、菌類感染藻類から酵素を単離する工程を包含する、酵素 α -1,4-グルカンリアーゼの調製方法が提供される。

好ましくは、この酵素を、同酵素により分解されないゲルを用いて単離および／またはさらに精製する。

好ましくはゲルはデキストリン、好ましくは、 β -シクロデキストリン、またはその誘導体、好ましくはシクロデキストリン、より好ましくは β -シクロデキストリンに基づく。

本発明では、本発明の方法により調製された GL 酵素も提供する。

好ましくは、酵素は配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列、あるいはその任意の変異体を含む。

10

20

30

40

50

用語「その任意の変異体」は、その結果として生じる酵素がリアーゼ活性を有するという条件で、配列からの、あるいは配列に対しての、任意の少なくとも1アミノ酸の置換、多様性、修飾、置き換え、欠失、または付加を意味する。

本発明では、酵素 α -1,4-グルカンリアーゼをコードするヌクレオチド配列を提供する。好ましくはここで配列はその天然環境にはない（すなわち、酵素を発現する細胞生物の天然のゲノムの一部を形成しない）。

好ましくはヌクレオチド配列はDNA配列である。

好ましくはDNA配列は、配列番号3または配列番号4の任意のDNA配列に同じ、または相補的、あるいは実質的相同性を有する、もしくは任意の適切なコドン置換を含む配列を包含する。

10

表現「実質的相同性」は、構造および／またはヌクレオチド成分および／または生物学的活性に関しての相同性を含有する。

表現「任意の適正なコドン置換を含む」は、生じる酵素がリアーゼ活性を有するという条件で、同じアミノ酸をコードする他のコドンとの任意のコドンの置き換えまたは置換、あるいはコドンの任意の付加または削除を包含する。

他の言葉で言えば、本発明はまた、その中で少なくとも1ヌクレオチドが欠失、置換または修飾される、あるいはその中で付加的な少なくとも1ヌクレオチドが挿入され、グルカンリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、修飾されたDNA配列を含有する。好ましくは酵素は、増加したリアーゼ活性を有する。

本発明では、本発明のヌクレオチド配列を発現することを含む酵素 α -1,4-グルカンリアーゼの調製方法も提供する。

20

本発明では酵素、好ましくはGLを精製するための β -シクロデキストリンの使用を提供する。

本発明では、少なくともDNA配列が、配列番号3または配列番号4の任意のDNA配列に同一、または相補的、または実質的相同性を有する、または適切なコドン置換を含む配列を含む、ヌクレオチド配列を提供する。好ましくは配列は単離された形態である。

本発明の鍵となる局面は、GLが菌類感染藻類に由来するという認識である。GLをコードする核酸配列の決定に加え、GLのアミノ酸配列が決定されたのはこれが初めてである。それゆえ、本発明の鍵となる有利性は、GLが今や例えば組換えDNA技術により大量に生成し得、それゆえ、抗生物質ミクロテシンなどの化合物を容易に、そして大量に生成し得ること

30

である。この酵素は、好ましくは精製を容易にするように分泌されるべきである。そのために成熟酵素をコードするDNAを、選択した宿主由来のシグナル配列、プロモーターおよびターミネーターに融合させる。

*Aspergillus niger*における発現のため、gpdA (*Aspergillus nidulans*のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子由来) プロモーターおよびシグナル配列を成熟リアーゼをコードするDNA (例えば配列番号3または配列番号4) の5'末端に融合する。*A. niger*のtrpC遺伝子のターミネーター配列をその遺伝子の3'末端におく (Punt, P. J. ら、(1991): J. Biotech. 17, 19-34)。この構築物を *E. coli* のための複製起点および選択オリジンならびに *A. niger* のための選択マーカーを含むベクターに挿入する。*A. niger* のための選択マーカーの例としては、amdS 遺伝子、argB 遺伝子、pyrG 遺伝子、hygB 遺伝子、BmlR 遺伝子などがあり、すべて形質転換体の選択に用いられてきた。このプラスミドを *A. niger* に形質転換し得、そして成熟リアーゼを形質転換体の培養液中から回収し得る。

40

この構築物を、培養液中でのリアーゼのタンパク質分解を減少させるためにプロテアーゼ欠損株に形質転換し得る (Archer D.B. ら、(1992): Biotechnol. Lett. 14, 357-362)。

他の有利性は以下の記載により明らかになる。

それゆえ、本発明は、例えば、菌類感染藻類、好ましくは中国で収集可能であるタイプ (例えば、*Gracilariopsis lemaneiformis*) のような菌類感染紅藻類からの酵素 α -1,4-グルカンリアーゼの単離に関する。菌類感染藻類の一例をブダペスト条約に従い寄託した (以下を参照のこと)。

50

インサイチュハイブリダイゼーション技術を用いることにより、酵素GLは菌類感染紅藻類 *Gracilariopsis lemaneiformis* 中で検出されることが確立された。この観察を支持する更なる証拠は、サザンハイブリダイゼーション実験の結果により提供された。このようにGL酵素活性は、従来考えられていた藻類よりもむしろ、菌類感染藻類から得られ得る。特に問題となるのは、各々がGLの特性を有する酵素をコードする2つの天然のDNA配列の発見である。これらのDNA核酸配列の塩基配列を決定し、これらを配列番号3および配列番号4に示す（後に考察し示す）。

最初の酵素精製はYuら（前出）に記載の方法により行い得る。しかし、最初の酵素精製が精製工程で分解しない固体支持体の使用を含むことが好ましい。このゲル支持体は、標準的な実験室のタンパク質精製設備と適合性であるという有利性を有する。この好ましい精製のプロセスの詳細は後述する。精製はタンパク質精製のための公知の標準的な方法により終結される。酵素の純度を補足的な電気泳動技術を用いて確立した。

精製したリアーゼは、pI、至適温度および至適pHにより特性づけられた。この点については、この酵素は以下のような特性を有する：アミロペクチンを使用した場合、至適基質特性および至適pH3.5~7.5;至適温度50℃およびpIは3.9。前記のように、本発明による酵素を（アミノ酸配列決定技術により部分的に）同定し、そのアミノ酸配列を後に提供する。同様に、本発明による酵素をコードするヌクレオチド配列（すなわちGL）を配列決定し、そのDNA塩基配列を後に提供する。

以下の試料をブダペスト条約に従い承認された寄託機関であるThe National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)、23 St.Machar Drive,Aberdeen ,Scotland,United Kingdom,AB2 1RYに1994年6月20日に寄託した：

プラスミドpGL1保有E.coli (NCIMB 40652) — [参考DH5α-pGL1] ；および
プラスミドpGL2保有E.coli (NCIMB 40653) — [参考DH5α-pGL2] 。

以下の試料はブダペスト条約に従い承認された寄託機関であるThe Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)、Dunstaffnage Marine Laboratory PO Box 3,Oban,Argyll,Scotland,United Kingdom,PA34 4ADに1994年10月11日に寄託の承認がされた。

菌類感染*Gracilariopsis lemaneiformis* (CCAP 1373/1) — [参考GLQ-1 (Qingdao)]

。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物NCIMB 40652または寄託物NCIMB 40653の対象であるプラスミドに存在するGLコード配列の発現により取得し得るGL酵素；
および寄託物CCAP 1373/1の対象である菌類感染藻類から取得し得るGL酵素を包含する。

本発明はここで実施例によってのみ記載される。

以下の実施例において、添付する以下の図に言及する：

図1は、染色した菌類感染藻類を示す；

図2は、染色した菌類感染藻類を示す；

図3は、菌類菌糸の切片を示す；

図4は、菌類感染藻類の切片を示す；

図5は、菌類感染藻類の切片を示す；

図6は、pGL1のプラスミド地図を示す；

図7は、pGL2のプラスミド地図を示す；

図8は、配列番号3で示されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図9は、配列番号1と配列番号2とのアライメント (alignment) を示す；

図10は、顕微鏡写真である。

より詳細には、図1は、*Gracilariopsis lemaneiformis*の上部および下部での菌類を表す Calcoflour White染色を示す (108×および294×)。

図2は、菌類を有する*Gracilariopsis lemaneiformis*のPAS/Anilinblue Black染色を示す。菌類は顕著により高い炭水化物を含有する。

図3は、藻類細胞の厚い壁 (w) 間で成長する二つの薄い壁の菌類菌糸 (f) の縦方向で表面付近の切片を示す顕微鏡写真である。藻類のクロロプラスト中のチラコイド膜に留意

10

20

30

40

50

(矢印)。

図4は、クローン2プローブを用いたアンチセンス検出(上列)が、次の切片のCalcofluor White染色(下列)により示される菌類に、限定されるようであることを示す(46×および108×)。

図5は、クローン2プローブを用いた強いアンチセンス検出が*Gracilariopsis lemaneiformis*内の菌類上に見出されたことを示す(294×)。

図6は、プラスミドpGL1の地図を示す。これは菌類に感染した*Gracilariopsis lemaneiformis*から作製したゲノムライブラリーから単離した3.8kbのフラグメントを含有するpBlue script II KSである。このフラグメントは α -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

10

図7は、プラスミドpGL2の地図を示す。これは菌類に感染した*Gracilariopsis lemaneiformis*から作製したゲノムライブラリーから単離した3.6kbのフラグメントを含有するpBlue script II SKである。このフラグメントは α -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

図9は、配列番号1(GL1)と配列番号2(GL2)とのアライメントを示す。GL1の総残基数は1088であり;GL2の総残基数は1091である。比較をするにあたって構造-遺伝子的マトリックス(structure-genetic matrix)を用いた(Open gapcost:10;Unit gap cost:2)図9中で、並べた二つの残基が同一であることを示す記号は「:」であり;並べた二つの残基が類似であることを示す記号は「.」である。「類似である」といわれるアミノ酸はA,S,T;D,E;N,Q;R,K;I,L,M,V;F,Y,Wである。全体で、同一が845アミノ酸(すなわち77.67%)存在し;類似が60アミノ酸(5.51%)存在する。GL1に挿入したギャップの数は3であり、GL2に挿入したギャップの数は2である。

20

図10は、藻類の壁(W)間で成長した菌糸(f)の顕微鏡写真である。藻類細胞中の紅藻デンプン(s)およびチラコイド(矢印)の粒子に留意。

以下の配列情報は後述のPCR反応のためのプライマーを生成するため、およびそれぞれのヌクレオチド配列により生成されたアミノ酸配列を検定するために用いた。

菌類感染Gracilariopsis lemaneiformis由来のペプチドから組立てたアミノ酸

配列

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala
 Ala Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn
 Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly
 Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu
 Asn Ser Thr Glu Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp
 Tyr Lys Phe Gly Pro Asp Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala

10

プライマーAおよびBを生成するために用いたアミノ酸配列(27-34) (Met Tyr
 Asn Asn Asp Ser Asn Val)

20

プライマー A

ATG TA(TC) AA(CT) AA(CT) GA(CT) TC(GATC) AA(CT) GT 128 種混合

プライマー B

ATG TA(TC) AA(CT) AA(CT) GA(CT) AG(CT) AA(CT) GT 64 種混合

プライマーCを生成するために用いたアミノ酸配列(45-50) (Gly Gly His Asp
 Gly Tyr)

30

プライマー C

TA (GATC)CC (GA)TC (GA)TG (GATC)CC (GATC)CC 256 種混合

[配列は相補鎖に対応する。]

プライマーEを生成するために用いたアミノ酸配列(74-79) (Gln Trp Tyr Lys Phe Gly)

プライマー E

GG(GATC) CC(GA) AA(CT) TT(GA) TAC CA(CT) TG 64 種混合

[配列は相補鎖に対応する。]

10

プライマーF1およびF2を生成するために用いたアミノ酸配列(1-6) (Tyr Arg Trp Gln Glu Val)

プライマー F1

TA(TC) CG(GATC) TGG CA(GA) GA(GA) GT 32 種混合

プライマー F2

TA(TC) AG(GA) TGG CA(GA) GA(GA) GT 16 種混合

20

第1のPCR増幅から得られた配列(クローン1)

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTTCCT
TCTTGGCGGC CACGACGGTT A

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly
Gly His Asp Gly

30

第2のPCR増幅から得られた配列（クローン1）

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT
TCTTGGTGGG CATGATGGAT ATCGCATTCT GTGCGCGCCT GTTGTGTGGG
AGAATTCGAC CGAACGNGAA TTGTACTTGC CCGTGCTGAC CCAATGGTAC
AAATTCGGCC C

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly
Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu
Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro

10

第3のPCR増幅から得られた配列（クローン2）

TACAGGTGGC AGGAGGTGTT GTACACTGCT ATGTACCAGA
ATGCGGCTTT CGGGAAACCG ATTATCAAGG CAGCTTCCAT
GTACGACAAC GACAGAAACG TTCGCGGCGC ACAGGATGAC
CACTTCCTTC TCGGCGGACA CGATGGATAT CGTATTTTGT
GTGCACCTGT TGTGTGGGAG AATACAACCA GTCGCGATCT
GTACTIONGCT GTGCTGACCA GTGGTACAAA TTCGGCCC

20

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala Phe Gly Lys
Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn Asp Arg Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp
Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val
Trp Glu Asn Thr Thr Ser Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys
Phe Gly

30

1. Gracilariopsis lemaneiformisの細胞学的検査

1.1.1 Gracilariopsis lemaneiformisにおける菌類感染の検出

中国で収集したGracilariopsis lemaneiformisの切片は手で切断するかまたはパラフィン包埋した試料から切断した。切片化した試料を光学顕微鏡で注意深く検査した。菌類菌糸はGracilariopsis lemaneiformis内に明確に検出された。

Gracilariopsis lemaneiformisの葉状体は、高度に整然として、ほぼ対象の特徴を示す細胞から成る。G. lemaneiformisの管状葉状体は大きい、無色の中心細胞、ならびにその周囲に伸長された、細長い楕円形の細胞、および小さい、丸い、赤く着色された周辺細胞から成る。全ての藻類細胞タイプは厚い細胞壁により特性づけられる。ほとんどの菌類菌糸は、大きな細胞の中心層および周辺層の中間相に見出される。これらの細胞は長く円筒形であるため藻類細胞と明確に区別し得る。菌糸の成長は、高度に整然とした藻類細胞の間の不規則性として観察された。最も頻繁な菌糸の方向は、藻類の葉状体の主軸に沿った向きである。中心および周辺に向かう側枝がいくつかの場合で検出される。菌糸は藻類の内性／着生第二世代と混同され得ない。

40

Calcofluor Whiteはキチンおよびセルロースを含有する組織を染色することが知られている。キチンとの反応は、4個の共有結合した末端のn-アセチルグルコサミン残基を要求する。セルロースは、いくつかの藻類では微量に存在し得るが、ほとんど高等植物に限定

50

されていることが一般に受け入れられている。さらにキチンはGracilaria内には存在しないことが公知である。

Calcofluor Whiteは切片化したGracilariopsis lemaneiformisの試料中の菌類菌糸の細胞壁に相当する領域を染色することが見出された。

紫外線下で観察すると、菌糸はGracilaria組織の淡青色の背景に対して明確な白色を示す（図1を参照のこと）。キチンはGracilariaには存在しないが、ほとんどの菌類においては細胞壁の主成分である。これらの観察に基づき、本発明者らは検査した藻類は菌類に感染していると結論する。検査したGracilariopsis lemaneiformis切片の下部の40%は、菌類菌糸に感染していることが見出された。藻類の先端では検査したGracilariopsis lemaneiformisの切片の25%が感染していることが見出された。

10

Periodic acid Schiff (PAS) およびAniline blue blackでのGracilariopsis lemaneiformis切片の染色は、藻類細胞と比較して菌類細胞内の顕著に高い炭水化物含有を示した（図2を参照のこと）。Safranin OおよびMalachit Greenは、菌類に感染した高等植物に見出されるのと同じ菌類細胞の呈色反応を示した。

Acridin OrangeとGracilariopsis lemaneiformis切片との反応は、明確に菌類の不規則な成長を示した。

1.1.2 電子顕微鏡検査

Calcofluor Whiteを用いて菌類を検出した、15 μ mの厚さの切片を有するスライドを2% OsO₄で固定し、水で洗浄し、そしてジメトキシプロパンと無水アルコールで脱水した。

アセトンとSpurr樹脂の1:1混合液の一滴をガラススライド上の各々の切片に滴下し、そして1時間後純粋な樹脂の一滴で置き換えた。樹脂を充填したゼラチン包埋カプセルを切片の表面に静置し4℃で一晩放置した。55℃で8時間重合した後、樹脂ブロックに付着した厚い切片は、液体窒素に浸すことによりスライドから分離され得た。

20

ブロックの形を整え、ミクロトーム上でダイヤモンドナイフを用いて、100nmの厚さの切片を切断した。切片を酢酸ウラニル水溶液およびクエン酸鉛で染色した。切片を電子顕微鏡内で、80kVで検討した。

この検査は光学顕微鏡での観察を確認し、リアーゼを生産する中国の株のG. lemaneiformisが菌類の寄生体あるいは共生体に感染しているというさらなる証拠を提供した。

菌類菌糸は、長さ50–100 μ mおよび直径僅か数ミクロンの管状細胞から作られている。

この細胞は隣接した細胞の間の隔壁で連続的に整列されている。時折分枝も見られる。菌糸は、壁を貫通したり細胞を損傷したりすることなく藻類葉状体の厚い細胞壁の間に成長する。このような共生関係（mycophycobiosisと呼ばれる）はいくつかの糸状海洋菌類および大きな海藻間で起こることが知られている（DonkおよびBruning, 1992—藻類中、および藻類上での水生菌類の生態学。Reisser, W. (編): Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored. Biopress Ltd., Bristol.)

30

図10の顕微鏡写真を検討すると、藻類細胞および菌類細胞の間のいくつかの違いに気付く得る。藻類の数 μ mの厚さの壁と対照的に、菌類の細胞壁は僅か100–200nmの厚さである。チラコイド膜を有するクロロプラストおよび紅藻デンブン粒子のような植物に典型的なオルガネラが、藻類細胞内には見られ得るが、菌類内には見られない。

紅藻類の細胞間の連結は壁孔プラグ (pit plug) あるいは壁孔連絡と呼ばれる特異的な構造により特徴づけられる。この構造は突起した、電子密核 (electron dense core) であり、それらは藻類分類学において重要な特徴である (Pueschel, C.M.: 紅藻類の壁孔プラグの超構造の拡張した概観. J. Phycol. 25, 625 (1989))。本発明者らの試料では、このような連絡は頻繁に藻類葉状体内で観察された。しかし、菌類の細胞の間には全く見られなかった。

40

1.2 インサイチュハイブリダイゼーション実験

インサイチュハイブリダイゼーション技術はアンチセンスリボヌクレオチド配列のmRNAへのハイブリダイゼーションの原理に基づく。この技術はmRNAが存在する顕微鏡切片中の領域を視覚化するために用いられる。この特定の場合、この技術をGracilariopsis lemaneiformis切片中の酵素 α -1,4-グルカンリアーゼを局在化するために用いた。

50

1.2.1 インサイチュハイブリダイゼーションのための³⁵S標識したプローブの調製
第3のPCR増幅からの238bpのPCRフラグメント（クローン2と呼ばれる（前記参照））をpGEM-3Zf（+）ベクター（Promega）にクローン化した。アンチセンスRNAの転写はSP6プロモーターで駆動し、センスRNAの転写はT7プロモーターで駆動した。Ribonuclease protection assay kit（Ambion）を以下のとおり改変して使用した。転写産物を6%シーケンシングゲルで泳動して、取り込まれていないヌクレオチドを除去し、T7RNA polymerase in vitro Transcription Kit（Ambion）で提供される溶出緩衝液で溶出した。アンチセンス転写産物は23の非コードヌクレオチドを含み、一方センス転写産物は39の非コードヌクレオチドを含んでいた。ハイブリダイゼーションのために10⁷cpm/mlの³⁵S標識したプローブを用いた。

10

インサイチュハイブリダイゼーションは本質的にLangedaleら（1988）に記載のように実施した。ハイブリダイゼーションの温度は45℃が至適であることが見出された。45℃で洗浄した後、切片をKodaK K-5 photographic emulsionで覆い、3日間5℃で暗所に放置した（Langedale, J.A., Rothermel, B.A. および Nelson, T. (1988) .Genes and development 2:106-115. Cold Spring Harbour Laboratoryを参照）。

α-1,4-グルカンリアーゼのmRNAに対するリボプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーション実験は、Gracilariopsis lemaneiformis内に検出された菌類の菌糸の上面および周辺に強いハイブリダイゼーションを示した（図4および5参照）。これはα-1,4-グルカンリアーゼが生産されていることを示す強い証拠であると考えられる。弱いランダムなバックグラウンド反応を両方のGracilariopsis lemaneiformisの藻類組織で検出した。この反応は、センスおよびアンチセンス両方のプローブについて観察された。菌類菌糸の上面の強い染色はアンチセンスプローブを用いたときにのみ得られた。

20

これらの結果はハイブリダイゼーションおよび洗浄の工程における45℃での標準的なハイブリダイゼーションの条件を用いて得られた。50℃では菌類の上面の染色は観察されなかったが、バックグラウンドの染色は同様であった。55℃に温度を上げることにより、センスおよびアンチセンスプローブの両方で、有意にかつ等しくバックグラウンドの染色が減衰した。

相補的染色手順を用いた細胞学的検査に基づき、Gracilariopsis lemaneiformisは菌類に感染していることが結論される。感染は、藻類組織の下部において最も顕著である。

切片化したGracilariopsis lemaneiformis試料において、インサイチュハイブリダイゼーションの結果は、ハイブリダイゼーションが菌類の感染が見い出される領域に限定されていることを明確に示す（図4参照）。この結果はα-1,4-グルカンリアーゼのmRNAがGracilariopsis lemaneiformisの菌類に感染した領域に限定されているように見えることを示す。

30

これらの観察に基づき、本発明者らは菌類に感染したGracilariopsis lemaneiformis内にα-1,4-グルカンリアーゼ活性が検出されると結論する。

2. 酵素の精製と特徴付け

菌類に感染したGracilariopsis lemaneiformis由来のα-1,4-グルカンリアーゼの精製は以下のように実施した。

2.1 材料と方法

40

藻類は濾過により回収し、0.9% NaClで洗浄した。細胞をホモゲナイゼーションによって破壊し、次いで氷上で6×3分間、50mMクエン酸-NaOH pH6.2（緩衝液A）中で超音波破碎した。細胞破片（debris）は25,000×g、40分間遠心して取り除いた。この手順で得られた上清を無細胞抽出物とみなし、8～25%の勾配ゲルで分離した後、活性染色およびウエスタンブロッティングに用いた。

2.2 β-シクロデキストリンSepharoseゲルによる分離

無細胞抽出物をあらかじめ緩衝液Aで平衡化したβ-シクロデキストリンSepharoseゲル4Bカラム（2.6×18cm）に直接かけた。このカラムを3倍量の緩衝液Aおよび1M NaClを含む2倍量の緩衝液Aで洗浄した。α-1,4-グルカンリアーゼを緩衝液A中の2%デキストリンを用いて溶出した。活性のある画分をプールし、緩衝液を20mMビスートリスプロパ

50

ン-HCl (pH7.0, 緩衝液 B) に変えた。

活性のある画分をあらかじめ緩衝液 B で平衡化した Mono Q HR 5/5 カラムにかけた。菌類のリアーゼを 0.3M NaCl の直線勾配で緩衝液 B を用いて溶出した。

β -シクロデキストリン Sepharose クロマトグラフィーの後に得られたリアーゼ調製物は、あるいは 150 μ l に濃縮し、FPLC 条件下で操作された Superose 12 カラムにかけた。

2.3 α -1,4-グルカンリアーゼ活性のアッセイならびに基質特異性、至適 pH、および至適温度決定のための条件

α -1,4-グルカンリアーゼ活性のアッセイのための反応混合液は 10mg/ml アミロペクチンおよび 25mM Mes-NaOH (pH6.0) を含んだ。反応は 30°C で 30 分間行い、3,5-デニトロサリチル酸試薬を加えて停止した。光学密度は、室温で 10 分間おいた後に 550nm で測定した。

3. 菌類感染 *Gracilariopsis lemaneiformis* 由来の α -1,4-グルカンリアーゼのアミノ酸配列決定

3.1 リアーゼのアミノ酸配列決定

リアーゼを *Clostridium histolyticum* 由来のエンドプロティナーゼ Arg-C または *Lysobacter enzymogenes* 由来のエンドプロティナーゼ Lys-C のいずれかで消化した。いずれも配列決定用グレードであり、Boehringer Mannheim, Germany から購入した。エンドプロティナーゼ Arg-C での消化のために、凍結乾燥したリアーゼ (0.1mg) を 50 μ l の 10M 尿素、50mM メチルアミン、0.1M Tris-HCl、pH7.6 に溶解した。N₂ で覆い、10 μ l の 50mM DTT および 5mM EDTA を添加し、N₂ 下 50°C で 10 分間、タンパク質を変性および還元させた。続いて、10 μ l の 50mM Tris-HCl、pH8.0 中の 1 μ g のエンドプロティナーゼ Arg-C を添加し、N₂ で覆い、消化を 37°C で 6 時間行った。次のシステインの誘導体化のために、12.5 μ l の 100mM ヨードアセトアミドを添加し、N₂ 下、暗所で室温、15 分間インキュベートした。エンドプロティナーゼ Lys-C での消化のために、凍結乾燥したリアーゼ (0.1mg) を 50 μ l の 8M 尿素、0.4M NH₄HCO₃、pH8.4 に溶解した。N₂ で覆い、5 μ l の 45mM DTT を添加した後、N₂ 下 50°C で 15 分間、タンパク質を変性および還元させた。室温まで冷却した後、5 μ l の 100mM ヨードアセトアミドを添加して、N₂ 下、暗所で室温、15 分間システインを誘導体化した。

次に、90 μ l の水および 50 μ l の 50mM tricine および 10mM EDTA、pH8.0 中の 5 μ g のエンドプロティナーゼ Lys-C を添加し、消化を N₂ 下 37°C 24 時間行った。

この結果生じたペプチドを溶媒 A (水中の 0.1% TFA) および溶媒 B (アセトニトリル中の 0.1% TFA) を用いて、VYDAC C18 カラム (0.46 $\times$ 15cm; 10 μ m; The Separations Group; California) 上の逆相 HPLC に分離した。選択したペプチドをパルス化高速液体サイクル (pulsed-liquid fast cycles) を用いて Applied Biosystems 476A シーケンサーによって配列決定する前に、Develosil C18 カラム (0.46 $\times$ 10cm; 3 μ m; Dr. Ole Schou, Novo Nordisk, Denmark) で再クロマトグラフした。

菌類に感染した *Gracilariopsis lemaneiformis* 由来の酵素からのアミノ酸配列情報を以下、特に配列番号 1、および配列番号 2 に示す。

配列番号 1 は以下を有する：

アミノ酸残基数：1088

アミノ酸組成 (シグナル配列を含む)

=====

61 Ala	15 Cys	19 His	34 Met	78 Thr
51 Arg	42 Gln	43 Ile	53 Phe	24 Trp
88 Asn	53 Glu	63 Leu	51 Pro	58 Tyr
79 Asp	100 Gly	37 Lys	62 Ser	77 Val

配列番号 2 は以下を有する：

アミノ酸残基数：1091

アミノ酸組成 (シグナル配列を含む)

10

20

30

40

50

=====

58 Ala	16 Cys	14 His	34 Met	68 Thr
57 Arg	40 Gln	44 Ile	56 Phe	23 Trp
84 Asn	47 Glu	69 Leu	51 Pro	61 Tyr
81 Asp	102 Gly	50 Lys	60 Ser	76 Val

3.2 N-末端の分析

研究により天然のグルカンリアーゼ1のN-末端配列がブロックされていることが示された。脱ブロック化を本質的にLeGendreら(1993) [タンパク質およびペプチドのSDS-PAGEによる精製;Matsudaira,P.(編) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing,第2版;Academic Press Inc.,San Diego;pp.74-101]に記載の方法に従い、PVDF膜にブロットされたグルカンリアーゼ1を無水TFAで40℃で30分間処理することにより達成した。得られた配列はTALSDKQTAであった。これはグルカンリアーゼ1のクローン由来の配列(配列番号1の51位~59位の配列)と一致し、グルカンリアーゼ1のN-末端残基がN-アセチルスレオニンであることを示す。配列番号1の1位~50位の配列はシグナル配列を表す。

4. 菌類に感染したGracilariopsis lemaneiformis由来の α -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子のDNA配列決定

4.1 分子生物学のための方法

以下の改変を加えてSaunders(1993)に記載の方法のようにDNAを単離した:ポリサッカライドを、DNAからゲル精製のかわりにELUTIP-d(Schleicher & Schuell)精製により除去した(Saunders,G.W.(1993). 紅藻類ゲノムDNAのゲル精製:PCRに有用なDNAを単離するための、安価で迅速な方法。Journal of phycology 29(2):251-254およびSchleicher & Schuell:ELUTIP-d.DNAの精製および濃縮のための迅速な方法。を参照)。

4.2 PCR

目的のDNAの調製は、Gene Amp DNA Amplification Kit(Perkin Elmer Cetus,USA)を使用し、Taqポリメラーゼを後に加え(PCRサイクルを参照のこと)、温度サイクルを以下のように変更した以外は製造業者の使用説明書に従った:

PCRサイクル:

サイクル数 C 時間(分)

1 98 5

60 5

Taqポリメラーゼおよび油の添加

35 94 1

47 2

72 3

1 72 20

4.3 PCRフラグメントのクローニング

PCRフラグメントは製造業者の使用説明書に従いpT7Blue(Novagen)にクローニングした。

4.4 DNA配列決定

二本鎖DNAはSangerら(1979)のジデオキシ法に本質的に従い、Auto Read Sequencing Kit(Pharmacia)およびPharmacia LKB A.L.F.DNAシーケンサー(参考:Sanger,F.,Nicklen,S.およびCoulson,A.R.(1979)。鎖終結インヒビターを用いたDNA配列の決定Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5497.)を用いて配列決定を行った。

配列を配列番号3および4として示す。ここで、

配列番号3は以下を有する:

総塩基数:3267。

DNA配列組成:850 A;761 C;871 G;785 T

10

20

30

40

50

配列番号 4 は以下を有する：

総塩基数：3276。

DNA配列組成：889 A；702 C；856 G；829 T

4.5 ライブラリーのスクリーニング

Stratageneより得た、 λ Zapライブラリーのスクリーニングを、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを $2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 $10 \times \text{Denhardt's}$ および $100 \mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNA中で行った以外は製造者の使用説明に従って行った。ハイブリダイゼーション溶液に 32P で標識した変性プローブを添加した。ハイブリダイゼーションは 55°C で一晩行った。フィルターを $2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中で 2 回、および $1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中で 2 回洗浄した。

10

4.6 プローブ

クローン化したPCRフラグメントを、適切な制限酵素を用いた消化により、pT7blueベクターから単離した。フラグメントをアガロースゲル電気泳動によってベクターから分離し、フラグメントをAgarase (Boehringer Mannheim) によってアガロースから精製した。フラグメントはわずか $90 \sim 240\text{bp}$ の長さであったので、単離したフラグメントを、Prime-It random primer Kit (Stratagene) またはReady to Go DNA labelling kit (Pharmacia) を用いて 32P -dCTPで標識する前にライゲーション反応に曝した。

4.7 結果

4.7.1 α -1,4-グルカンリアーゼをコードするPCR DNAフラグメントの生成

α -1,4-グルカンリアーゼ由来の、3つの重複するトリプシンペプチドのアミノ酸配列（下に示す）を、混合オリゴヌクレオチドを生成するために用いた。このオリゴヌクレオチドはPCRプライマーとして用いられ得た（前記の配列を参照）。

20

第1のPCR増幅において、プライマーA/B（前記参照）を上流のプライマーとして、プライマーC（前記参照）を下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは71塩基対である。

第2のPCR増幅において、プライマーA/Bを上流のプライマーとして、E（前記参照）を下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは161塩基対である。

第3のPCR増幅において、プライマーF1（前記参照）およびF2（前記参照）を上流のプライマーとして、Eを下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは238塩基対である。このPCR産物を 2% LMTアガロースゲルで分析し、予想される長さのフラグメントをゲルから切り出して、Agarase (Boehringer Mannheim) で処理し、そしてpT7blueベクター（Novagen）にクローン化して配列決定した。

30

第1および第2のPCR増幅由来のクローン化したフラグメントは、配列決定したペプチド（前記参照）に相当するアミノ酸をコードしていた。第3の増幅由来のクローン（前記参照）は配列決定したペプチドに対して約87%のみ相同であった。

4.7.2 クローン化したPCRフラグメントを用いたゲノムライブラリーのスクリーニング。

前記したクローンを用いたライブラリーのスクリーニングにより2つのクローンを得た。1つのクローンは配列番号4（遺伝子2）のヌクレオチド配列を含有した。他のクローンは配列番号3の配列の一部を含有した（塩基対1065から下流）（遺伝子1）。

配列番号3の5'末端（すなわち塩基対1064から上流）はGibco BRLの5'race systemを用いたRACE (rapid amplification of cDNA ends) 手順 (Michael, A.F., Michael, K.D. および Martin, G.R. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-99002) により得た。全RNAをCollingeら (Collinge, D.B., Milligan D.E.; Dow, J.M., Scofield, G. および Daniels, M.J. (1987). Plant Mol Biol 8:405-414) に従い単離した。5'raceは $1 \mu\text{g}$ の全RNAを用いて製造業者のプロトコルに従い実施した。第2の増幅由来のPCR産物をNovagenのpT7blue vectorに製造業者のプロトコルに従いクローン化した。PCRエラーを補償するために3つの独立したPCRクローンを塩基配列決定した。

40

上で記載のクローンにATG開始コドンの直前のXba IおよびNde I制限部位を補足するために以下のオリゴヌクレオチドを上流のプライマーに用いて：

GCTCTAGAGCATGTTTTCAACCCTTGCG、そして配列GL I（すなわち配列番号3）の塩基対1573-

50

1593の相補配列を含むプライマーを下流のプライマーとして用いて、追加のPCRを実施した。

遺伝子1の完全な配列（すなわち配列番号3）はStratageneのpBluescript II KS+ベクターに遺伝子の3'末端をゲノムクローン由来のBamH I-Hind IIIフラグメントとしてクローン化し、そしてさらにPCRにより生成した遺伝子の5'末端をXba I-BamH Iフラグメントとして3'末端の前にクローン化することにより生成した。

遺伝子2を、Hind III平滑末端化フラグメントとしてStratageneのpBluescript II KS+ベクターのEcoR V部位にクローン化した。3'非転写配列の一部をSac I消化により除去し、次に再結合した。Hind IIIおよびHpa I制限部位を開始ATGの直前に、Hind IIIおよびNal I消化、および以下のアニールしたオリゴヌクレオチドの存在下での再結合により導入した。

AGCTTGTTAACATGTATCCAACCCTCACCTTCGTGG

ACAATTGTACATAGGTTGGGAGTGGGAAGCACCGC

配列決定したクローン内にイントロンを見出さなかった。

クローン1タイプ（配列番号3）は100%の同一性を示して、10のペプチド配列全てと（図8参照）並べ得る。菌類に感染した藻類*Gracilariopsis lemaneiformis*から単離された遺伝子によりコードされる二つのタンパク質の配列のアライメントは約78%の同一性を示した。これは両方の遺伝子が α -1,4-グルカンリアーゼをコードすることを示す。

5. 微生物におけるGL遺伝子の発現

（例えば、*Pichia*のリアーゼ形質転換体および*Aspergillus*のリアーゼ形質転換体の分析）

GLをコードするDNA配列を微生物に導入し、高い比活性を有する酵素を大量に生産した。これに関して、遺伝子1（すなわち配列番号3）を*Pichia pastoris*で発現させるために（Invitrogenにより供給される*Pichia* Expression Kit中に記載のプロトコールに従って）*Pichia*発現ベクターpHIL-D2（AOX1プロモーターを含有する）をEcoR Iで消化し平滑末端化（Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用）したものに、Not I-Hind III平滑末端化（Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用）フラグメントとしてクローン化した。

別の実施態様では、MC遺伝子1すなわち配列番号3は、*Aspergillus niger*で発現させるために（Pallら、（1993）*Fungal Genet Newslett.* vol40 pages 59-62）、*Aspergillus*発現ベクターpBARMTE1（*Neurospora crassa*由来のメチルトリプトファン耐性プロモーターを含有する）をSma Iで消化したものに、Not I-Hind III平滑末端化フラグメント（Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用）としてクローン化した。プロトプラストはDaboussiら（*Curr Genet*（1989）Vol 15 pp453-456）に従って溶解（lysing）酵素Sigma L-2773およびリティカーゼ（lyticase）Sigma L-8012を使用して調製した。プロトプラストの形質転換はBuxtonら（*Gene*（1985）vol37 pp207-214）に記載のプロトコールに従ったが、形質転換したプロトプラストのプレーティングに関しては、0.6%の浸透圧安定化トップアガロースを使用した以外はPuntら（*Methods in Enzymology*（1992）vol216 pp447-457）により立案されたプロトコールに従った。

結果は、形質転換した*Pichia pastoris*および*Aspergillus niger*においてリアーゼ活性が観察されたことを示した。

5.1 一般的方法

無細胞抽出物の調製

細胞は9000rpm、5分間遠心することによって回収し、0.9%NaClで洗浄し、破碎（breaking）緩衝液（1mM EDTA、および5%グリセロール含有50mM K-リン酸、pH7.5）に再懸濁した。細胞はガラスビーズおよびボルテックス処理を用いて破碎した。破碎緩衝液は1mMのPMSF（プロテアーゼインヒビター）を含有した。リアーゼ抽出物（上清）を、9000rpmで5分間遠心し、次いで20,000×gで5分間遠心後得た。

アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬（DNS）によるリアーゼ活性のアッセイ

リアーゼ抽出物の1倍量を等量の4%アミノペクチン溶液と混合した。反応混合液は制御された温度でインキュベートし、そして試料は特定の間隔で取り出しAFについて分析した。

リアーゼ活性はまた、放射活性方法を使用して分析した。

反応混合液は、10 μ l の¹⁴C-デンプン溶液 (1 μ Ci; Sigma Chemicals Co.) および10 μ l のリアーゼ抽出物を含有した。反応混合液は25℃で一晩おき、その後通常のTLC系で分析した。生成された放射活性AF産生量はInstant Imager (Packard Instrument Co., Inc., Meriden, CT) を用いて検出した。

電気泳動およびウェスタンブロッティング

SDS-PAGEは8~25%勾配ゲルおよびPhastSystem (Pharmacia) を使用して行った。ウェスタンブロッティングもPhastSystemのSemidry transfer unitで実施した。

Quindao (China) で採取された紅海藻から精製されたリアーゼに対して生じた1次抗体を1:100に希釈して使用した。アルカリホスファターゼ (Dako A/S, Glostrup, Denmark) に結合したブタ抗ウサギIgGを2次抗体として使用し、1:1000に希釈して使用した。

パート1、前記構築物を含有するPichia形質転換体の分析

結果:

1. リアーゼ活性を誘導後5日目に測定し(手引き書に従い)、Bシリーズの全ての試料について活性が細胞内であることが判明した。

Bシリーズの試料	11	12	13	15	26	27	28	29	30
比活性	139	81	122	192	151	253	199	198	150

*比活性は、10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 中の2% (w/v) グリコーゲン、1% (w/v) グリセロールを含有する反応混合液中でmgタンパク質あたり、1分あたりに放出されるnmol AFとして定義する。反応温度は45℃であり; 反応時間は60分であった。

試料B27の経時変化は以下のとおりである。データをまた、図1に示す。

時間 (分)	0	10	20	30	40	50	60
比活性	0	18	54	90	147	179	253

アッセイの条件は時間の変化を除いて上記と同様である。

2. ウェスタンブロッティング分析

全ての試料のCFEは天然のリアーゼに相当する分子量を有するバンドを示した。

*Pichia pastoris*において細胞内で発現されたMCリアーゼ。

培養物の名称	比活性	*
A18	10	10
A20	32	
A21	8	
A22	8	20
A24	6	

パートII、*Aspergillus*形質転換体

結果

I. リアーゼ活性は、5日間のインキュベーション（0.2%カゼイン酵素的加水分解産物を含む最少培地）の後、アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬による分析で測定した。

1) 培養培地のリアーゼ活性の分析

培養培地に含まれる0.2%アミロペクチンとともに増殖させた35の培養物の中で、AFは2つの培養物でのみ検出された。5.4+および5.9+の培養培地はそれぞれ0.13g AF/リットルおよび0.44g/リットルを含有していた。この結果は活性なリアーゼが細胞から分泌されていることを示した。リアーゼ活性はまた、無細胞抽出物中でもまた測定可能であった。

10

20

30

2) 無細胞抽出物におけるリアーゼ活性

培養物の名称	比活性	*
5.4+	51	
5.9+	148	
5.13	99	
5.15	25	
5.19	37	

10

20

* 比活性は25℃におけるAF産生のnmol/分/mgタンパク質で定義される。+は0.2%

アミロペクチンを添加したことを示す。

結果はGLの遺伝子1がA.nigerにおいて細胞内で発現したことを示す。

形質転換したE.coliを用いた実験は (QiagenのQia express vector kitのクローニングベクターpQE30を用いた)、酵素の発現を示し、この酵素は菌類に感染したGracilariopsis

30

lemaneiformis由来の精製した酵素に対する抗体により認識された。宿主としてAspergillus nigerの代わりに、良好な発現系として公知の他の工業的に重要な微生物も使用され得る；それらの例としては以下が挙げられる。

Aspergillus oryzae, Aspergillus sp., Trichoderma sp., Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces sp., Hansenula sp., Pichia sp., Bacillus subtilis, B. amyloliquefaciens, Bacillus sp., Streptomyces sp. or E. coli.

本発明の他の好ましい実施態様は、以下のすべてを含む：本明細書に記載のDNA配列を導入した結果AF産生能力を有する形質転換された宿主生物；微生物であるこのような形質転換された宿主生物—好ましくはここで宿主生物は細菌、糸状菌、菌類および酵母からなる群から選択される；好ましくは宿主生物は以下の生物からなる群から選択される：

40

Saccharomyces, Kluyveromyces, Aspergillus, Trichoderma, Hansenula, Pichia, Bacillus, Streptomyces, Escherichia such as Aspergillus oryzae, Saccharomyces cerevisiae, bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Escherichia coli.

；同上の配列をコードするヌクレオチド配列を含有する形質転換された宿主生物によって発現される酵素 α -1,4-グルカンリアーゼと α -1,4-グルカン（例えばデンプン）の接触工程を包含する糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法、好ましくは、ここでヌクレオチド配列はDNA配列であり、好ましくはここでDNA配列は、本明細書中で先に記載の配列の1つである；本明細書が先に記載のヌクレオチド配列を含有するベクター、好ましくは、ここでベクターは複製ベクターである、好ましくは、ここでベクターはプロモーター配列から下流にヌクレオチド配列を含有する発現ベクターである、好ましくは、ベクタ

50

ーはマーカー（例えば耐性マーカー）を含有する；このようなベクターで形質転換された細胞性生物、または細胞系、；産物 α -1,4-グルカンリアーゼを産生する方法あるいは α -1,4-グルカンリアーゼをコードする任意のヌクレオチド配列、またはその部分、これは、このようなベクターで形質転換されたこのような生物（または細胞系由来の細胞）の培養および産物の回収を包含する。

本発明の他の修飾は、本発明の範囲内からそれることなく当業者に明白である。

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：

(A) 名称：ダニスコ エー／エス

10

(B) 番地：ランゲブログård

(C) 市：コペンハーゲン

(D) 州：コペンハーゲン ケー

(E) 国：デンマーク

(F) 郵便番号：DK-1001

(ii) 発明の名称：菌類感染藻類由来の α -1,4-グルカンリアーゼ、その精製、遺伝子クローニングおよび微生物における発現

(iii) 配列数：20

(iv) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピーディスク

20

(B) コンピューター：IBM PC互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントインリリース#1.0,バージョン#1.25 (EP0)

(v) 現在の出願データ：

出願番号：W0 PCT/EP94/03399

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：1088アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

30

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号1:

Met Phe Ser Thr Leu Ala Phe Val Ala Pro Ser Ala Leu Gly Ala Ser
1 5 10 15

Thr Phe Val Gly Ala Glu Val Arg Ser Asn Val Arg Ile His Ser Ala
20 25 30

Phe Pro Ala Val His Thr Ala Thr Arg Lys Thr Asn Arg Leu Asn Val
 35 40 45
 Ser Met Thr Ala Leu Ser Asp Lys Gln Thr Ala Thr Ala Gly Ser Thr
 50 55 60
 Asp Asn Pro Asp Gly Ile Asp Tyr Lys Thr Tyr Asp Tyr Val Gly Val
 65 70 75 80
 Trp Gly Phe Ser Pro Leu Ser Asn Thr Asn Trp Phe Ala Ala Gly Ser
 85 90 95
 Ser Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Trp Thr Ala Thr Met Asn Val Asn
 100 105 110
 Phe Asp Arg Ile Asp Asn Pro Ser Ile Thr Val Gln His Pro Val Gln
 115 120 125
 Val Gln Val Thr Ser Tyr Asn Asn Asn Ser Tyr Arg Val Arg Phe Asn
 130 135 140
 Pro Asp Gly Pro Ile Arg Asp Val Thr Arg Gly Pro Ile Leu Lys Gln
 145 150 155 160
 Gln Leu Asp Trp Ile Arg Thr Gln Glu Leu Ser Glu Gly Cys Asp Pro
 165 170 175
 Gly Met Thr Phe Thr Ser Glu Gly Phe Leu Thr Phe Glu Thr Lys Asp
 180 185 190
 Leu Ser Val Ile Ile Tyr Gly Asn Phe Lys Thr Arg Val Thr Arg Lys
 195 200 205
 Ser Asp Gly Lys Val Ile Met Glu Asn Asp Glu Val Gly Thr Ala Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Lys Cys Arg Gly Leu Met Phe Val Asp Arg Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Asn Ala Ile Ala Ser Val Asn Lys Asn Phe Arg Asn Asp Ala Val Lys
 245 250 255
 Gln Glu Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Glu Val Asn Cys Lys Tyr Gln Asp
 260 265 270
 Thr Tyr Ile Leu Glu Arg Thr Gly Ile Ala Met Thr Asn Tyr Asn Tyr
 275 280 285
 Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Trp Asp Leu Arg Pro Pro His His Asp
 290 295 300

10

20

30

40

Gly Ala Leu Asn Pro Asp Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr Tyr Ala Ala Pro
 305 310 315 320
 Trp Leu Ile Val Asn Gly Cys Ala Gly Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Tyr
 325 330 335
 Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Ser Tyr Met Asn Thr Gly Asp
 340 345 350
 Thr Thr Trp Asn Ser Gly Gln Glu Asp Leu Ala Tyr Met Gly Ala Gln
 355 360 365
 Tyr Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr Gly Ala Gly Gly Gly Met
 370 375 380
 Glu Cys Val Val Thr Ala Phe Ser Leu Leu Gln Gly Lys Glu Phe Glu
 385 390 395 400
 Asn Gln Val Leu Asn Lys Arg Ser Val Met Pro Pro Lys Tyr Val Phe
 405 410 415
 Gly Phe Phe Gln Gly Val Phe Gly Thr Ser Ser Leu Leu Arg Ala His
 420 425 430
 Met Pro Ala Gly Glu Asn Asn Ile Ser Val Glu Glu Ile Val Glu Gly
 435 440 445
 Tyr Gln Asn Asn Asn Phe Pro Phe Glu Gly Leu Ala Val Asp Val Asp
 450 455 460
 Met Gln Asp Asn Leu Arg Val Phe Thr Thr Lys Gly Glu Phe Trp Thr
 465 470 475 480
 Ala Asn Arg Val Gly Thr Gly Gly Asp Pro Asn Asn Arg Ser Val Phe
 485 490 495
 Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys Gln Thr Asn Ile Thr Cys
 500 505 510
 Phe Leu Arg Asn Asp Asn Glu Gly Gln Asp Tyr Glu Val Asn Gln Thr
 515 520 525
 Leu Arg Glu Arg Gln Leu Tyr Thr Lys Asn Asp Ser Leu Thr Gly Thr
 530 535 540
 Asp Phe Gly Met Thr Asp Asp Gly Pro Ser Asp Ala Tyr Ile Gly His
 545 550 555 560
 Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Val Glu Cys Asp Ala Leu Phe Pro Asp Trp
 565 570 575
 Gly Arg Pro Asp Val Ala Glu Trp Trp Gly Asn Asn Tyr Lys Lys Leu
 580 585 590
 Phe Ser Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln Asp Met Thr Val Pro Ala
 595 600 605

10

20

30

40

Met Met Pro His Lys Ile Gly Asp Asp Ile Asn Val Lys Pro Asp Gly
 610 615 620
 Asn Trp Pro Asn Ala Asp Asp Pro Ser Asn Gly Gln Tyr Asn Trp Lys
 625 630 635 640
 Thr Tyr His Pro Gln Val Leu Val Thr Asp Met Arg Tyr Glu Asn His
 645 650 655
 Gly Arg Glu Pro Met Val Thr Gln Arg Asn Ile His Ala Tyr Thr Leu
 660 665 670
 Cys Glu Ser Thr Arg Lys Glu Gly Ile Val Glu Asn Ala Asp Thr Leu
 675 680 685
 Thr Lys Phe Arg Arg Ser Tyr Ile Ile Ser Arg Gly Gly Tyr Ile Gly
 690 695 700
 Asn Gln His Phe Gly Gly Met Trp Val Gly Asp Asn Ser Thr Thr Ser
 705 710 715 720
 Asn Tyr Ile Gln Met Met Ile Ala Asn Asn Ile Asn Met Asn Met Ser
 725 730 735
 Cys Leu Pro Leu Val Gly Ser Asp Ile Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Asp
 740 745 750
 Asn Glu Asn Gln Arg Thr Pro Cys Thr Gly Asp Leu Met Val Arg Tyr
 755 760 765
 Val Gln Ala Gly Cys Leu Leu Pro Trp Phe Arg Asn His Tyr Asp Arg
 770 775 780
 Trp Ile Glu Ser Lys Asp His Gly Lys Asp Tyr Gln Glu Leu Tyr Met
 785 790 795 800
 Tyr Pro Asn Glu Met Asp Thr Leu Arg Lys Phe Val Glu Phe Arg Tyr
 805 810 815
 Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala Phe
 820 825 830
 Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn
 835 840 845
 Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp Gly
 850 855 860
 Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu Arg
 865 870 875 880
 Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro Asp
 885 890 895
 Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala Met Asn Gly Gly Asp Arg Ile
 900 905 910

10

20

30

40

Tyr Asn Tyr Pro Val Pro Gln Ser Glu Ser Pro Ile Phe Val Arg Glu
 915 920 925
 Gly Ala Ile Leu Pro Thr Arg Tyr Thr Leu Asn Gly Glu Asn Lys Ser
 930 935 940
 Leu Asn Thr Tyr Thr Asp Glu Asp Pro Leu Val Phe Glu Val Phe Pro
 945 950 955 960
 Leu Gly Asn Asn Arg Ala Asp Gly Met Cys Tyr Leu Asp Asp Gly Gly
 965 970 975
 Val Thr Thr Asn Ala Glu Asp Asn Gly Lys Phe Ser Val Val Lys Val
 980 985 990
 Ala Ala Glu Gln Asp Gly Gly Thr Glu Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asp
 995 1000 1005
 Cys Tyr Glu Tyr Val Phe Gly Gly Pro Phe Tyr Val Arg Val Arg Gly
 1010 1015 1020
 Ala Gln Ser Pro Ser Asn Ile His Val Ser Ser Gly Ala Gly Ser Gln
 1025 1030 1035 1040
 Asp Met Lys Val Ser Ser Ala Thr Ser Arg Ala Ala Leu Phe Asn Asp
 1045 1050 1055
 Gly Glu Asn Gly Asp Phe Trp Val Asp Gln Glu Thr Asp Ser Leu Trp
 1060 1065 1070
 Leu Lys Leu Pro Asn Val Val Leu Pro Asp Ala Val Ile Thr Ile Thr
 1075 1080 1085

10

20

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:1091アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:タンパク質

(xi) 配列:配列番号2:

Met Tyr Pro Thr Leu Thr Phe Val Ala Pro Ser Ala Leu Gly Ala Arg
 1 5 10 15
 Thr Phe Thr Cys Val Gly Ile Phe Arg Ser His Ile Leu Ile His Ser
 20 25 30
 Val Val Pro Ala Val Arg Leu Ala Val Arg Lys Ser Asn Arg Leu Asn
 35 40 45
 Val Ser Met Ser Ala Leu Phe Asp Lys Pro Thr Ala Val Thr Gly Gly
 50 55 60

30

40

Lys Asp Asn Pro Asp Asn Ile Asn Tyr Thr Thr Tyr Asp Tyr Val Pro
65 70 75 80

Val Trp Arg Phe Asp Pro Leu Ser Asn Thr Asn Trp Phe Ala Ala Gly
85 90 95

Ser Ser Thr Pro Gly Asp Ile Asp Asp Trp Thr Ala Thr Met Asn Val
100 105 110

Asn Phe Asp Arg Ile Asp Asn Pro Ser Phe Thr Leu Glu Lys Pro Val
115 120 125

Gln Val Gln Val Thr Ser Tyr Lys Asn Asn Cys Phe Arg Val Arg Phe
130 135 140

Asn Pro Asp Gly Pro Ile Arg Asp Val Asp Arg Gly Pro Ile Leu Gln
145 150 155 160

Gln Gln Leu Asn Trp Ile Arg Lys Gln Glu Gln Ser Lys Gly Phe Asp
165 170 175

Pro Lys Met Gly Phe Thr Lys Glu Gly Phe Leu Lys Phe Glu Thr Lys
180 185 190

Asp Leu Asn Val Ile Ile Tyr Gly Asn Phe Lys Thr Arg Val Thr Arg
195 200 205

Lys Arg Asp Gly Lys Gly Ile Met Glu Asn Asn Glu Val Pro Ala Gly
210 215 220

Ser Leu Gly Asn Lys Cys Arg Gly Leu Met Phe Val Asp Arg Leu Tyr
225 230 235 240

Gly Thr Ala Ile Ala Ser Val Asn Glu Asn Tyr Arg Asn Asp Pro Asp
245 250 255

Arg Lys Glu Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Glu Val Asn Cys Glu Phe Trp
260 265 270

Asp Ser Glu Gln Asn Arg Asn Lys Tyr Ile Leu Glu Arg Thr Gly Ile
275 280 285

Ala Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Tyr Asn Tyr Asn Gln Ser Asp
290 295 300

Leu Ile Ala Pro Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Phe Tyr Ile Pro Met
305 310 315 320

Tyr Phe Ala Ala Pro Trp Val Val Val Lys Gly Cys Ser Gly Asn Ser
325 330 335

Asp Glu Gln Tyr Ser Tyr Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Thr
 340 345 350
 Tyr Met Asn Thr Gly Gly Thr Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Asn Leu
 355 360 365
 Ala Tyr Met Gly Ala Gln Cys Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr
 370 375 380
 Gly Asp Gly Asp Gly Leu Glu Asp Val Val Gln Ala Phe Ser Leu Leu
 385 390 395 400
 Gln Gly Lys Glu Phe Glu Asn Gln Val Leu Asn Lys Arg Ala Val Met
 405 410 415
 Pro Pro Lys Tyr Val Phe Gly Tyr Phe Gln Gly Val Phe Gly Ile Ala
 420 425 430
 Ser Leu Leu Arg Glu Gln Arg Pro Glu Gly Gly Asn Asn Ile Ser Val
 435 440 445
 Gln Glu Ile Val Glu Gly Tyr Gln Ser Asn Asn Phe Pro Leu Glu Gly
 450 455 460
 Leu Ala Val Asp Val Asp Met Gln Gln Asp Leu Arg Val Phe Thr Thr
 465 470 475 480
 Lys Ile Glu Phe Trp Thr Ala Asn Lys Val Gly Thr Gly Gly Asp Ser
 485 490 495
 Asn Asn Lys Ser Val Phe Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys
 500 505 510
 Gln Thr Asn Val Thr Cys Phe Leu Arg Asn Asp Asn Gly Gly Ala Asp
 515 520 525
 Tyr Glu Val Asn Gln Thr Leu Arg Glu Lys Gly Leu Tyr Thr Lys Asn
 530 535 540
 Asp Ser Leu Thr Asn Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Asp Gly Pro Ser
 545 550 555 560
 Asp Ala Tyr Ile Gly His Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Gly Asn Cys Asp
 565 570 575
 Ala Leu Phe Pro Asp Trp Gly Arg Pro Gly Val Ala Glu Trp Trp Gly
 580 585 590
 Asp Asn Tyr Ser Lys Leu Phe Lys Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Met Thr Val Pro Ala Met Met Pro His Lys Val Gly Asp Ala Val
 610 615 620
 Asp Thr Arg Ser Pro Tyr Gly Trp Pro Asn Glu Asn Asp Pro Ser Asn
 625 630 635 640
 Gly Arg Tyr Asn Trp Lys Ser Tyr His Pro Gln Val Leu Val Thr Asp
 645 650 655

10

20

30

40

Met Arg Tyr Glu Asn His Gly Arg Glu Pro Met Phe Thr Gln Arg Asn
 660 665 670
 Met His Ala Tyr Thr Leu Cys Glu Ser Thr Arg Lys Glu Gly Ile Val
 675 680 685
 Ala Asn Ala Asp Thr Leu Thr Lys Phe Arg Arg Ser Tyr Ile Ile Ser
 690 695 700
 Arg Gly Gly Tyr Ile Gly Asn Gln His Phe Gly Gly Met Trp Val Gly
 705 710 715 720
 Asp Asn Ser Ser Ser Gln Arg Tyr Leu Gln Met Met Ile Ala Asn Ile
 725 730 735
 Val Asn Met Asn Met Ser Cys Leu Pro Leu Val Gly Ser Asp Ile Gly
 740 745 750
 Gly Phe Thr Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Val Cys Pro Gly Asp Leu Met
 755 760 765
 Val Arg Phe Val Gln Ala Gly Cys Leu Leu Pro Trp Phe Arg Asn His
 770 775 780
 Tyr Gly Arg Leu Val Glu Gly Lys Gln Glu Gly Lys Tyr Tyr Gln Glu
 785 790 795 800
 Leu Tyr Met Tyr Lys Asp Glu Met Ala Thr Leu Arg Lys Phe Ile Glu
 805 810 815
 Phe Arg Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn
 820 825 830
 Ala Ala Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn
 835 840 845
 Asp Arg Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp Asp His Phe Leu Leu Gly Gly
 850 855 860
 His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Thr
 865 870 875 880
 Thr Ser Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys Phe
 885 890 895
 Gly Pro Asp Tyr Asp Thr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Leu Asp Gly Gly
 900 905 910
 Gln Met Ile Lys Asn Tyr Ser Val Pro Gln Ser Asp Ser Pro Ile Phe
 915 920 925
 Val Arg Glu Gly Ala Ile Leu Pro Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Gly Ser
 930 935 940
 Asn Lys Ser Met Asn Thr Tyr Thr Asp Lys Asp Pro Leu Val Phe Glu
 945 950 955 960

10

20

30

40

Val Phe Pro Leu Gly Asn Asn Arg Ala Asp Gly Met Cys Tyr Leu Asp
 965 970 975

Asp Gly Gly Ile Thr Thr Asp Ala Glu Asp His Gly Lys Phe Ser Val
 980 985 990

Ile Asn Val Glu Ala Leu Arg Lys Gly Val Thr Thr Thr Ile Lys Phe
 995 1000 1005

Ala Tyr Asp Thr Tyr Gln Tyr Val Phe Asp Gly Pro Phe Tyr Val Arg
 1010 1015 1020

Ile Arg Asn Leu Thr Thr Ala Ser Lys Ile Asn Val Ser Ser Gly Ala
 1025 1030 1035 1040

Gly Glu Glu Asp Met Thr Pro Thr Ser Ala Asn Ser Arg Ala Ala Leu
 1045 1050 1055

Phe Ser Asp Gly Gly Val Gly Glu Tyr Trp Ala Asp Asn Asp Thr Ser
 1060 1065 1070

Ser Leu Trp Met Lys Leu Pro Asn Leu Val Leu Gln Asp Ala Val Ile
 1075 1080 1085

Thr Ile Thr
 1090

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:3267塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:二本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列:配列番号3:

ATGTTTTCAA CCCTTGCGTT TGTCGCACCT AGTGCCTGG GAGCCAGTAC CTTCGTAGGG	60
GCGGAGGTCA GGTCAAATGT TCGTATCCAT TCCGCTTTTC CAGCTGTGCA CACAGCTACT	120
CGCAAAACCA ATCGCCTCAA TGTATCCATG ACCGCATTGT CCGACAAACA AACGGCTACT	180
GCGGGTAGTA CAGACAATCC GGACGGTATC GACTACAAGA CCTACGATTA CGTCGGAGTA	240
TGGGGTTTCA GCCCCCTCTC CAACACGAAC TGGTTTGCTG CCGGCTCTTC TACCCCGGGT	300
GGCATCACTG ATTGGACGGC TACAATGAAT GTCAACTTCG ACCGTATCGA CAATCCGTCC	360
ATCACTGTCC AGCATCCCGT TCAGGTTTCTG GTCACGTCAT ACAACAACAA CAGCTACAGG	420

10

20

30

40

GTTCGCTTCA ACCCTGATGG CCCTATTCGT GATGTGACTC GTGGGCCTAT CCTCAAGCAG 480
 CAACTAGATT GGATTGGAAC GCAGGAGCTG TCAGAGGGAT GTGATCCCGG AATGACTTTC 540
 ACATCAGAAG GTTTCTTGAC TTTTGAGACC AAGGATCTAA GCGTCATCAT CTACGGAAAT 600
 TTCAAGACCA GAGTTACGAG AAAGTCTGAC GGCAAGGTCA TCATGGAAAA TGATGAAGTT 660
 GGAAGTGCAT CGTCCGGGAA CAAGTGCCGG GGATTGATGT TCGTTGATAG ATTATACGGT 720
 AACGCTATCG CTTCCGTCAA CAAGAACTTC CGCAACGACG CGGTCAAGCA GGAGGGATTC 780
 TATGGTGACG GTGAAGTCAA CTGTAAGTAC CAGGACACCT ACATCTTAGA ACGCACTGGA 840
 ATCGCCATGA CAAATTACAA CTACGATAAC TTGAACTATA ACCAGTGGGA CCTTAGACCT 900
 CCGCATCATG ATGGTGCCTT CAACCCAGAC TATTATATTC CAATGTACTA CGCAGCACCT 960
 TGGTTGATCG TTAATGGATG CGCCGGTACT TCGGAGCAGT ACTCGTATGG ATGGTTCATG 1020
 GACAATGTCT CTCAATCTTA CATGAATACT GGAGATACTA CCTGGAATTC TGGACAAGAG 1080
 GACCTGGCAT ACATGGGCGC GCAGTATGGA CCATTGACC AACATTTTGT TTACGGTGCT 1140
 GGGGGTGGGA TGGAAATGTGT GGTACACAGC TTCTCTCTTC TACAAGGCAA GGAGTTCGAG 1200
 AACCAAGTTC TCAACAAACG TTCAGTAATG CCTCCGAAAT ACGTCTTTGG TTTCTTCCAG 1260
 GGTGTTTTCG GGACTTCTTC CTTGTTGAGA GCGCATATGC CAGCAGGTGA GAACAACATC 1320
 TCAGTCGAAG AAATTGTAGA AGGTTATCAA AACAACAATT TCCCTTTCGA GGGGCTCGCT 1380
 GTGGACGTGG ATATGCAAGA CAACTGCGG GTGTTACCA CGAAGGGCGA ATTTTGGACC 1440
 GCAAACAGGG TGGTACTGG CGGGGATCCA AACAACCGAT CGGTTTTTGA ATGGGCACAT 1500
 GACAAAGGCC TTGTTTGTCA GACAAATATA ACTTGCTTCC TGAGGAATGA TAACGAGGGG 1560
 CAAGACTACG AGGTCAATCA GACGTTAAGG GAGAGGCAGT TGTACACGAA GAACGACTCC 1620
 CTGACGGGTA CGGATTTTGG AATGACCGAC GACGGCCCCA GCGATGCCTA CATCGGTCAT 1680
 CTGGACTATG GGGGTGGAGT AGAATGTGAT GCACTTTTCC CAGACTGGGG ACGGCCTGAC 1740
 GTGGCCGAAT GGTGGGGAAA TAACTATAAG AACTGTTCA GCATTGGTCT CGACTTCGTC 1800
 TGGCAAGACA TGAAGTTCC AGCAATGATG CCGCACAAAA TTGGCGATGA CATCAATGTG 1860
 AAACCGGATG GGAATTGGCC GAATGCGGAC GATCCGTCCA ATGGACAATA CAACTGGAAG 1920
 ACGTACCATC CCCAAGTGCT TGTAAGTATG ATGCGTATG AGAATCATGG TCGGGAACCG 1980
 ATGGTCACTC AACGCAACAT TCATGCGTAT AACTGTGCG AGTCTACTAG GAAGGAAGGG 2040
 ATCGTGAAAA ACGCAGACAC TCTAACGAAG TTCCGCCGTA GCTACATTAT CAGTCGTGGT 2100
 GGTACATTG GTAACCAGCA TTTCGGGGGT ATGTGGGTGG GAGACAACCT TACTACATCA 2160

10

20

30

40

AACTACATCC AAATGATGAT TGCCAACAAT ATTAACATGA ATATGTCTTG CTTGCCTCTC	2220	
GTCGGCTCCG ACATTGGAGG ATTCACCTCA TACGACAATG AGAATCAGCG AACGCCGTGT	2280	
ACCGGGGACT TGATGGTGAG GTATGTGCAG GCGGGCTGCC TGTTGCCGTG GTTCAGGAAC	2340	
CACTATGATA GGTGGATCGA GTCCAAGGAC CACGGAAAGG ACTACCAGGA GCTGTACATG	2400	
TATCCGAATG AAATGGATAC GTTGAGGAAG TTCGTTGAAT TCCGTTATCG CTGGCAGGAA	2460	
GTGTTGTACA CGGCCATGTA CCAGAATGCG GCTTTCGGAA AGCCGATTAT CAAGGCTGCT	2520	
TCGATGTACA ATAACGACTC AAACGTTTCGC AGGGCGCAGA ACGATCATTT CCTTCTTGGT	2580	10
GGACATGATG GATATCGCAT TCTGTGCGCG CCTGTTGTGT GGGAGAATTC GACCGAACGC	2640	
GAATTGTACT TGCCCGTGCT GACCCAATGG TACAAATTCG GTCCCGACTT TGACACCAAG	2700	
CCTCTGGAAG GAGCGATGAA CGGAGGGGAC CGAATTTACA ACTACCCTGT ACCGCAAAGT	2760	
GAATCACCAA TCTTCGTGAG AGAAGGTGCG ATTCTCCCTA CCCGCTACAC GTTGAACGGT	2820	
GAAAACAAAT CATTGAACAC GTACACGGAC GAAGATCCGT TGGTGTGTTGA AGTATTCCCC	2880	20
CTCGGAAACA ACCGTGCCGA CGGTATGTGT TATCTTGATG ATGGCGGTGT GACCACCAAT	2940	
GCTGAAGACA ATGGCAAGTT CTCTGTCGTC AAGGTGGCAG CGGAGCAGGA TGGTGGTACG	3000	
GAGACGATAA CGTTTACGAA TGATTGCTAT GAGTACGTTT TCGGTGGACC GTTCTACGTT	3060	
CGAGTGCGCG GCGCTCAGTC GCCGTGCAAC ATCCACGTGT CTTCTGGAGC GGGTTCTCAG	3120	
GACATGAAGG TGAGCTCTGC CACTTCCAGG GCTGCGCTGT TCAATGACGG GGAGAACGGT	3180	
GATTTCTGGG TTGACCAGGA GACAGATTCT CTGTGGCTGA AGTTGCCCAA CGTTGTTCTC	3240	
CCGGACGCTG TGATCACAAT TACCTAA	3267	30

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:3276塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:二本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列:配列番号4:

ATGTATCCAA CCCTCACCTT CGTGGCGCCT AGTGGCGTAG GGGCCAGAAC TTTCACGTGT	60	
GTGGGCATTT TTAGGTCACA CATTCTTATT CATTGGGTTG TTCCAGCGGT GCGTCTAGCT	120	
GTGCGCAAAA GCAACCGCCT CAATGTATCC ATGTCCGCTT TGTTGACAA ACCGACTGCT	180	
GTTACTGGAG GGAAGGACAA CCCGGACAAT ATCAATTACA CCACTTATGA CTACGTCCCT	240	
GTGTGGCGCT TCGACCCCT CAGCAATACG AACTGGTTTG CTGCCGGATC TTCCACTCCC	300	
GGCGATATTG ACGACTGGAC GGCGACAATG AATGTGAACT TCGACCGTAT CGACAATCCA	360	
TCCTTCACTC TCGAGAAACC GGTTTCAGGT CAGGTCACGT CATACAAGAA CAATTGTTTC	420	10
AGGGTTGCT TCAACCCTGA TGGTCCTATT CGCGATGTGG ATCGTGGGCC TATCCTCCAG	480	
CAGCAACTAA ATTGGATCCG GAAGCAGGAG CAGTCGAAGG GGTTTGATCC TAAGATGGGC	540	
TTCACAAAAG AAGGTTTCTT GAAATTTGAG ACCAAGGATC TGAACGTTAT CATATATGGC	600	
AATTTTAAGA CTAGAGTTAC GAGGAAGAGG GATGGAAAAG GGATCATGGA GAATAATGAA	660	
GTGCCGGCAG GATCGTTAGG GAACAAGTGC CGGGGATTGA TGTTTGTCGA CAGGTTGTAC	720	20
GGCACTGCCA TCGCTTCCGT TAATGAAAAT TACCGCAACG ATCCCGACAG GAAAGAGGGG	780	
TTCTATGGTG CAGGAGAAGT AAAGTGGAG TTTTGGGACT CCGAACAAAA CAGGAACAAG	840	
TACATCTTAG AACGAACTGG AATCGCCATG ACAAATTACA ATTATGACAA CTATAACTAC	900	
AACCAGTCAG ATCTTATTGC TCCAGGATAT CCTTCGGACC CGAACTTCTA CATTCCCATG	960	
TATTTTGCAG CACCTTGGGT AGTTGTTAAG GGATGCAGTG GCAACAGCGA TGAACAGTAC	1020	
TCGTACGGAT GGTATATGGA TAATGTCTCC CAACTTACA TGAATACTGG TGGTACTTCC	1080	30
TGGAAGTGTG GAGAGGAGAA CTTGGCATACT ATGGGAGCAC AGTGCGGTCC ATTTGACCAA	1140	
CATTTTGTGT ATGGTGATGG AGATGGTCTT GAGGATGTTG TCCAAGCGTT CTCTCTTCTG	1200	
CAAGGCAAAG AGTTTGAGAA CCAAGTTCTG AACAAACGTG CCGTAATGCC TCCGAAATAT	1260	
GTGTTTGGTT ACTTTCAGGG AGTCTTTGGG ATTGCTTCCT TGTTGAGAGA GCAAAGACCA	1320	
GAGGGTGGTA ATAACATCTC TGTTCAAGAG ATTGTGGAAG GTTACCAAAG CAATAACTTC	1380	
CCTTTAGAGG GGTTAGCCGT AGATGTGGAT ATGCAACAAG ATTTGCGCGT GTTACCACG	1440	40
AAGATTGAAT TTTGGACGGC AAATAAGGTA GGCACCGGGG GAGACTCGAA TAACAAGTCG	1500	
GTGTTTGAAT GGGCACATGA CAAAGGCCCT GTATGTCAGA CGAATGTTAC TTGCTTCTTG	1560	
AGAAACGACA ACGGCGGGGC AGATTACGAA GTCAATCAGA CATTGAGGGA GAAGGGTTTG	1620	

TACACGAAGA ATGACTCACT GACGAACACT AACTTCGGAA CTACCAACGA CGGGCCGAGC	1680	
GATGCGTACA TTGGACATCT GGACTATGGT GGCGGAGGGA ATTGTGATGC ACTTTTCCCA	1740	
GACTGGGGTC GACCGGGTGT GGCTGAATGG TGGGGTGATA ACTACAGCAA GCTCTTCAAA	1800	
ATTGGTCTGG ATTCGTCTG GCAAGACATG ACAGTTCAG CTATGATGCC ACACAAAGTT	1860	
GGCGACGCAG TCGATACGAG ATCACCTTAC GGCTGGCCGA ATGAGAATGA TCCTTCGAAC	1920	
GGACGATACA ATTGGAAATC TTACCATCCA CAAGTTCTCG TAACTGATAT GCGATATGAG	1980	
AATCATGGAA GGAACCGAT GTTCACTCAA CGCAATATGC ATGCGTACAC ACTCTGTGAA	2040	10
TCTACGAGGA AGGAAGGGAT TGTGCAAAT GCAGACACTC TAACGAAGTT CCGCCGCAGT	2100	
TATATTATCA GTCGTGGAGG TTACATTGGC AACCAGCATT TTGGAGGAAT GTGGGTTGGA	2160	
GACAACTCTT CCTCCCAAAG ATACCTCCAA ATGATGATCG CGAACATCGT CAACATGAAC	2220	
ATGTCTTGCC TTCCACTAGT TGGGTCCGAC ATTGGAGGTT TTACTTCGTA TGATGGACGA	2280	
AACGTGTGTC CCGGGATCT AATGGTAAGA TTCGTGCAGG CGGGTTGCTT ACTACCGTGG	2340	
TTCAGAAACC ACTATGGTAG GTTGGTCGAG GGCAAGCAAG AGGGAAAATA CTATCAAGAA	2400	20
CTGTACATGT ACAAGGACGA GATGGCTACA TTGAGAAAAT TCATTGAATT CCGTTACCGC	2460	
TGGCAGGAGG TGTGTACAC TGCTATGTAC CAGAATGCGG CTTTCGGGAA ACCGATTATC	2520	
AAGGCAGCTT CCATGTACGA CAACGACAGA AACGTTGCGG GCGCACAGGA TGACCACTTC	2580	
CTTCTCGGCG GACACGATGG ATATCGTATT TTGTGTGCAC CTGTTGTGTG GGAGAATACA	2640	
ACCAGTCGCG ATCTGTACTT GCCTGTGCTG ACCAAATGGT ACAAATTCGG CCCTGACTAT	2700	
GACACCAAGC GCCTGGATTC TGC GTTGGAT GGAGGGCAGA TGATTAAGAA CTATTCTGTG	2760	30
CCACAAAGCG ACTCTCCGAT ATTTGTGAGG GAAGGAGCTA TTCTCCCTAC CCGCTACACG	2820	
TTGGACGGTT CGAACAAGTC AATGAACACG TACACAGACA AAGACCCGTT GGTGTTTGAG	2880	
GTATTCCTC TTGGAACAA CCGTGCCGAC GGTATGTGTT ATCTTGATGA TGGCGGTATT	2940	
ACTACAGATG CTGAGGACCA TGGCAAATTC TCTGTTATCA ATGTCGAAGC CTTACGGAAA	3000	
GGTGTACGA CGACGATCAA GTTTGCGTAT GACACTTATC AATACGTATT TGATGGTCCA	3060	
TTCTACGTTG GAATCCGTAA TCTTACGACT GCATCAAAAA TTAACGTGTC TTCTGGAGCG	3120	
GGTGAAGAGG ACATGACACC GACCTCTGCG AACTCGAGGG CAGCTTTGTT CAGTGATGGA	3180	40
GGTGTGGAG AATACTGGGC TGACAATGAT ACGTCTTCTC TGTGGATGAA GTTGCCAAAC	3240	
CTGGTTCTGC AAGACGCTGT GATTACCATT ACGTAG	3276	

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:90アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:ペプチド

(xi) 配列：配列番号5:

```

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala
1           5           10           15

Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn Asp Ser
          20           25           30

Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp
          35           40           45

Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu
          50           55           60

Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro
65           70           75           80

Asp Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala
          85           90

```

10

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:23塩基対

(B) 型:核酸

20

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc_difference

(B) 存在位置:置換 (6,"")

(D) 他の情報:/記 = " NはTまたはCである "

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc_difference

(B) 存在位置:置換 (9,"")

30

(D) 他の情報:/記 = " NはCまたはTである "

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc_difference

(B) 存在位置:置換 (12,"")

(D) 他の情報:/記 = " NはCまたはTである "

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc_difference

(B) 存在位置:置換 (15,"")

(D) 他の情報:/記 = " NはCまたはTである "

(ix) 配列の特徴:

40

(A) 特徴を表す記号:misc_difference

(B) 存在位置:置換 (18,"")

(D) 他の情報:/記 = " NはGまたはAまたはTまたはCである "

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc_difference

(B) 存在位置:置換 (21,"")

(D) 他の情報:/記 = " NはCまたはTである "

(xi) 配列:配列番号6:

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特色:

50

- (A) 長さ:23塩基対
- (B) 型:核酸
- (C) 鎖の数:一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類:DNA (genomic)
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (6,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはTまたはCである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (9,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはCまたはTである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (12,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはCまたはTである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (15,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはCまたはTである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (18,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはCまたはTである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (21,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはCまたはTである ”
- (xi) 配列:配列番号7:

ATGTANAANA ANGANAGNAA NGT

23

- (2) 配列番号8の情報:
- (i) 配列の特色:
- (A) 長さ:17塩基対
- (B) 型:核酸
- (C) 鎖の数:一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状
- (ii) 配列の種類:DNA (genomic)
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (3,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはGまたはAまたはTまたはCである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (6,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはGまたはAである ”
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置:置換 (9,"")
- (D) 他の情報:/記= “ NはGまたはAである ”

10

20

30

40

50

- (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (12,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはGまたはAまたはTまたはCである ”
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (15,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはGまたはAまたはTまたはCである ”
 (xi) 配列：配列番号8:

TANCCNTCNT GNCCNCC

17

10

- (2) 配列番号9の情報：
 (i) 配列の特色：
 (A) 長さ:20塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類:DNA (genomic)
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (3,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはGまたはAまたはTまたはCである ”
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (6,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはGまたはAである ”
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (9,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはCまたはTである ”
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (12,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはGまたはAである ”
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference
 (B) 存在位置：置換 (18,"")
 (D) 他の情報:/記 = “ NはCまたはTである ”
 (xi) 配列：配列番号9:

GGNCCNAANT TNTACCANTG

20

40

- (2) 配列番号10の情報：
 (i) 配列の特色：
 (A) 長さ:17塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類:DNA (genomic)
 (ix) 配列の特徴：
 (A) 特徴を表す記号:misc_diffe
 (A) 特徴を表す記号:misc_difference

50

- (B) 存在位置：置換 (6,"")
- (D) 他の情報：/記 = “ NはGまたはAまたはTまたはCである ”
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置：置換 (12,"")
- (D) 他の情報：/記 = “ NはGまたはAである ”
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置：置換 (15,"")
- (D) 他の情報：/記 = “ NはGまたはAである ” 10
- (xi) 配列：配列番号10:
TANCGNTGGC ANGANGT 17
- (2) 配列番号11の情報：
- (i) 配列の特色：
- (A) 長さ:17塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類:DNA (genomic)
- (ix) 配列の特徴： 20
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置：置換 (3,"")
- (D) 他の情報：/記 = “ NはTまたはCである ”
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置：置換 (6,"")
- (D) 他の情報：/記 = “ NはGまたはAである ”
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 特徴を表す記号:misc_difference
- (B) 存在位置：置換 (15,"") 30
- (D) 他の情報：/記 = “ NはGまたはAである ”
- (xi) 配列：配列番号11:
TANAGNTGGC ANGANGT 17
- (2) 配列番号12の情報：
- (i) 配列の特色：
- (A) 長さ:71塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類:DNA (genomic) 40
- (xi) 配列：配列番号12:
ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT TCTTGGCGGC 60
- CACGACGGTT A** 71
- (2) 配列番号13の情報：
- (i) 配列の特色：
- (A) 長さ:23アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド 50

(xi) 配列：配列番号13:

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Gly His Asp Gly
 20

(2) 配列番号14の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:160塩基対

(B) 型:核酸

10

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列：配列番号14:

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT TCTTGGTGGG 60
 CATGATGGAT ATCGCATTCT GTGCGCGCCT GTTGTGTGGG AGAATTCGAC CGAACGGAAT 120
 TGTACTTGCC CGTGCTGACC CAATGGTACA AATTCGGCCC 160

(2) 配列番号15の情報:

(i) 配列の特色:

20

(A) 長さ:54アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:ペプチド

(xi) 配列：配列番号15:

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val
 20 25 30
 Trp Glu Asn Ser Thr Glu Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln
 35 40 45
 Trp Tyr Lys Phe Gly Pro
 50

30

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:238塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

40

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列：配列番号16:

TACAGGTGGC AGGAGGTGTT GTACACTGCT ATGTACCAGA ATGCGGCTTT CGGGAAACCG 60
 ATTATCAAGG CAGCTTCCAT GTACGACAAC GACAGAAACG TTCGCGGCGC ACAGGATGAC 120
 CACTTCCTTC TCGGCGGACA CGATGGATAT CGTATTTTGT GTGCACCTGT TGTGTGGGAG 180
 AATACAACCA GTCGCGATCT GTACTTGCCT GTGCTGACCA GTGGTACAAA TTCGGCCC 238

(2) 配列番号17の情報:

50

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:79アミノ酸

(B) 型:アミノ酸

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:ペプチド

(xi) 配列:配列番号17:

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala
1 5 10 15

Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn Asp Arg
20 25 30 10

Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp
35 40 45

Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Thr Thr Ser
50 55 60

Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys Phe Gly
65 70 75

(2) 配列番号18の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:28塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列:配列番号18:

GCTCTAGAGC ATGTTTTCAA CCCTTGCG

28

(2) 配列番号19の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:36塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列:配列番号19:

AGCTTGTTAA CATGTATCCA ACCCTCACCT TCGTGG

36

(2) 配列番号20の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:34塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:直鎖状

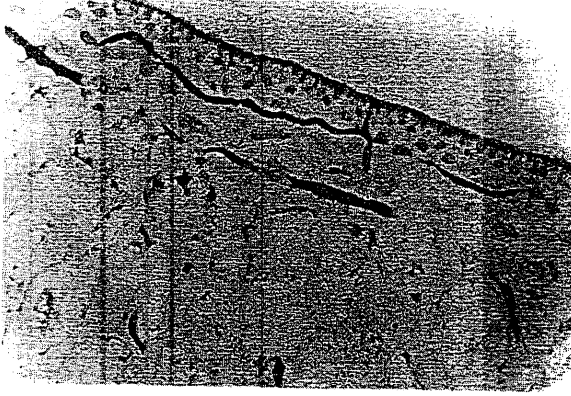
(ii) 配列の種類:DNA (genomic)

(xi) 配列:配列番号20:

ACAATTGTAC ATAGGTTGGG AGTGAAGCA CCGC

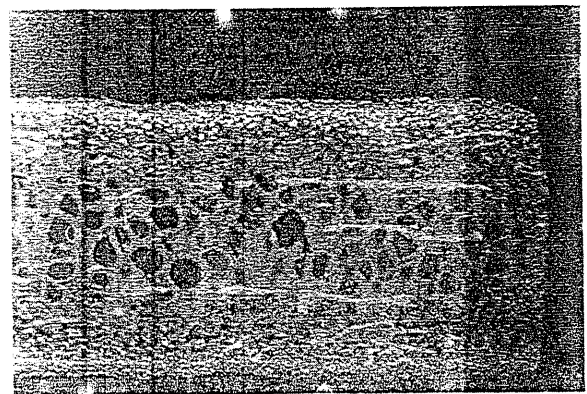
34

【図 2】



菌類を有する*Gracilaria lemaneiformis*のPAS/Anilinblue Black染色。
菌類は顕著により高い炭水化物を含有する。

【図 1】



*Gracilaria lemaneiformis*の上部および下部での菌類を表すCalcofluor
White染色。(108×および294×)。

【図 3】



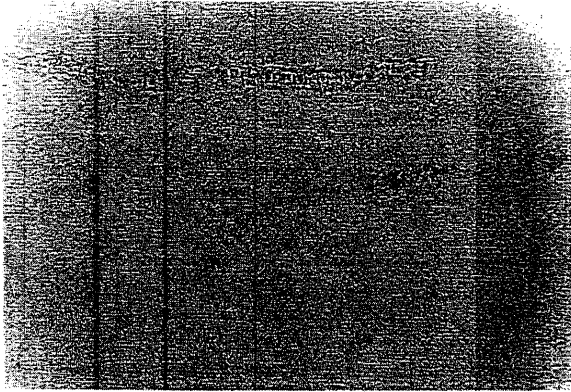
顕微鏡写真は藻類細胞の厚い壁(w)間で成長する二つの薄い壁の菌類菌糸(f)の縦方向で表面付近の切片を示す。藻類のクロロプラスト中のチコライド膜に留意(矢印)。

【図 4】



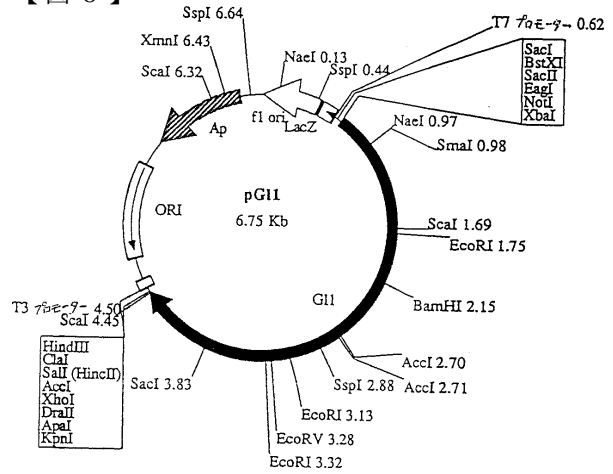
クローン2プローブを用いたアンチセンス検出(上列)は、次の切片のCalcofluor White染色(下列)により示される菌類に限定されている。(48×および108×)。

【図 5】

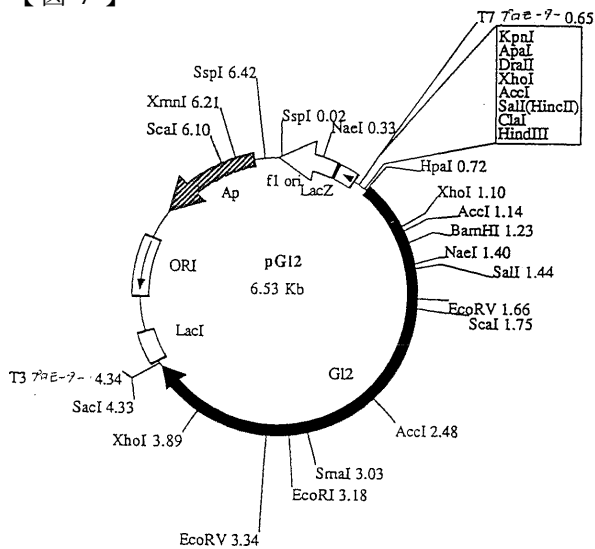


プローブ 2 を用いた強いアンチセンス検出が *Gracilaria lemaneiformis* 中の菌類上に見出される (294×)。

【図 6】



【図 7】



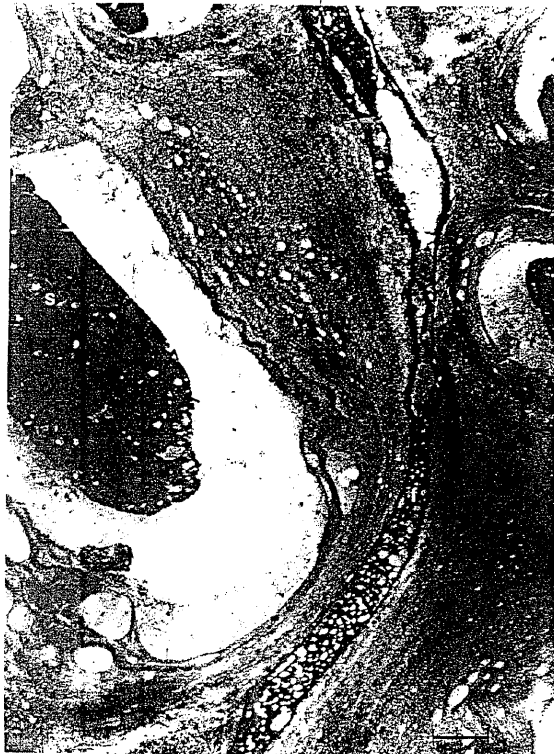
【図 8】

MFSTLAFVAP SALGASTFVG AEVRNVRH SAFFAVHTAT RKTNRLNVSM TALSDKQTAT
 AGSTDNDPGI DYKTYDYGV WGFSPLSNTN WFAAGSSTPG GITDWTATMN VNFDRIDNPS
 ITVQHPVQVQ VTSYNNNSYR VRFPDGPPIR DVTRGPILKQ QLDWIRTQEL SEGCDPGMTF
 TSEGFLTFET KDLSVIYGN FKTRVTRKSD GKVIMENDEV GTASSGNKCR GLMFVDRLYG
 NAIASVKNKF RNDVAKQEGF YGAGEVNCKY QDTYILERTG IAMTNYNYDN LNYNQWDLRP
 PHHDGALNPD YYIPMYAAP WLIVNGCAGT SEQYSYGFWM DNVSQSYMNT GDTTWSGQE
 DLAYMGAQYG PFDQHFVYGA GGMCECVTA FSLQKKEFE NQVLNKRSMV PPKYVFGFFQ
 GVFGTSSLLR AHMPAGENNI SVEEIVEGYQ NNNFPFEGLA VDVMQDNLR **VFTTKGEFWT**
ANRVGTGGDP NNRSVFEWAH DKGLVCOTNI TCFLRNDNEG ODYEVNQTLE ERQLYTKNDS
 LTGTDGMDT DGPSDAYIGH LDYGGGVECD ALFPDWGRPD VAEWGNVNYK KLFISGLDFV
 WQDMTPVAMM PHKIGDDINV KPDGNWPNAD DPSNGQYNWK TYHPQVLVTD MRVENHGREF
MYTORNHAY TLCESTRKEG IVENADTLTK FRRSYIISRG GYIGNQHFGG MWVGDNSTTS
 NYIQMMIANN INNMMSCLPL VGSIDGGFTS YDNENQRTPC TGDLMVRYVO **AGCLLPWFRN**
 HYDRWIESKD HGKDYQELYM YPNEMDTLRK FVEFPRWQE **VLYTAMYONA AFGKPIIKAA**
SMYNNDSNVR RAONDHPLIG GHGGRILCA PVVWENSTER ELVLPVLTOW **YKGFDPDFTK**
PLEGAMNGGD RIYNYVPQOS ESPIFVREGA ILPTRYTLNG ENKSLNTYTD **EDPLVFEVFP**
 LGNNRADGMC YLDDGGVTTN AEDNGKFSVV **KVAAEODGGT ETITFTNDYCY EYVFGPPFYV**
 RVRGAQSPSN IHVSSGAGSQ DMKVSSATSR **AALENDGENG DFVWDOETDS LWLKLPNVVL**
 PDAVITIT

【図 9】

GL1	- MFSTLAFVAPSAFGASTFVGAEEV-RSNVRIHSAFPAVITATKTRNLNVS -49	GL1	- YHNSNVRAQNDHFLGGHGGYRILCAPVVWENSTERELYLPVLTQWYK -892
GL2	- MYPTLTFVAPSAFGASTFVGAEEV-RSNVRIHSAFPAVITATKTRNLNVS -50	GL2	- YDNDRNVRAQNDHFLGGHGGYRILCAPVVWENSTERELYLPVLTQWYK -895
GL1	- MTALSDQKQATAGSTNDPDCIDKTYDVGVMGSPSNTNMFAGSSTP -99	GL1	- FGPDFTKPLEGAMNGDRIYNYVPVQSESPFVREGAILPTRYTLNGEN -942
GL2	- MSALFDKPTAVTGGKNDPNDINITYDYVPVVRFDPLSNTNMFAGSSTP -100	GL2	- FGPDYDKRLDSALDGGQMIKINYVPVQSDSPIFVREGAILPTRYTLNGEN -945
GL1	- GGIDQATATNHNVDNDPDCIDKTYDVGVMGSPSNTNMFAGSSTP -149	GL1	- KSLNTYTDDEPLVFEVPLGNNRAGDHCYLDGGVTTNAEDNGKFSVVKV -992
GL2	- GDIDQATATNHNVDNDPDCIDKTYDVGVMGSPSNTNMFAGSSTP -150	GL2	- KSMNTYTDKPLVFEVPLGNNRAGDHCYLDGGVTTNAEDNGKFSVVKV -995
GL1	- RDVTRGPIKQQLDNIRQDELSEGDGPGHFTTSEGLTFETKDLVVIYG -199	GL1	- AAEQDGGGTETITFTNDQCYEVFGGPFYVRVRAQSPSNHVSAGSQQH -1042
GL2	- RDVTRGPIKQQLDNIRQDELSEGDGPGHFTTSEGLTFETKDLVVIYG -200	GL2	- EALRKGVTITIKFAYDTYQYVFGGPFYVRVRIIRNLTTASKINVSAGSQQH -1045
GL1	- NFKTRVTRKSDCKVMEDEVTASSCKRCGLMVFDRLYQNAIASVKNK -249	GL1	- KVSSATSRAALFNDGENDGFVVDQETDSLWLKLPNVVLPDAVITIT -1088
GL2	- NFKTRVTRKSDCKVMEDEVTASSCKRCGLMVFDRLYQNAIASVKNK -250	GL2	- TPTSANRRAALFSDGGVGEYVADNDTSSLWMKLPNLVLDQAVITIT -1091
GL1	- FRNDVAKQSGFYAGGVNCKYQDT-----YILERTGIAMTNYNYDNLNY -293		
GL2	- FRNDVAKQSGFYAGGVNCKYQDT-----YILERTGIAMTNYNYDNLNY -300		
GL1	- NQMDLRPPHDCALNPDYIPHYAAPLIVNGCAGTS-EQYSYCWGFDH -342		
GL2	- NQMDLRPPHDCALNPDYIPHYAAPLIVNGCAGTS-EQYSYCWGFDH -348		
GL1	- VSQSYHNTGDTTNSGQEDLAYHGAQYGFDDQHFVYAGGGMCEVVTAFS -392		
GL2	- VSQSYHNTGDTTNSGQEDLAYHGAQYGFDDQHFVYAGGGMCEVVTAFS -398		
GL1	- LLQKKEFENQVLNKRSMVPPKYVFGGVTSSLLRAHMPAGENNISV -442		
GL2	- LLQKKEFENQVLNKRSMVPPKYVFGGVTSSLLRAHMPAGENNISV -448		
GL1	- EEIVEGYQNNFFFEGLAVDVMQDNLRFVTTKGEFTANRVCTGGDPNN -492		
GL2	- EEIVEGYQNNFFFEGLAVDVMQDNLRFVTTKGEFTANRVCTGGDPNN -498		
GL1	- RSVFEWAHDKGLVCQNTNITCFLRNDNGGQYEVNQTLREKGLYTKNDSLT -542		
GL2	- RSVFEWAHDKGLVCQNTNITCFLRNDNGGQYEVNQTLREKGLYTKNDSLT -548		
GL1	- GIDFGMTDGGSDAYIGHLDYGGGVECDALFDMGRPDVAEWGNNYKLL -592		
GL2	- GIDFGMTDGGSDAYIGHLDYGGGVECDALFDMGRPDVAEWGNNYKLL -598		
GL1	- FSIGLDFVWQDMTPAMPHKIGDDINVKPDGMVPHADDPSHOGYNNKTY -642		
GL2	- FSIGLDFVWQDMTPAMPHKIGDDINVKPDGMVPHADDPSHOGYNNKTY -648		
GL1	- HPQVLVTDHRYENHGREPMFTQRMHAYTLCESTRKEGIVANADTLTKFR -692		
GL2	- HPQVLVTDHRYENHGREPMFTQRMHAYTLCESTRKEGIVANADTLTKFR -698		
GL1	- RSVIISRCGYICNGHFGGMVGDNSTTSNTIQMIANNINMNMSCPLVG -742		
GL2	- RSVIISRCGYICNGHFGGMVGDNSTTSNTIQMIANNINMNMSCPLVG -748		
GL1	- SDIGGFTSYDNENQRTPTCDLMDVRYVQAGCLLPWFRNHYDRNIESKDHG -792		
GL2	- SDIGGFTSYDNENQRTPTCDLMDVRYVQAGCLLPWFRNHYDRNIESKDHG -795		
GL1	- KDYQELMYHNEHMDTLRKFEFRYRWQEVLYTAMYNQAAFGKPIIKAAASH -842		
GL2	- KDYQELMYHNEHMDTLRKFEFRYRWQEVLYTAMYNQAAFGKPIIKAAASH -845		

【図 10】



藻類の壁(W)間で成長した菌糸(f)の顕微鏡写真。藻類細胞中の紅藻デンプン(s)およびチラコイド(矢印)の粒子に留意。

バー=2 μm。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
C 1 2 R 1:84)	C 1 2 R 1:89
(C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:685)	C 1 2 R 1:84
(C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 R 1:685
(C 1 2 N 9/88	C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:84)	C 1 2 R 1:19
(C 1 2 N 9/88	C 1 2 N 9/88
C 1 2 R 1:685)	C 1 2 R 1:84
(C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 9/88
C 1 2 R 1:89)	C 1 2 R 1:685

- (72)発明者 クラフ, カーステン マシアス
デンマーク国 ヴィビー ジェイ ディーケイー 8 2 6 0, スターブトラプベ 1 3 9 エイ
- (72)発明者 ボジコ, マジャ
デンマーク国 ゲントフテ ディーケイー 2 8 2 0, フラグトパーケン 1 1
- (72)発明者 ニールセン, ジョン
デンマーク国 コペンハーゲン エス ディーケイー 2 3 0 0, エングベ 3 8
- (72)発明者 マーキュセン, ジャン
デンマーク国 コペンハーゲン ケイ ディーケイー 1 2 1 0, 2. , クナブロストラエド 2
5

審査官 斎藤 真由美

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
- C12N 15/00-90
 - C12N 9/00-99
 - C12N 1/00-7/08
 - C07K 1/00-19/00
 - C12P 21/00-08
 - MEDLINE(STN)
 - PubMed
 - BIOSIS/WPI(DIALOG)
 - SwissProt/PIR/GeneSeq
 - GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq