

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-236637

(P2004-236637A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 19/04

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 19/04

Z N A A

C

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 4

4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2003-32075 (P2003-32075)

(22) 出願日 平成15年2月10日 (2003.2.10)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(74) 代理人 100090516

弁理士 松倉 秀実

(74) 代理人 100100549

弁理士 川口 嘉之

(72) 発明者 浅原 貴之

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社内

(72) 発明者 安枝 寿

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多糖類生成に関与する遺伝子及びその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】メタノール資化性細菌の多糖類生成に関与する遺伝子、及びその利用法を提供する。

【解決手段】下記の(A)~(D)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNAを用いて、メタノール資化性細菌の多糖類生成能を、向上又は低減させる。(A)特定のアミノ酸配列を有するタンパク質。(B)(A)のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。(C)他の特定のアミノ酸配列を有するタンパク質。(D)(C)のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

下記の (A) ~ (D) のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

10

**【請求項 2】**

下記の (a) ~ (d) に示す DNA である請求項 1 に記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

(c) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA。

(d) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

**【請求項 3】**

メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の DNA。

20

**【請求項 4】**

請求項 1 に記載の遺伝子が導入され、多糖類生成能が向上したメタノール資化性細菌。

**【請求項 5】**

メチロフィラス属細菌である請求項 4 に記載の細菌。

**【請求項 6】**

請求項 4 又は 5 に記載の細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に多糖類を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から多糖類を採取することを特徴とする多糖類の製造方法。

30

**【請求項 7】**

染色体上の遺伝子であって、かつ、請求項 1 又は 2 に記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、多糖類生成能が低下したメタノール資化性細菌。

**【請求項 8】**

メチロフィラス属細菌である請求項 7 に記載の細菌。

**【請求項 9】**

請求項 7 又は 8 に記載の細菌であって、かつ、多糖類以外の目的物質を産生する細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に目的物質を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から目的物質を採取することを特徴とする、目的物質の製造方法。

40

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、微生物工業に関連したものであり、微生物の多糖類生成に関与する遺伝子とその利用法に関するものである。その遺伝子の利用は、一方で、微生物による有用多糖類の生産性を向上させ、他方で、微生物が副生する不要な多糖類合成を抑制し、その微生物が産生する目的物質の生産性を向上させ、目的物質の取得を容易にさせる。

**【0002】**

50

上記製造法は、特に、C 1 化合物、即ち、メタノールなどの炭素原子 1 個を有する化合物を資化する微生物での利用が有用である。

【 0 0 0 3 】

【 従 来 の 技 術 】

メチロフィラス属細菌での多糖類生成に関しては、B . S o u t h g a t e らは、メタノール資化性細菌メチロフィラス・メチロトロファス ( M e t h y l o p h i l u s m e t h y l o t r o p h u s ) が菌体外に多糖を生産することを報告している ( 非特許文献 1 ) 。しかしながら、メチロフィラス属細菌の多糖類生成に関与する遺伝子の構造については全く知られていない。

【 0 0 0 4 】

【 非 特 許 文 献 1 】

J . G e n . M i c r o b i o l . , 1 3 5 , p p . 2 8 5 9 - 2 8 6 7 ( 1 9 8 9 )

【 発 明 が 解 決 し よ う と す る 課 題 】

本発明は、メチロフィラス属細菌の多糖類生成に関与する遺伝子を取得し、その遺伝子を利用して C 1 化合物からの多糖類の生産性を向上させる手段、あるいは、不要となる多糖類生成を抑制し、目的物質の生成収率を向上させる手段を提供することを課題とする。

【 0 0 0 5 】

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

本発明者らは、メチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子群を解析する過程で、そのゲノム内に、多糖生成に関与する遺伝子群、即ち、「g t f A」遺伝子、及び「m a n C」遺伝子を見出した。そして、当該遺伝子を破壊することで、宿主のメチロフィラス・メチロトロファスの産生する多糖類の量が減少することを確認し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 6 】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

( 1 ) 下記の ( A ) ~ ( D ) のいずれかに記載のタンパク質をコードする D N A 。

( A ) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

( B ) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

( C ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

( D ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

( 2 ) 下記の ( a ) ~ ( d ) に示す D N A である ( 1 ) に記載の D N A 。

( a ) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する D N A 。

( b ) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する D N A または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする D N A 。

( c ) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する D N A 。

( d ) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する D N A または同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする D N A 。

( 3 ) メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする ( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の D N A 。

( 4 ) ( 1 ) に記載の遺伝子が導入され、多糖類生成能が向上したメタノール資化性細菌。

( 5 ) メチロフィラス属細菌である ( 4 ) に記載の細菌。

( 6 ) ( 4 ) 又は ( 5 ) に記載の細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に多糖類を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から多糖類を採取することの特徴とする多糖類の製造方法。

10

20

30

40

50

( 7 ) 染色体上の遺伝子であって、かつ、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、多糖類生成能が低下したメタノール資化性細菌。

( 8 ) メチロフィラス属細菌である ( 7 ) に記載の細菌。

( 9 ) ( 7 ) 又は ( 8 ) に記載の細菌であって、かつ、多糖類以外の目的物質を産生する細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に目的物質を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から目的物質を採取することを特徴とする、目的物質の製造方法。

【 0 0 0 7 】

10

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 0 8 】

< 1 > 本発明の DNA

本発明の DNA は、下記の ( A ) ~ ( D ) のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA である。

( A ) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

( B ) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

20

( C ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

( D ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、多糖類生成活性を有するタンパク質。

【 0 0 0 9 】

以下、上記 ( A ) 又は ( B ) のタンパク質を G t f A、同タンパク質をコードする DNA を g t f A ということがある。また、上記 ( C ) 又は ( D ) のタンパク質を M a n C、同タンパク質をコードする DNA を m a n C ということがある。

本発明の DNA は、G t f A 及び M a n C の両方をコードしていてもよい。

【 0 0 1 0 】

30

本発明の DNA は、メチロフィラス属細菌、例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの染色体 DNA から単離、取得することができる。メチロフィラス・メチロトロファスの野生株 A S 1 株 ( N C I M B No . 1 0 5 1 5 ) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア ( N a t i o n a l C o l l e c t i o n o f I n d u s t r i a l a n d M a r i n e B a c t e r i a 、住所 N C I M B L t s . , T o r r y R e s e a r c h S t a t i o n 1 3 5 , A b b e y R o a d , A b e r d e e n A B 9 8 D G , U n i t e d K i n g d o m ) から入手可能である。そしてこの株の一般的な培養方法は、N C I M B のカタログに記載されているが、また実施例に記載した S E I I 培地でも生育させることができる。

40

【 0 0 1 1 】

A S 1 株のゲノム DNA は公知の方法により調製できるが、市販のゲノム調製用キットを使用してもよい。

本発明の DNA は、本発明によってそれらの塩基配列が明らかになったので、それらの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、メチロフィラス属細菌等の細菌の染色体 DNA を鋳型とする P C R ( ポリメラーゼ・チェーン・リアクション ) により増幅することによって、取得することができる。また、前記塩基配列に基づいて調製したプローブ、又は P C R により増幅した部分断片をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーションによっても、本発明の DNA は取得され得る。

【 0 0 1 2 】

50

本発明のDNAのクローニングに用いるゲノムDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断および連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001)に記載されている。

【0013】

上記PCRに用いるプライマーとしては、gtfAについては配列番号5及び6、manCについては配列番号10及び11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

10

【0014】

上記のようにして取得されたメチロフィラス・メチロトロファスのゲノムから単離されたgtfA及びmanCの塩基配列を配列番号1及び3に示す。また、それらによってコードされるGtfA及びManCのアミノ酸配列を配列番号2及び4に示す。

【0015】

上記GtfA及びManCのアミノ酸配列について、既知のデータベースの相同性検索を行った。その結果、GtfAは、クレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)のグリコシルトランスフェラーゼをコードすると思われる遺伝子産物(Genbank DB accession No. D21242中のorf-14)と43%の相同性が認められた。尚、この相同性は、GtfAは81~467位、orf-14は84~467位の領域間で比較した。また、ManCは、エシェリヒア・コリのcpsB(manC)遺伝子産物と56%の相同性が認められた。この相同性は、ManCは1~473位、cpsB産物は1~478位の領域間で比較した。相同性は、比較に用いた領域の全アミノ酸残基数に対する同一アミノ酸残基の個数の割合として算出した。

20

【0016】

本発明のDNAは、コードされるGtfA又はManCの活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を含んでもよい。ここで、数個とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、例えば、GtfA又はManCを構成するアミノ酸配列全体に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有し、GtfA又はManCの活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「数個」は、好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個である。前記GtfA又はManCの活性とは、具体的には多糖類を生成する活性であり、特に、GtfA活性は、GDP-ガラクトースのガラクトシル-1-リン酸部分を、ウンデカプレニルリン酸へ転移させるガラクトシル-1-リン酸トランスフェラーゼ(ガラクトシル-P-P-ウンデカプレニル合成酵素)活性であり、ManC活性は、マンノース-1-リン酸をGDP-マンノースに変化するマンノース-1-リン酸グアノシルトランスフェラーゼの活性をいう。

30

【0017】

上記のようなGtfA又はManCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば、部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号1又は4に示す塩基配列を改変することによって取得することができる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、gtfA又はmanCをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、およびgtfA又はmanCを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

40

【0018】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、gtfA又はm

50

a n Cを保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 ( m u t a n t又はv a r i a n t )も含まれる。

【 0 0 1 9 】

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現されたG t f A又はM a n Cの活性を調べることにより、G t f A又はM a n Cと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するg t f A又はm a n Cを保持する細胞から、例えば、g t f Aの場合は、配列番号1の塩基番号4 ~ 1 4 0 1からなる塩基配列を有するDNA、または同塩基配列から調製され得るプローブと、m a n Cの場合は、配列番号3の塩基番号4 ~ 4 1 0からなる塩基配列を有するDNA、または同塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつG t f A又はM a n Cのそれぞれの活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、G t f A又はM a n Cと実質的に同一のタンパク質を、それぞれコードするDNAが得られる。

10

【 0 0 2 0 】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60、1 x S S C、0.1% S D S、好ましくは0.1 x S S C、0.1% S D Sに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

20

【 0 0 2 1 】

プローブとしては、g t f Aの場合はg t f Aの一部の配列、m a n Cの場合はm a n Cの一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、当業者によく知られた方法により、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR反応により作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は50、2 x S S C、0.1% S D Sが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

なお、G t f Aの活性は、J i a n g , X . - M .ら ( M o l e c u l a r M i c r o b i o l o g y , v o l . 5 , p 6 9 5 - 7 1 3に記載)の方法により測定できると考えられる。一方、M a n Cの活性の測定方法としては、例えば、C a b i b , E . & L e l l o i r , L . F . ( J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , v o l . 2 3 1 , p 2 5 9 - 2 7 5参照)の方法が挙げられる。

30

【 0 0 2 3 】

< 2 > 本発明のメタノール資化性細菌

本発明の第一の細菌は、g t f A又はm a n Cが導入され、多糖類生成能が向上したメタノール資化性細菌である。g t f A及びm a n Cの両方が導入された細菌も、本発明の細菌に含まれる。

40

【 0 0 2 4 】

また、本発明の第二の細菌は、g t f Aもしくはm a n C、又はこれらと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、多糖類生成能が低下し、かつ、多糖類以外の目的物質の生産能を有するメタノール資化性細菌である。g t f及びm a n C、又はg t f及びm a n Cのホモログの両方が破壊された細菌は、本発明の細菌に含まれる。

【 0 0 2 5 】

本発明が適用されるメタノール資化性細菌としては、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、g t f A又はm a n Cが機能し得るか、あるいはg t f Aもしくはm a n C又はそれらのホモログを保持している細菌であれば、特に制限され

50

ない。具体的には、メチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) 等のメチロフィラス属細菌、及び、メチロバチラス・グリコゲネス (*Methylobacillus glycogenes*)、メチロバチラス・フラゲラタム (*Methylobacillus flagellatum*) 等のメチロバチラス属細菌、メチロバクテリウム・イクストークェンス (*Methylobacterium extorquens*) 等のメチロバクテリウム属細菌が挙げられる。これらの中では、メチロフィラス属細菌が好ましく、メチロフィラス・メチロトロファスが特に好ましい。

#### 【0026】

本発明の第一の細菌は、*gtfA* 又は *manC* を、これらがコードする *GtfA* 又は *ManC* が発現可能な形態でメタノール資化性細菌に導入することによって、構築することができる。メタノール資化性細菌に *gtfA* 又は *manC* を導入するには、メタノール資化性細菌細胞内で自律複製可能なベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターに *gtfA* 又は *manC* を連結して組換えDNAを作製し、それでメタノール資化性細菌メチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。組換えDNAをメタノール資化性細菌へ導入するには、十分な形質転換効率を得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (*Canadian Journal of Microbiology*, 43, 197, (1997)) が挙げられる。また、トランスダクション、トランスポゾン (*Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technology*, 1, 417, (1983))、Muファージ (特開平2-109985号) または相同組換え (*Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で、*gtfA* 又は *manC* を宿主染色体に組み込むこともできる。尚、必要に応じて、メタノール資化性細菌内で機能するプロモーターを、*gtfA* 又は *manC* の上流に連結させてもよい。

#### 【0027】

前記ベクターとして具体的には、宿主として使用するメタノール資化性細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス中で増殖できるプラスミドが使用される。例えば、広宿主域ベクターである *RSF1010* 及びその誘導体、例えば、*pAYC32* (*Chistov, A. Y., Tsygankov, Y. D., Plasmid*, 1986, 16, 161-167)、あるいは *pMFY42* (*Gene*, 44, 53 (1990)) や、*pBBR1* 及びその誘導体に由来するもの (*Kovach, M. E., et al., Gene*, 166, 175-176 (1995))、さらには *pRK310* 及びその誘導体に由来のもの (*Edts. Murrell, J. C., and Dalton, H., Methane and methanol utilizers*, Plenum Press, 183-206 (1992)) 等が利用できる。

#### 【0028】

本発明の第二の細菌は、染色体上の *gtfA* 又は *manC*、又はこれらと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有するホモログ (以下、単に「*gtfA* 又は *manC*」と記載することがある) を、これらの遺伝子産物が正常に機能しないように破壊することによって、構築することができる。前記相同組換えが起こり得る程度の相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。

#### 【0029】

*gtfA* 又は *manC* が破壊されたメタノール資化性細菌は、例えば、メタノール資化性細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、*GtfA* 又は *ManC* の活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。

#### 【0030】

また、実施例に示したように、相同性組換えを利用した遺伝子置換による方法 (*Expe*

periments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)) によっても、染色体上の *gtfA* 又は *manC* を破壊することができる。相同性組換えは、細菌が一般的に持つ能力であり、メチロフィルス属細菌も、相同組換えによる遺伝子置換が可能なことを、本発明者らは見出している。具体的には、正常な機能を有する *GtfA* 又は *ManC* を産生しないように改変した *gtfA* 又は *manC* (欠失型遺伝子) を含む DNA でメタノール資化性細菌を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体上の *gtfA* 又は *manC* との間で組換えを起こさせる。この後、染色体上のプラスミドが組み込まれた部位で再び組換えが起こると、プラスミドが染色体上から抜け落ちる。その際、組換えが起きる位置によって、欠失型遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合と、正常な遺伝子が染色体上に固定され、欠失型遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合がある。前者のような菌株を選択することにより、染色体上の正常な遺伝子が欠失型遺伝子で置換された菌株を取得することができる。

10

#### 【0031】

前記欠失型遺伝子としては、コーディング領域の中の塩基配列中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによってコードされるタンパク質の比活性が低下又は消失した遺伝子が挙げられる。また、コーディング領域の内部又は末端を欠失させた遺伝子、あるいは、コード領域に、他の配列を挿入した遺伝子等が挙げられる。他の配列としては、カナマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子が挙げられる。

20

#### 【0032】

染色体上の *gtfA* 又は *manC* の発現を低下又は消失させることは、これらの遺伝子のプロモーター配列中に、1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって、転写レベルで遺伝子の発現を抑えること (M. Rosenberg and D. Court, Ann. Rev. Genetics 13 (1979) p. 319、P. Youderian, S. Bouvier and M. Susskind, Cell 30 (1982) P. 843 - 853 参照) によっても行うことができる。

#### 【0033】

また、これらの遺伝子の発現は、SD配列と開始コドンとの間の領域中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによって、翻訳レベルで抑えることができる (J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert and F. W. Studier, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75 (1978) p. 2743 参照)。

30

#### 【0034】

上記のようなプロモーターやSD配列と開始コドンとの間の領域の改変は、前記の遺伝子置換と同様にして行うことができる。

遺伝子中に塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせるには、具体的には、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)) や、次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤により処理する方法 (Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75, 270 (1978)) が挙げられる。

40

#### 【0035】

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて1本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補

50



的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。この後 1 本鎖 DNA と任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらに DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントと T4 リガーゼを用いて完全な 2 本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子に変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リコンビナント PCR 法 (PCR Technology, Stockton press (1989)) がある。

#### 【0036】

本発明の第二の細菌は、L-リジン等のアミノ酸や、核酸、ビタミン類、酵素等のタンパク質等のような、多糖類以外の目的物質の生産能を有する細菌であることが好ましい。上記のような細菌として、L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジン生産能を有しない株に変異処理を施し、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(以下、AECと記す)等のリジンアナログに対する耐性を付与することにより取得することができる。変異処理の方法としては、エシェリヒア・コリの菌体に NTG や EMS 等の化学薬剤による処理、あるいは紫外線、放射線照射等の処理を施す方法がある。このような菌株の具体例としては、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608 が挙げられる。本菌株は、メチロフィラス・メチロトロファス AS1 株に AEC 耐性を付与することによって育種されたものである。尚、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608 は、1999 年 6 月 10 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号 305 日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番 3 号)に受託番号 FERM P-17416 として寄託され、2000 年 3 月 31 日付にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号 FERM BP-7112 が付与されている。

#### 【0037】

また、L-リジン生産能を有するメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジンの生合成に関与する遺伝情報を担う DNA を遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても育種することができる。導入される遺伝子は、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ等、L-リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子であり、ジヒドロジピコリン酸合成酵素のように L-リジンによるフィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。また、一方で、L-リジンの排出担体、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムでの lysE 遺伝子の導入も有効と思われる。

#### 【0038】

目的遺伝子のメタノール資化性菌への導入は、前述の gtfA 又は manC の導入と同様にして行うことができる。

目的物質生産能を有し、かつ、gtfA 又は manC が破壊されたメタノール資化性細菌は、gtfA 又は manC が破壊されたメタノール資化性細菌に目的物質生産能を付与することによって取得することができる。また、上記細菌は、目的物質生産能を有するメチロフィラス属細菌の gtfA 又は manC を破壊することによっても、取得することができる。

#### 【0039】

##### <3> 多糖類又は目的物質の製造方法

本発明の第一の細菌は、gtfA 又は manC が導入され、GtfA 又は ManC の活性が高められている。したがって、同細菌をメタノールを主要炭素源とする培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に多糖類を生成、蓄積させ、同培地又は細胞から多糖類を採取することにより、多糖類を効率よく製造することができる。

#### 【0040】

また、本発明の第二の細菌は、gtfA 又は manC が破壊され、多糖類、特に菌体外に

10

20

30

40

50

分泌される多糖類の生成能が低下している。したがって、同細菌を培地に培養し、同培地又は細菌細胞中に目的物質を生成、蓄積させる際に、培地又は細胞中に生成する多糖成分量を低減させることができる。

#### 【0041】

多糖類は、ゲル化剤や増粘安定剤などの産業応用があり、その安価製造法は期待されている。この観点から、本発明の第一の細菌は有用である。

一方で、メタノール資化性菌にて、例えばアミノ酸、核酸、ビタミン類、酵素類、タンパク質などの有用物質を目的物質として生産させる場合は、同細菌が副生する多糖類は不要産物となる。従って、副生多糖類を削減することは、その副生物の生産のために浪費されたエネルギーや炭素が、本来の目的産物の為に有効に利用でき、目的産物の生産性や収量が向上することが考えられ、産業的な応用において重要となる。また、培養液から菌体を遠心により除去する際などは、多糖を大量に生産している菌の場合、多糖が邪魔になり、菌体を沈めることが困難な場合がある。しかし、多糖生成量を減ずることで、遠心操作により、菌体を迅速に沈めることが可能となり、培養液からの菌体分離や培養液中から目的物質を取得する際に、本発明の第二の細菌は有用である。

10

#### 【0042】

上記多糖類としては、キサンタンガムなどが挙げられる。

メタノール資化性細菌の培養のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地である。主要炭素源としては、メタノールであるが、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、でんぷん加水分解物などの糖類、グリセロール、ソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸等の有機酸類を併用して用いることができる。「メタノールを主要炭素源とする」とは、全炭素源のうち、メタノールを50% (w/w) 以上、好ましくは80% (w/w) 以上であることをいう。メタノールを炭素源として用いる場合の濃度は、通常は0.001%から4% (w/v)、好ましくは0.1%から2% (w/v) である。また、グルコース等を添加する場合の濃度は、通常、0.1%から3% (w/v)、好ましくは0.1%から1% (w/v) である。

20

#### 【0043】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素源、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

30

#### 【0044】

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。これらの他に、有機微量栄養源として、ビタミンB<sub>1</sub>、または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい場合もある。

#### 【0045】

培養は、好氣的条件下で16~72時間程度実施するのがよく、培養温度は25~45に、培養中pHは5~8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、あるいはアンモニアガス等を使用することができる。

#### 【0046】

培養終了後、発酵液中の多糖成分量は、公知の方法、例えばフェノール硫酸法 (Hodge, J. E., Hofreiter, B. T., Methods in Carbohydrate Chemistry, ed. by Whistler, R. L., Wolfrom, M. L., Academic Press, New York, vol. 1, p. 388 (1962)) により測定することができる。

40

#### 【0047】

培地又は菌体からの多糖類又は目的物質の採取は、公知の方法によって行うことができる。例えば、L-リジン等のアミノ酸の採取は、通常のイオン交換樹脂法、沈澱法等を組み合わせることにより適宜実施できる。

#### 【0048】

50

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

## 【0049】

【実施例1】 *gtfA* (グリコシルトランスフェラーゼ) 遺伝子の取得

メチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) AS1株 (NCIMB No. 10515) を、50 mLのSEII培地 (組成:  $K_2HPO_4$ , 1.9 g/L;  $(NH_4)_2SO_4$ , 5.0 g/L;  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 1.56 g/L;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g/L;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.72 mg/L;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 5  $\mu$ g/L;  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ , 25  $\mu$ g/L;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 23  $\mu$ g/L;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 9.7 mg/L; メタノール, 1% (v/v)) に植

菌し、培養温度37 にて一晚振とう培養した。その後、培養液を遠心し、菌体を回収した。得られた菌体から、市販のキット (Genomic DNA purification kit (Edge Biosystems社製)) を用いて、染色体DNAを精製した。

10

## 【0050】

次に、取得したゲノムDNA (0.05  $\mu$ g) を鋳型にして、DNAプライマー *MgtfA*-F1 (配列番号5) と *MgtfA*-R1 (配列番号6) を用いてPCRを行った。その条件は、変性94 - 10秒、アニーリング50 - 30秒、伸長反応70 - 4分であった (28サイクル)。PCRは、市販のキット *Pyrobest taq* (Takara Bio Inc.社製) を、添付のプロトコールに従って使用した。その結果、約3.8 kbpのDNA断片が増幅できた。そして、これを制限酵素 *Pst*I で消化し、2.2 kbpのDNA断片を得た。

20

## 【0051】

一方、プラスミドベクター *pBluescript SK-* (Stratagene社製) を制限酵素 *Pst*I で消化し、DNA断片を調製した。以上の両DNA断片を、*Ligation kit* (Takara Bio Inc.) を用いて連結し、*pBS-mgtfA1* を作製した。なお、このプラスミド上で *gtfA* 遺伝子の向きは、*lac* プロモーターからの転写の向きと同じ方向になっている。

## 【0052】

こうしてクローニングされたDNA断片の塩基配列を、常法に従って決定した。その配列を配列表配列番号1に、そして、それがコードするアミノ酸配列を配列表配列番号2に示した。このアミノ酸配列に相同な配列を、既存のアミノ酸配列データベースに対して検索したところ、クレブシエラ・ニューモニエのグリコシルトランスフェラーゼが見出されたため、この配列番号1の遺伝子を *gtfA* と命名した。

30

## 【0053】

【実施例2】メチロフィラス・メチロトロファスにおける *gtfA* 遺伝子の破壊とその効果

まず、プラスミド *pUC4K* (Amersham Biosciences社製) の  $Km^R$  (カナマイシン耐性) 遺伝子領域の両側に存在する制限酵素切断認識部位を一部改変した。すなわち、*pUC4K* を制限酵素 *EcoRI* と *SalI* で切断し切断面を平滑化した後、 $Km^R$  遺伝子DNA断片と複製開始領域 (*ori*) が搭載されるDNA断片とを、*Ligation Kit* (宝酒造社製) により連結し、*pUC4K2* を作製した。つまり、*pUC4K2* は、*pUC4K* から制限酵素部位 *EcoRI*、*BamHI*、*SalI* が欠如させたものである。

40

## 【0054】

PCR用のDNAプライマーとして、*Km4-F2* (配列番号7) と *Km4-R2* (配列番号8) を作製し、鋳型DNAとして *pUC4K2* を用いてPCR (条件: 変性94 - 10秒、アニーリング50 - 30秒、伸長反応70 - 1.5分、28サイクル) を行い、 $Km^R$  遺伝子が搭載されているDNA断片を増幅し、更に増幅されたDNAの両端を

50

B K L k i t ( T a k a r a B i o I n c . ) で平滑端化した。

【 0 0 5 5 】

次に、実施例 1 で取得した p B S - m G t f A 1 を制限酵素 E c o T 1 4 I と M l u I とで消化した後、平滑末端化処理を行い、D N A 断片を調製した。そして、この D N A 断片と上記の K m<sup>R</sup> 遺伝子 D N A 断片とを L i g a t i o n k i t により連結し、p B S - M g t f A - を作製した。

【 0 0 5 6 】

プラスミド p B S - M g t f A - を制限酵素 B a m H I と S a l I とで切断し、カナマイシン耐性遺伝子で分断された g t f A 遺伝子 ( g t f A : : K m<sup>R</sup> ) を含む領域を断片化した。この断片をエタノール沈殿法にて濃縮し、更に脱塩処理を行い、これをエレクトロポレーションの導入 D N A 断片標品とした。 10

【 0 0 5 7 】

一方、メチロフィラス・メチロトロファス A S 1 株を S E I I 液体培地 ( 但しメタノール濃度は 0 . 5 % ( v / v ) ) で、37 で 1 6 時間振とう培養し、その培養液 2 0 m l を 1 0 , 0 0 0 r p m × 1 0 分間の遠心につけ、菌体を集菌した。これに 1 m M H E P E S ( p H 7 . 2 ) 緩衝液 ( 2 0 m l ) を加えて懸濁した後、遠心するという操作を 2 回行い、最後に菌体に 1 m l の同溶液を加え、菌体懸濁液を調製し、エレクトロポレーション用のエレクトロセルとした。そして、上記のカナマイシン耐性遺伝子で分断された g t f A 遺伝子 ( g t f A : : K m<sup>R</sup> ) を含む D N A 断片の約 1 μ g 分を、エレクトロセル 1 0 0 μ l に加え、18 . 5 k V / c m , 2 5 μ F , 2 0 0 の条件で電気パルスを与え、エレクトロポレーション処理を行い、D N A 断片を細胞内へ導入した。 20

【 0 0 5 8 】

この菌懸濁液に直ちに S E I I 液体培地を加え、37 で 3 時間培養した。その後、この培養液を S E I I + K m 寒天培地 ( 2 0 μ / m l のカナマイシンと 1 . 5 % ( w / v ) の寒天を含む S E I I 培地 ) に塗布し、37 で 3 日間培養することで、K m<sup>R</sup> 株として約 1 0 0 株を得た。その中から 6 株を選び、ゲノム D N A を鋳型にして P C R ( 反応条件は、変性 9 4 - 1 0 秒、アニーリング 5 0 - 3 0 秒、伸長反応 7 2 - 4 分、3 0 サイクル ) を行い、各候補株の g t f A 遺伝子領域の構造を調べた。なお、P C R に使用した D N A プライマーは、M g t f A - F 1 ( 配列番号 5 )、M g t f A - R 1 ( 配列番号 6 ) と K m 4 - R 1 ( 配列番号 9 ) である。その結果、予想どおり、M g t f A - F 1 と M g t f A - R 2 の組み合わせでは 4 1 0 0 b p の大きさの D N A 断片、及び M g t f A - F 1 と K m 4 - R 1 の組み合わせでは 2 9 0 0 b p の大きさの D N A 断片がそれぞれ増幅でき、破壊の標的遺伝子である g t f A 遺伝子の欠損株を取得できた。 30

【 0 0 5 9 】

次に、この遺伝子欠損によって、菌体が産生する多糖成分の生成量が変化するかどうかを調べた。A S 1 株と g t f A 遺伝子欠損候補株を、S E I I 寒天培地へ塗り広げ、37 で 1 晩培養したのち、培地表面約 3 c m<sup>2</sup> の菌体をかきとって、S E I I 生産培地 ( 2 0 m l ) に植菌し、37 で 3 5 時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、その上清を菌体外多糖量測定のための試料とした。

【 0 0 6 0 】

菌体外多糖量の測定は、中性糖、特にヘキソースに適用される比色定量法の一つであるフェノール硫酸法 ( 参考文献 : D u b o i s , M . , K . A . G i l e s , J . K . H a m i l t o n , P . A . R e b e r s a n d F . S m i t h . 1 9 5 6 . C o l o r i m e t r i c m e t h o d f o r d e t e r m i n a t i o n o f s u g a r s a n d r e l a t e d s u b s t a n c e s . A n a l . C h e m . 2 8 : 3 5 0 - 3 5 6 ) を用いた。具体的には、試料 0 . 2 m l に対し、5 % フェノール溶液を 0 . 2 m l 加えて混合した。次いで、濃硫酸 1 m l を液面に直接滴下するように速やかに添加し、1 0 分間放置した。その後、再び混合し、2 5 の水浴中で 2 0 分間放置した後、4 9 0 n m の吸光度を吸光度計 ( 日立製 U - 2 0 0 0 ) をで測定した。 40

## 【0061】

その結果、AS1株の菌体外多糖量は226 mg/Lであったのに対し、gtfA遺伝子欠損候補株では98 mg/Lであり、約半分にまで菌体外多糖量が減っていることが判明し、取得した株が、表現型としても多糖類生成の抑制株であることが解った。

## 【0062】

【実施例3】manC(cpsB)(ホスホマンノース イソメラーゼ / マンノース - 1 - リン酸グアニリルトランスフェラーゼ) 遺伝子の取得

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株のゲノムDNA(0.05 µg)を鋳型にして、DNAプライマーmManC-F1(配列番号10)とmManC-R1(配列番号11)を用いて、PCRを行った。その条件は、変性94 - 10秒、アニーリング50 - 30秒、伸長反応70 - 4分であった(28サイクル)。PCRは、市販のキットPyrobest taq (Takara Bio Inc. 社製)を、添付のプロトコールに従って使用した。その結果、約1,460 bpのDNA断片が増幅できた。そして、これを制限酵素BamHIで消化し、約1.46 kbのDNA断片を取得した。

10

## 【0063】

一方、プラスミドベクターpBR322(Takara Bio Inc.)を制限酵素BamHIで消化した後、切断端の5'リン酸を脱リン酸化した。これら2つのDNA断片をLigation kit(Takara Bio Inc.)を用いて連結し、pBR-MmanCを構築した。なお、このプラスミド中のmanC遺伝子の向きは、プラスミド中のAmp(アンピシリン)耐性遺伝子の転写の向きと同方向である。

20

## 【0064】

この取得できたDNA断片の塩基配列を常法により決定した。その塩基配列を配列表配列番号3に、また、それがコードするアミノ酸配列を配列表配列番号4に示した。このアミノ酸配列に相同な配列を、既存のアミノ酸配列データベースに対して検索したところ、エシェリヒア・コリのmanC(cpsB)が見出されたため、この配列番号4の遺伝子をmanCと命名した。

## 【0065】

【実施例4】manC遺伝子の破壊とその効果

PCR用のDNAプライマーとして、Km4-F2(配列番号7)とKm4-R2(配列番号8)を用い、鋳型DNAとしてpUC4K2を用いて、PCR(条件：変性94 - 10秒、アニーリング50 - 30秒、伸長反応70 - 1.5分、28サイクル)を行い、Km<sup>R</sup>遺伝子が搭載されているDNA断片を増幅した。増幅されたDNAの両端をBKL kit (Takara Bio Inc.)で平滑端化して、Km<sup>R</sup>遺伝子を搭載したDNA断片(1.3 kb)を調製した。

30

## 【0066】

次に、実施例3で取得したpBR-MmanCを制限酵素KpnIで消化し、平滑末端化処理を行い、切断端の5'リン酸を脱リン酸化した。このDNA断片と、上記のKm<sup>R</sup>遺伝子を搭載したDNA断片とをLigation kitにより連結し、pBS-MmanC- を作製した。

## 【0067】

プラスミドpBS-MmanC- を制限酵素BamHIで切断し、カナマイシン耐性遺伝子で分断されたmanC遺伝子(manC::Km<sup>R</sup>)を含む領域を断片化した。この断片をエタノール沈殿法にて濃縮し、更に脱塩処理を行い、これをエレクトロポレーションの導入DNA断片標品とした。

40

## 【0068】

次に、実施例1、2と同様にして、AS1株に上記DNAサンプルをエレクトロポレーションし、形質転換体を取得した。Km<sup>R</sup>株として約100株が取得できた。その中から6株を選び、ゲノムDNAを鋳型にしてPCR(反応条件は変性94 - 10秒、アニーリング50 - 30秒、伸長反応 72 - 4分、30サイクル)を行い、各候補株のmanC遺伝子領域の構造を調べた。なお、PCRに使用したDNAプライマーは、Mman

50

C - F 2 ( 配列番号 1 2 ) と M m a n C - R 2 ( 配列番号 1 3 ) である。その結果、予想どおり M m a n C - F 2 と M m a n C - R 2 の組み合わせでは 3 9 0 0 b p の大きさの D N A 断片が増幅でき、破壊の標的遺伝子である m a n C 遺伝子の欠損株を取得できた。

【 0 0 6 9 】

次に、この遺伝子欠損によって菌体が産生する多糖成分の生成量が変化するかどうかを調べた。実施例 2 と同様にフェノール硫酸法を用いた。

A S 1 株と m a n C 遺伝子の欠損候補株を S E I I 寒天培地に塗り広げ、37℃で1晩培養した後、培地表面約 3 c m<sup>2</sup> の菌体をかきとって、S E I I 生産培地 ( 2 0 m l ) に植菌し、37℃で45時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、その上清を菌体外多糖量測定のための試料とした。

10

【 0 0 7 0 】

その結果、A S 1 株の菌体外多糖量は 4 7 5 m g / L であったのに対し、m a n C 遺伝子欠損候補株では 3 0 8 m g / L で、菌体外多糖量が減っていることが判明し、取得した株が、表現型としても m a n C 破壊株であることが示唆された。

【 0 0 7 1 】

以上のように、直鎖状 D N A による、メチロフィラス・メチロトロファスの m a n C 遺伝子破壊が確認された。

【 0 0 7 2 】

【 発明の効果 】

本発明により、メチロフィラス属細菌の菌体外多糖生成に関わる遺伝子が提供される。この遺伝子を用いることで、菌体の多糖生成量を増加又は減少させることができる。

20

【 0 0 7 3 】

【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 多糖類生成に関与する遺伝子及びその利用

<130> P-B0649

10

<140>

<141> 2003-02-10

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

20

<210> 1

<211> 1404

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

30

<221> CDS

<222> (1)..(1404)

<400> 1

atg gcg act aaa cct ccg atc aga aca ctc tcc ggc ttt tca tct ggc 48

Met Ala Thr Lys Pro Pro Ile Arg Thr Leu Ser Gly Phe Ser Ser Gly

1

5

10

15

40

ggg agt aat cca ctt tac atg ctt gag tct ctc gtt gag ccc ttg gtg 96

Gly	Ser	Asn	Pro	Leu	Tyr	Met	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Val		
			20					25					30				
atg	gtg	ttt	gtg	ctg	tgg	ggg	ttg	ttt	att	tat	acc	gaa	aac	cgc	att	144	
Met	Val	Phe	Val	Leu	Trp	Gly	Leu	Phe	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asn	Arg	Ile		
			35				40						45				
ccg	atg	tcg	att	ttt	att	aca	tcg	ata	gtg	ctg	ttt	tcg	att	tct	ttc	192	
Pro	Met	Ser	Ile	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Val	Leu	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe		10
			50				55						60				
ccc	agc	ggc	gcc	aag	att	cgc	aag	ggc	ttt	gcc	aag	atg	tgc	cgg	gat	240	
Pro	Ser	Gly	Ala	Lys	Ile	Arg	Lys	Gly	Phe	Ala	Lys	Met	Cys	Arg	Asp		
			65			70			75				80				
gtg	att	ggc	caa	tgg	ctg	gtc	att	gcc	acc	ttt	ttg	ctg	acc	ttt	gct	288	
Val	Ile	Gly	Gln	Trp	Leu	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Leu	Leu	Thr	Phe	Ala		
			85				90						95				20
tat	atc	act	cgt	tac	atc	acc	tta	tat	agc	gaa	aaa	tta	att	ctc	gcc	336	
Tyr	Ile	Thr	Arg	Tyr	Ile	Thr	Leu	Tyr	Ser	Glu	Lys	Leu	Ile	Leu	Ala		
			100				105						110				
tgg	ttg	att	gtg	acg	cca	gtt	gcc	cag	att	att	gcg	ttg	cag	tta	cta	384	
Trp	Leu	Ile	Val	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Leu		
			115				120						125				
aaa	tgg	gcc	agc	ccc	aaa	ttg	att	gag	tgg	caa	gga	cca	cga	caa	aac	432	30
Lys	Trp	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Ile	Glu	Trp	Gln	Gly	Pro	Arg	Gln	Asn		
			130				135						140				
acc	ttg	att	atc	ggc	ttg	aat	gag	caa	ggc	ctg	ctt	ttg	gcg	gat	aat	480	
Thr	Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Asn		
			145			150				155			160				
ctg	aaa	cgt	gat	tat	tat	caa	aga	atc	aat	ata	ttg	gga	ttt	ttt	gag	528	
Leu	Lys	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Ile	Asn	Ile	Leu	Gly	Phe	Phe	Glu		40
			165				170						175				



gac cgc gcg cct aac cgg ctt ccg cac ata gat tct tat ccg gta ctt	576	
Asp Arg Ala Pro Asn Arg Leu Pro His Ile Asp Ser Tyr Pro Val Leu		
180 185 190		
ggc agc ttg aat gaa ctg agt cat tac ctg aaa tca cac act gta cac	624	
Gly Ser Leu Asn Glu Leu Ser His Tyr Leu Lys Ser His Thr Val His		
195 200 205		
aaa ctt tat atc gct tta ccg atg tcc agt cac cct cgt att ttg aaa	672	10
Lys Leu Tyr Ile Ala Leu Pro Met Ser Ser His Pro Arg Ile Leu Lys		
210 215 220		
cta tta gac gat ctt aaa gac acg aca gct tcc att tac ttt gtg cct	720	
Leu Leu Asp Asp Leu Lys Asp Thr Thr Ala Ser Ile Tyr Phe Val Pro		
225 230 235 240		
gac atc ttt gtc acc gac ctg atc cag gga cgc gtt tcg gat gtc aac	768	
Asp Ile Phe Val Thr Asp Leu Ile Gln Gly Arg Val Ser Asp Val Asn		20
245 250 255		
ggc att cct gtt gtt tct gtg tgt gat acg cca ttt act ggc atg gat	816	
Gly Ile Pro Val Val Ser Val Cys Asp Thr Pro Phe Thr Gly Met Asp		
260 265 270		
ggc ttt atc aaa cgc acg gca gat att tta ttt tca tta ttg gtg ttg	864	
Gly Phe Ile Lys Arg Thr Ala Asp Ile Leu Phe Ser Leu Leu Val Leu		
275 280 285		30
att ctg atc tcg cct att ttg atc ggt att gcg att gca gta aaa ctc	912	
Ile Leu Ile Ser Pro Ile Leu Ile Gly Ile Ala Ile Ala Val Lys Leu		
290 295 300		
acc tct cct ggc ccc gtt att ttc aag caa cgt cgt tac ggc ttg gat	960	
Thr Ser Pro Gly Pro Val Ile Phe Lys Gln Arg Arg Tyr Gly Leu Asp		
305 310 315 320		
gga caa cag att ttg gtg tac aag ttc cgc tcc atg acc gtc act gaa	1008	40
Gly Gln Gln Ile Leu Val Tyr Lys Phe Arg Ser Met Thr Val Thr Glu		

325	330	335		
gat ggt gca acg gtg aca caa gcc acc agg aat gat caa cgc att acg	1056			
Asp Gly Ala Thr Val Thr Gln Ala Thr Arg Asn Asp Gln Arg Ile Thr				
340	345	350		
cca ctg ggt gcc ttt ttg cgc aaa acc tcc ctg gat gag ttg ccg cag	1104			
Pro Leu Gly Ala Phe Leu Arg Lys Thr Ser Leu Asp Glu Leu Pro Gln				
355	360	365		10
ttt att aat gtg tta caa ggc cgc atg agt gtg gtt ggg cca cgc cca	1152			
Phe Ile Asn Val Leu Gln Gly Arg Met Ser Val Val Gly Pro Arg Pro				
370	375	380		
cat gcg gtg gcg cat aac gag gaa tac cgt aag ctg att aaa ggc tat	1200			
His Ala Val Ala His Asn Glu Glu Tyr Arg Lys Leu Ile Lys Gly Tyr				
385	390	395	400	
atg gta cgc cac aag gta aaa ccc ggg att acc ggc tgg gca cag gta	1248			20
Met Val Arg His Lys Val Lys Pro Gly Ile Thr Gly Trp Ala Gln Val				
405	410	415		
aat ggc ttc cgc ggc gaa acg gac acg tta gaa aaa atg gag caa cgt	1296			
Asn Gly Phe Arg Gly Glu Thr Asp Thr Leu Glu Lys Met Glu Gln Arg				
420	425	430		
gtc cat tat gac ctt gag tac ctg cgc aac tgg agc cct cgc ttg gat	1344			
Val His Tyr Asp Leu Glu Tyr Leu Arg Asn Trp Ser Pro Arg Leu Asp				30
435	440	445		
atg ttg att gtc gcc aag acg ata tgg ctg acc att gtt ggt caa gat	1392			
Met Leu Ile Val Ala Lys Thr Ile Trp Leu Thr Ile Val Gly Gln Asp				
450	455	460		
ggg gct tat tag	1404			
Gly Ala Tyr				
465				40

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 467

&lt;212&gt; PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

&lt;400&gt; 2

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

180	185	190
Gly Ser Leu Asn Glu Leu Ser His Tyr Leu Lys Ser His Thr Val His		
195	200	205
Lys Leu Tyr Ile Ala Leu Pro Met Ser Ser His Pro Arg Ile Leu Lys		
210	215	220
Leu Leu Asp Asp Leu Lys Asp Thr Thr Ala Ser Ile Tyr Phe Val Pro		
225	230	235
Asp Ile Phe Val Thr Asp Leu Ile Gln Gly Arg Val Ser Asp Val Asn		
245	250	255
Gly Ile Pro Val Val Ser Val Cys Asp Thr Pro Phe Thr Gly Met Asp		
260	265	270
Gly Phe Ile Lys Arg Thr Ala Asp Ile Leu Phe Ser Leu Leu Val Leu		
275	280	285
Ile Leu Ile Ser Pro Ile Leu Ile Gly Ile Ala Ile Ala Val Lys Leu		
290	295	300
Thr Ser Pro Gly Pro Val Ile Phe Lys Gln Arg Arg Tyr Gly Leu Asp		
305	310	315
Gly Gln Gln Ile Leu Val Tyr Lys Phe Arg Ser Met Thr Val Thr Glu		
325	330	335
Asp Gly Ala Thr Val Thr Gln Ala Thr Arg Asn Asp Gln Arg Ile Thr		
340	345	350
Pro Leu Gly Ala Phe Leu Arg Lys Thr Ser Leu Asp Glu Leu Pro Gln		
355	360	365
Phe Ile Asn Val Leu Gln Gly Arg Met Ser Val Val Gly Pro Arg Pro		
370	375	380
His Ala Val Ala His Asn Glu Glu Tyr Arg Lys Leu Ile Lys Gly Tyr		
385	390	395
Met Val Arg His Lys Val Lys Pro Gly Ile Thr Gly Trp Ala Gln Val		
405	410	415

10

20

30

40

Asn Gly Phe Arg Gly Glu Thr Asp Thr Leu Glu Lys Met Glu Gln Arg  
                   420                                  425                                  430  
 Val His Tyr Asp Leu Glu Tyr Leu Arg Asn Trp Ser Pro Arg Leu Asp  
                   435                                  440                                  445  
 Met Leu Ile Val Ala Lys Thr Ile Trp Leu Thr Ile Val Gly Gln Asp  
                   450                                  455                                  460  
 Gly Ala Tyr  
 465

10

<210> 3  
 <211> 1422  
 <212> DNA  
 <213> *Methylophilus methylotrophus*

20

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1422)

<400> 3  
 atg tct tta atg aaa att gtc ccc gtc att ttg tcc ggt ggt tct ggt 48  
 Met Ser Leu Met Lys Ile Val Pro Val Ile Leu Ser Gly Gly Ser Gly  
   1                  5                                  10                                  15  
 acg cga tta tgg ccg ttg tca cgc gcg gtt ttg cct aaa cag tta ttg 96  
 Thr Arg Leu Trp Pro Leu Ser Arg Ala Val Leu Pro Lys Gln Leu Leu  
                   20                                  25                                  30  
 cct ttg gtg acc gaa aat acg atg tta cag gag aca ttg atc cgg ctt 144  
 Pro Leu Val Thr Glu Asn Thr Met Leu Gln Glu Thr Leu Ile Arg Leu  
                   35                                  40                                  45  
 tct agc tgg gcg gat gtc ggt cat cct atc gtc gtc tgt ggt aac gat 192

30

40

Ser	Ser	Trp	Ala	Asp	Val	Gly	His	Pro	Ile	Val	Val	Cys	Gly	Asn	Asp				
50						55				60									
cat	cgc	ttt	ttg	gtg	gcg	gag	caa	tta	cgg	caa	gtg	aat	ttg	aca	cct	240			
His	Arg	Phe	Leu	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Pro				
65					70				75					80					
gag	gcg	att	gtg	ctg	gag	ccg	gtg	gcg	cga	aat	acg	gca	cct	gcg	att	288			
Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Asn	Thr	Ala	Pro	Ala	Ile			10	
				85				90				95							
gct	gct	gcg	gct	gtg	act	tta	aaa	gac	aaa	gat	gtc	ttg	atg	ctg	gtg	336			
Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Leu	Val				
			100					105				110							
ttg	cct	gcg	gat	cat	gtg	att	act	gac	gtc	act	gct	ttt	gag	gct	gct	384			
Leu	Pro	Ala	Asp	His	Val	Ile	Thr	Asp	Val	Thr	Ala	Phe	Glu	Ala	Ala				
			115					120				125						20	
gtg	cgt	cgt	gcc	tgc	gtt	gca	gca	gag	cag	ggg	aaa	ctg	gtc	aca	ttt	432			
Val	Arg	Arg	Ala	Cys	Val	Ala	Ala	Glu	Gln	Gly	Lys	Leu	Val	Thr	Phe				
			130					135				140							
ggc	ata	gag	cct	aca	cag	ccg	gaa	acc	ggc	tat	ggc	tat	atc	caa	tca	480			
Gly	Ile	Glu	Pro	Thr	Gln	Pro	Glu	Thr	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Ile	Gln	Ser				
145					150				155					160					
ggc	gca	gaa	ttg	gaa	gca	tgt	gat	ggc	tgc	ttt	gaa	gtg	gca	cgt	ttt	528			30
Gly	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Asp	Gly	Cys	Phe	Glu	Val	Ala	Arg	Phe				
				165				170				175							
gtt	gag	aag	cct	gat	gct	gcg	act	gca	cag	caa	tat	ttg	gat	gcc	gga	576			
Val	Glu	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Gln	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ala	Gly				
				180				185				190							
aac	ttt	tat	tgg	aac	agc	ggc	atg	ttt	ttg	ttt	aaa	ccg	gct	gtg	ttc	624			
Asn	Phe	Tyr	Trp	Asn	Ser	Gly	Met	Phe	Leu	Phe	Lys	Pro	Ala	Val	Phe				40
				195				200				205							

ctg gct gag ttg cag caa tac gcg cca gcc atg gtc agt gcg gta agc	672	
Leu Ala Glu Leu Gln Gln Tyr Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Val Ser		
210 215 220		
aat gcc gtt gcg caa agt tat aaa gac ctg gat ttt gtg cgc ttg cat	720	
Asn Ala Val Ala Gln Ser Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Val Arg Leu His		
225 230 235 240		
gag gcc tcg ttt gct gag tct cct tct gat tca att gac tat gcc gtc	768	10
Glu Ala Ser Phe Ala Glu Ser Pro Ser Asp Ser Ile Asp Tyr Ala Val		
245 250 255		
atg gaa aaa acc aaa ctg gcg gcc gtg gta cct gcc agc atg ggg tgg	816	
Met Glu Lys Thr Lys Leu Ala Ala Val Val Pro Ala Ser Met Gly Trp		
260 265 270		
aat gat gtt ggc tca tgg act gcc tta aaa gaa gtg cag ccc aat gat	864	
Asn Asp Val Gly Ser Trp Thr Ala Leu Lys Glu Val Gln Pro Asn Asp		20
275 280 285		
gcg gat ggg aat gct aca cgc ggg gat gtg ttt ctt aaa aat gtg aaa	912	
Ala Asp Gly Asn Ala Thr Arg Gly Asp Val Phe Leu Lys Asn Val Lys		
290 295 300		
aat acc ttg gta cgg gcg gaa gag cgc ttt gtg gct gcc gtt ggc gta	960	
Asn Thr Leu Val Arg Ala Glu Glu Arg Phe Val Ala Ala Val Gly Val		
305 310 315 320		30
gag gat ttg ctg att gtt gaa acc agt gat gcg atc ctg gtt gcg cac	1008	
Glu Asp Leu Leu Ile Val Glu Thr Ser Asp Ala Ile Leu Val Ala His		
325 330 335		
cgt gat tgt gcg cag gat gtc aag aat att gtt gat cat ttg aag gca	1056	
Arg Asp Cys Ala Gln Asp Val Lys Asn Ile Val Asp His Leu Lys Ala		
340 345 350		
agc gga cgt tct gaa cat aag atg cat ccc cgt gtt tat cgc cct tgg	1104	40
Ser Gly Arg Ser Glu His Lys Met His Pro Arg Val Tyr Arg Pro Trp		

355	360	365		
ggg tgg tac gag gga atc gat atc ggc gag cgt ttc cag gtc aag cgt	1152			
Gly Trp Tyr Glu Gly Ile Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gln Val Lys Arg				
370	375	380		
att atg gtg aaa cca ggt gaa aga ttg tca ctg caa atg cat cat cat	1200			
Ile Met Val Lys Pro Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gln Met His His His				
385	390	395	400	10
cgg gct gag cac tgg gtg gtt gtc agt ggg tct gcc atg atc act att	1248			
Arg Ala Glu His Trp Val Val Val Ser Gly Ser Ala Met Ile Thr Ile				
405	410	415		
gat gat gtc acc aag ctc tat act gaa aac gaa tct act tat ata ccg	1296			
Asp Asp Val Thr Lys Leu Tyr Thr Glu Asn Glu Ser Thr Tyr Ile Pro				
420	425	430		
att ggc tca acg cac cga cta gag aat cca ggt aaa ttg cct ttg cat	1344			20
Ile Gly Ser Thr His Arg Leu Glu Asn Pro Gly Lys Leu Pro Leu His				
435	440	445		
tta atc gag gtg caa tcc ggt agt tat ctt gga gaa gat gac atc gtg	1392			
Leu Ile Glu Val Gln Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Glu Asp Asp Ile Val				
450	455	460		
cgt ttt gaa gat acc tac ggc cgt agt tag	1422			
Arg Phe Glu Asp Thr Tyr Gly Arg Ser				30
465	470			

<210> 4

<211> 473

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

40

<400> 4



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

10

20

30

40

225                      230                      235                      240  
 Glu Ala Ser Phe Ala Glu Ser Pro Ser Asp Ser Ile Asp Tyr Ala Val  
                                  245                      250                      255  
 Met Glu Lys Thr Lys Leu Ala Ala Val Val Pro Ala Ser Met Gly Trp  
                                  260                      265                      270  
 Asn Asp Val Gly Ser Trp Thr Ala Leu Lys Glu Val Gln Pro Asn Asp  
                                  275                      280                      285  
 Ala Asp Gly Asn Ala Thr Arg Gly Asp Val Phe Leu Lys Asn Val Lys  
                                  290                      295                      300  
 Asn Thr Leu Val Arg Ala Glu Glu Arg Phe Val Ala Ala Val Gly Val  
 305                                   310                                   315                                   320  
 Glu Asp Leu Leu Ile Val Glu Thr Ser Asp Ala Ile Leu Val Ala His  
                                  325                                   330                                   335  
 Arg Asp Cys Ala Gln Asp Val Lys Asn Ile Val Asp His Leu Lys Ala  
                                  340                                   345                                   350  
 Ser Gly Arg Ser Glu His Lys Met His Pro Arg Val Tyr Arg Pro Trp  
                                  355                                   360                                   365  
 Gly Trp Tyr Glu Gly Ile Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gln Val Lys Arg  
                                  370                                   375                                   380  
 Ile Met Val Lys Pro Gly Glu Arg Leu Ser Leu Gln Met His His His  
 385                                   390                                   395                                   400  
 Arg Ala Glu His Trp Val Val Val Ser Gly Ser Ala Met Ile Thr Ile  
                                  405                                   410                                   415  
 Asp Asp Val Thr Lys Leu Tyr Thr Glu Asn Glu Ser Thr Tyr Ile Pro  
                                  420                                   425                                   430  
 Ile Gly Ser Thr His Arg Leu Glu Asn Pro Gly Lys Leu Pro Leu His  
                                  435                                   440                                   445  
 Leu Ile Glu Val Gln Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Glu Asp Asp Ile Val  
                                  450                                   455                                   460

10

20

30

40

Arg Phe Glu Asp Thr Tyr Gly Arg Ser

465

470

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer MgtfA-F1

<400> 5

cigagtttgc ttgcctattg gatcactgct gcc

33

20

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer MgtfA-R1

30

<400> 6

cgccaaaatt cacaccaccg attctcagcg cat

33

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Km4-F2

<400> 7

cttgatatcg ctagctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggata 45

10

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Km4-R2

20

<400> 8

accaacgcgt aatcgcccca tcatccagcc agaaagtga 39

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Km4-R1

<400> 9

tgggtgattt tgaacttttg ctttgccacg gaacg 35

40

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-F1

10

<400> 10

ccggatccga tgcgtgtgcc tttagtc

27

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-R1

<400> 11

ccggatccca cctaactacg gccgtagg

28

30

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-F2

40

<400> 12

atttgaggtc ggtttgcttg cgctatttta acg

33

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-R2

<400> 13

tcgtgacata gcgttgcaca tagccctcat a

31

20

---

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA17 BA80 CA01 DA05 GA11 HA20  
4B064 AF11 CA02 CA19 CC24 CD06  
4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14 BA02 BB06 CA22