

(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>**C12N 15/09****C12N 1/21****C12P 19/04**

F 1

C 12 N 15/00

C 12 N 1/21

C 12 P 19/04

Z N A A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4

4 B 0 6 4

4 B 0 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エ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エントな条件下でハイブリダイズするDNA。 20

**【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、その微生物が生産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】**

上記製造法は、特に、C<sub>1</sub>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。

【0003】

【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. Southgate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 (*Methyllophilus methylotrophus*) 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。

【0004】

【非特許文献1】

J. Gen. Microbiol., 135, pp. 2859-2867 (1989)

10

【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<sub>1</sub>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。

【0005】

【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、多糖生成に関する遺伝子群、即ち、「gtfA」遺伝子、及び「manC」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產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。

【0006】

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。

(2) 下記の(a)～(d)に示すDNAである(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エ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エントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(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DNA。

(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を特徴とする多糖類の製造方法。

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意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产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。

#### 【0007】

10

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0008】

##### <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。

(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。

#### 【0009】

20

以下、上記(A)又は(B)のタンパク質をGtfa、同タンパク質をコードするDNAをgtfaということがある。また、上記(C)又は(D)のタンパク質をManC、同タンパク質をコードするDNAをmanCということがある。

本発明のDNAは、Gtfa及びManCの両方をコードしていてよい。

#### 【0010】

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AS1株(NCIMB No.10515)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(National Collection of Industrial and Marine Bacteria、住所NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbeyle Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom)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、NCIMBのカタログに記載されているが、また実施例に記載したSEII培地でも生育させることができる。

40

#### 【0011】

AS1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を鑄型とするPCR(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PCR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。

#### 【0012】

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)のグリコシリ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いてもよい。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、ウンデカブ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-ウンデカブレニル合成酵素)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つても取得され得る。変異処理としては、gtfA又はmanCをヒドロキシリジ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。

#### 【0019】

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、ストリンジエ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

#### 【0020】

ここでいう「ストリンジエントな条件」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 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 °C、1 × SSC、0.1 % SDS、好ましくは 0.1 × SSC、0.1 % SDS 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

#### 【0021】

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 断片を鑄型とする PCR 反応により作製することができる。プローブとして、300 bp 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 °C、2 × SSC、0.1 % SDS が挙げられる。  
30

#### 【0022】

なお、*G t f A* の活性は、Jiang, X. - M.ら (Molecular Microbiology, vol. 5, p 695 - 713 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、Cabié, E. & Leloir, L. F. (Journal of Biological Chemistry, vol. 231, p 259 - 275 参照) の方法が挙げられる。  
40

#### 【0023】

##### <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。

#### 【0024】

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。

#### 【0025】

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・イクストーケンス (*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が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、トランスタクション、トランスポゾン (*Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol.* 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、広宿主ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えば、pAYC32 (*Chistoserdov, 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

10

20

30

40

50

gments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 196 (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、メチロフィラス属細菌も、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変更したgftA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gftA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

20

## 【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

30

40

## 【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。

30

## 【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)。

40

## 【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変更は、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。

50

## 【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、クローニングされ、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・コリのコンピメ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】

10

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。

20

## 【0037】

30

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マニナーゼ等、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】

30

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。

40

## 【0039】

## &lt;3&gt;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

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でき困難な場合がある。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。

#### 【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、でんぶ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。

#### 【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。

#### 【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、好気的条件下で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。

#### 【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】

10

20

30

40

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(Methyllophilus methylotrophus)AS1株(NCIMB No.10515)を、50mLのSEII培地(組成:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.9g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.0g/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.56g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2g/L; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.72mg/L; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5μg/L; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 25μg/L; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 23μg/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 9.7mg/L; メタノール, 1%(v/v))に植菌し、培養温度37にて一晩振とう培養した。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(0.05μg)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3.8kbpのDNA断片が増幅できた。そして、これを制限酵素PstIで消化し、2.2kbp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PstI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。  
30

#### 【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・ニューモニウム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<sup>R</sup>(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<sup>R</sup>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<sup>R</sup>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、DNA 断片を調製した。そして、この DNA 断片と上記の K m R 遺伝子 DNA 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 R ) 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。  
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 度で 16 時間振とう培養し、その培養液 20 ml を 10,000 rpm × 10 分間の遠心にかけ、菌体を集菌した。これに 1 mM H E P E S (pH 7.2) 緩衝液 (20 ml) 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 ml 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 R ) を含む DNA 断片の約 1 μg 分を、エレクトロセル 100 μl に加え、18.5 kV/cm, 25 μF, 200 の条件で電気パルスを 20 与え、エレクトロポレーション処理を行い、DNA 断片を細胞内へ導入した。

【 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 度で 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 (20 μl / ml 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 度で 3 日間培養することで、K m R 株として約 100 株を得た。その中から 6 株を選び、ゲノム DNA を鋳型にして P C R (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 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 DNA 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 4100 bp の大きさの DNA 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 2900 bp の大きさの DNA 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 度で 1 晚培養したのち、培地表面約 3 cm<sup>2</sup> の菌体をかきとって、S E I I 生産培地 (20 ml) に植菌し、37 度で 35 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 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 mL に対し、5% フェノール溶液を 0.2 mL 加えて混合した。次いで、濃硫酸 1 mL を液面に直接滴下するように速やかに添加し、10 分間放置した。その後、再び混合し、25 の水浴中で 20 分間放置した後、490 nm の吸光度を吸光光度計（日立製 U - 2000）を用いて測定した。  
40  
50

## 【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)を鑄型にして、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。

## 【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。

## 【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、鑄型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BKLyk kit(Takara Bio Inc.)で平滑末端化して、Km<sup>R</sup>遺伝子を搭載したDNA断片(1.3 kb)を調製した。

## 【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。

## 【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を鑄型にして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

10

20

30

40

50

C - F 2 (配列番号 12) と M m a n C - R 2 (配列番号 13) 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 3900 bp の大きさの DNA 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。

#### 【0069】

次に、この遺伝子欠損によって菌体が產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 晚培養した後、培地表面約 3 cm<sup>2</sup> の菌体をかきとて、S E I I 生産培地 (20 ml) 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

#### 【0070】

その結果、A S 1 株の菌体外多糖量は 475 mg/L であったのに対し、m a n C 遺伝子欠損候補株では 308 mg/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。

#### 【0071】

以上のように、直鎖状 DNA 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。

#### 【0072】

#### 【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

#### 【0073】

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

〈110〉 Ajinomoto Co., Inc.

〈120〉 多糖類生成に関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  
 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 ggt 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  
 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  
 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 ggt ctg ctt ttg gcg gat aat 480  
 Thr Leu Ile Ile Gly Leu Asn Glu Gln Gly 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  
 165 170 175

10

20

30

40

gac	cgc	gcf	cct	aac	cgf	ctt	ccg	caf	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	caf	act	gta	caf	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	caf	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	gcf	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	20
atg gta cgc cac aag gta aaa ccc ggg att acc ggc tgg gca cag gta			1248
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			
435	440	445	30
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

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 2

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

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

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

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

Asp Arg Ala Pro Asn Arg Leu Pro His Ile Asp Ser Tyr Pro Val Leu

10

20

30

40

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	10
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	20
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	30
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	40
Met Val Arg His Lys Val Lys Pro Gly Ile Thr Gly Trp Ala Gln Val			
405	410	415	

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> Methylphilus 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

30

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

40

tct agc tgg gcg gat gtc ggt cat cct atc gtc gtc tgt ggt aac gat 192

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  
 85 90 95  
 gct gct 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  
 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  
 ggt ata gag cct aca cag ccg gaa acc ggt tat ggt 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  
 ggt gca gaa ttg gaa gca tgt gat ggt tgc ttt gaa gtg gca cgt ttt 528  
 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  
 195 200 205

10

20

30

40

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			
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				
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	
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			
Ser Gly Arg Ser Glu His Lys Met His Pro Arg Val Tyr Arg Pro Trp				

10

20

30

40

355	360	365	
gg t gg 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
cg gct gag cac tgg gtg gtt gtc agt ggg tct gcc atg atc act att			1248
Arg Ala Glu His Trp 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
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			
465	470		

**(210) 4**

**(211) 473**

**(212) PRT**

**(213) *Methylophilus methylotrophus***

10

20

30

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 10  
 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 20  
 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 30  
 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 40  
 Asn Ala Val Ala Gln Ser Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Val Arg Leu His

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		10
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		20
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	30
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		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

ctgagttgc 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

cgcctaaaatt cacaccacccg atttcagcg 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

ttggtgattt tgaacctttg cttgccacg 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 ccttaactacg gccgttagg

28

30

<210> 12  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer mManC-F2

40

〈400〉 12

atttgaggta 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 gcgttgacaca 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