

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5468680号
(P5468680)

(45) 発行日 平成26年4月9日 (2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年2月7日 (2014.2.7)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 19/02 (2006.01)	C 1 2 P 19/02
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24

請求項の数 2 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2012-501937 (P2012-501937)	(73) 特許権者	510273880
(86) (22) 出願日	平成22年3月24日 (2010.3.24)		コリア ユニバーシティ リサーチ アン ド ビジネス ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2012-521755 (P2012-521755A)		KOREA UNIVERSITY RE SEARCH AND BUSINESS
(43) 公表日	平成24年9月20日 (2012.9.20)		FOUNDATION
(86) 国際出願番号	PCT/KR2010/001816		大韓民国, 136-713 ソウル, ソン ブクーク, アナムドン 5-ガ, コリア
(87) 国際公開番号	W02010/110599		ユニバーシティ
(87) 国際公開日	平成22年9月30日 (2010.9.30)		Korea University, An amdong 5-ga, Seongbu k-gu, Seoul 136-713, Republic of Korea
審査請求日	平成23年11月25日 (2011.11.25)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	10-2009-0026300		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成21年3月27日 (2009.3.27)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

(54) 【発明の名称】 新規なアルファ-ネオアガラビオース加水分解酵素及びそれを用いた単糖類の獲得方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 及び 2 に記載されたアミノ酸配列からなる群から選択される α -ネオアガラビオース加水分解酵素を少なくとも 1 つ用いて α -ネオアガラビオースを分解し、分解物からガラクトース又は 3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトース (AHG) を採取することを含む、ガラクトース又は 3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースを製造する方法。

【請求項 2】

配列番号 1 及び 2 に記載されたアミノ酸配列からなる群から選択される α -ネオアガラビオース加水分解酵素を少なくとも 1 つ含む、 α -ネオアガラビオースからガラクトース又は 3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトース (AHG) を製造するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なアルファ-ネオアガラビオース加水分解酵素 (α -neoagarobiose hydrolase) 及びそれを用いた単糖類の獲得方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、大気中に排出される二酸化炭素量の増加による地球温暖化だけでなく、近い将来に発生し得る石油の枯渇及び価格上昇によって全世界的に新たな二酸化炭素低減型代替エネルギーの開発が急激に求められている。多様な代替エネルギーのうち、再生可能であり

、豊富な地球資源の1つであるバイオマスを用いて生産されるバイオエネルギーが前述した要求を満たす主な再生エネルギーとして現在脚光を浴びている。特に、バイオエタノールは現在需要が大きく伸びている輸送用燃料の代案として考慮されており、米国をはじめとする先進国では既にバイオエタノールの使用が法律で義務付けられている。現在、バイオエタノールを生産するために使用している原料物質はトウモロコシやその他食糧資源に由来する糖質、でん粉などに制限されており（第1世代バイオ燃料）、人類の食糧資源と競争し、それにより国際穀物価格の上昇を誘発するという問題を抱えている。このような短所を克服できる対案として、食糧資源と競争しない新たな陸上木質系バイオマス（第2世代バイオ燃料）や海洋海藻類バイオマス（第3世代バイオ燃料）が次世代バイオエネルギーの原料としてさらに注目されており、これを活用してバイオエネルギーを生産する技術が現在活発に研究されている。

10

【0003】

海藻類バイオマスは、木質系バイオマスに比べて微生物が利用可能な多糖類の含有量が多く、リグニンを含有していないため、前処理が比較的簡単であり、年に数回収穫できるなどの様々な長所を有している。特に、大韓民国は三面が海で囲まれており、海藻類の生物資源化が容易であり、海藻類の年間生産量は2006年現在で13,754トンであって、中国、日本、北朝鮮と共に世界的な海藻類の生産国に属しているが、その活用率の面では食用資源以外には低調であるのが現状である（漁業生産統計、2006、統計庁社会統計局農漁業生産統計課）。最近になって、海藻類からバイオエネルギーを生産する研究が日本と大韓民国などで活発に議論されている。日本の水産業振興財団では‘Ocean Sunrise Project’というタイトルで日本の排他的経済水域と海洋ベルトの未使用海域4.47百万km²で海藻類を大量養殖して50億リットルの燃料用エタノールを生産しようとする計画を立てている（Aizawa *et al.*, Seaweed bioethanol production in Japan-The Ocean Sunrise Project, OCEANS Conference, Sep. 29-Oct. 04, 2007, Vancouver, Canada）。また、韓国では2009年1月に最終発表された政府の17の新成長エンジン事業分野の1つである新再生エネルギー分野に海洋バイオ燃料が含まれ、海藻類への関心がさらに高まっている。2009年の農林水産食品部の海洋バイオマスの確保及び活用技術の開発に関する研究企画発表によると、四方71kmの正四角形の海域で海藻類を養殖してバイオエタノールを生産する場合、年間37.74億リットルの生産が可能であり、これは2030年の韓国のガソリン予想消費量の31.4%に替えられる量である。

20

30

【0004】

現在知られている海藻類の中で特に紅藻類バイオマス（例えば、Gelidium amansii）を原料物質として用いる研究が現在活発に進められている。紅藻類は乾重量全体の70%以上が多糖類であって、微生物が利用可能な発酵性糖への変換が可能である。特に、紅藻類バイオマスに由来する多糖類の主要成分は寒天（アガー、agar）であって、乾重量全体の60%程度を含有しており、バイオエネルギーの生産のための主要原料として考慮されている。寒天多糖体はガラクトース（D-galactose）と3,6-アンヒドロガラクトース（3,6-anhydro-L-galactose；以下、「AHG」と略する）を単位体にして、これらがそれぞれアルファ1,3結合（ α -1,3-linkage）又はベータ1,4結合（ β -1,4-linkage）で連結されたポリマーである（Duckworth, M. and W. Yappe (1971) Carbohydrate Research 16, 435-445）（図1参照）。

40

【0005】

寒天多糖体を炭素源として用いる微生物の場合、 β アガラーゼ（ β -agarase）又は α アガラーゼ（ α -agarase）を用いて寒天多糖体を小さなサイズのオリゴ糖に切断した後、最終的に β アガラーゼの場合に α -ネオアガロビオース（ α -neohagarobiose, α -1,3-D-galactosyl-3,6-anhydro-L-galactose）に分解し、 α アガラーゼの場合には β -アガロビオース（ β -agarobiose）に分解する。

50

iose, β -1,4-anhydro-L-galactosyl-D-galactose) に分解することが知られている。 β アガラーゼの分解産物であるネオアガラビオースの場合、微生物が代謝するためにはガラクトースへの変換が必要であり、そのために、 α -1,3結合を切断する酵素(α -ネオアガラビオース加水分解酵素)が必須であることが知られている(Ekborg, N. A. et al (2005) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1545-1549; Ekborg, N.A. et al., (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72, 3396-3405)。しかし、これまではS. degradasでのネオアガラビオースの α -1,3結合を切断する酵素は発見されなかった(Ekborg, N. A. et al. (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72, 3396-3405)。

【0006】

微生物でアガロースからオリゴアガロサッカリドを生産する β アガラーゼは、例えば、シュドモナス(Pseudomonas)属菌株(Ha, J. C. et al. (1997) Biotechnol. Appl. Biochem. 26:1-6)、アルテロモナス(Alteromonas)属菌株(Potin, P., et al. (1993) Eur. J. Biochem. 214:599-607)、アガリボランス(Agarivorans)属菌株(Ohta, Y. et al. (2005) Biotechnol. Appl. Biochem. 41:183-191)、シュドアルテロモナス(Pseudalteromonas)属菌株(Belas, R. (1989) J. Bacteriol. 171:602-605)、マイクロシラ(Microsilla)属菌株(Zhong, Z. et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5771-5779)及びビブリオ(Vibrio)属菌株(Aoki, T. et al. (1990) Eur. J. Biochem. 187:461-465)など多くの微生物により生産されることが報告された。

【0007】

紅藻類に由来する寒天多糖体をバイオエネルギーの生産のための原料として用いる場合、複数段階の前処理過程を経て実際に微生物が利用可能な発酵性糖への変換が必須である。寒天多糖体の発酵性単糖類への変換は大きく、化学的前処理と生物学的前処理の2種類の工程を通じて可能である。最初は酸加水分解などを利用する化学的方法であって、比較的簡単な工程や多糖類で構成されたバイオマスを高温で化学的に前処理してフルフラール(furfural)、HMF(ヒドロキシメチルフルフラール)などの毒性副産物を多量生成し、無作為に切断された単糖類及びオリゴの混合物が得られるという短所がある(Pickering et al., 1993, Journal of Applied Phycology 5:85-91; Armis'en, 1995)。それに対し、アガラーゼのような酵素を用いる生物学的前処理及び糖化方法は常温で環境にやさしい方法で発酵性糖であるガラクトースが得られるという長所があるが、現在、商業的に求めることができる酵素は β アガラーゼに限定しており、アガラーゼの産物も通常の微生物が使用し難い二糖類(ネオアガラビオースやアガラビオース)を最終産物とするという短所がある。

【0008】

β アガラーゼ反応の結果として生成されたネオアガラビオースの場合、バイオエネルギーの生産のために用いるためには、発酵性単糖類であるガラクトースへの変換が必須であり、この際、 α -ネオアガラビオース加水分解酵素が必要である。従って、紅藻類バイオマスをバイオエタノールのようなバイオエネルギーの生産原料として用いるための効率的なバイオマス生物学的(酵素的)前処理及び糖化工程の最終段階には α -ネオアガラビオース加水分解酵素が欠かせない。また、ネオアガラビオースの分解産物としてガラクトースと共に得られるAHGは商業的にも販売されておらず、D型のAHGのみ購入が可能な状況であり、しかも高価で販売されている(2009年現在、200ポンド(英国)/100mg、dextra Laboratories)。従って、本酵素を用いてアガロースから高価の珍重性単糖類であるAHGの大量生産が可能である。

【発明の概要】

【0009】

本発明は上記問題を解決し、上記必要性によって案出されたものであって、その目的は、バイオエネルギーの生産などのための発酵性単糖類であるガラクトースへの変換に必須の酵素を提供することにある。

【0010】

本発明の他の目的は、ネオアガロビオースを基質として用いて、単糖類糖であるガラクトースとAHGに変換する方法を提供することにある。

【0011】

前記目的を達成するために、本発明は、配列番号1～配列番号11で構成された群より選択された α -ネオアガロビオース加水分解酵素 (α -neoagarobiase hydrolase; 以下、「 α -NABH」という)を提供する。

10

【0012】

本発明の好適な実施例において、前記 α -ネオアガロビオース加水分解活性を有する酵素は、配列番号1～配列番号11に開示されたアミノ酸配列だけでなく、前記酵素の1つ以上の置換、欠損、転位、付加などの変異により産生される変異蛋白質などの前記 α -ネオアガロビオース加水分解活性を有する蛋白質も本発明の酵素の権利範囲に含まれ、好ましくは、配列番号1～配列番号11に開示されたアミノ酸配列と配列同一性が80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上及び99%以上であるアミノ酸配列を含む。

【0013】

20

本発明において、ポリペプチドが他の配列に対して特定比率（例えば、80%、85%、90%、95%、又は99%）の配列同一性を有するということは、前記2つの配列を整列させる時、前記配列の比較時に前記比率のアミノ酸残基が同一であることを意味する。前記整列及び百分率相同性又は同一性は、当業界において公知となった任意の適切なソフトウェアプログラム、例えば文献[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubelら(eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)に記載されたものを用いて決定できる。好ましいプログラムとしては、GCG Pileupプログラム、FASTA (Pearsonら、1988 Proc. Natl Acad. Sci USA 85: 2444-2448)、及びBLAST (BLAST Manual, Altschulら, Natl Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 及び Altschulら 1997 NAR 25: 3389-3402)がある。他の好ましい整列プログラムは、ALIGN Plus (Scientific and Educational software, PA)であって、好ましくは基本媒介変数を用いるものである。使用可能な他の配列ソフトウェアプログラムは、Sequence software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)で利用可能なTFASTA Data Searching Programである。

30

【0014】

40

本発明の一実施例において、前記酵素はサッカロファガス・デグラダンスなどから得ることが好ましいが、これに限定されるものではない。

【0015】

本発明のサッカロファガス・デグラダンスは通常、購入 (Saccharophagus degradans ATCC 43961) できるが、これに限定されない多様な方法で得られる。

【0016】

また、本発明は前記本発明の酵素をコードする遺伝子を提供する。

【0017】

本発明の一実施例において、前記遺伝子は配列番号12に記載された遺伝子が好ましい

50

が、これに限定されるものではない。

【0018】

さらに、本発明の一実施例において、前記遺伝子はサッカロファガス・デグラダンスから得ることが好ましいが、これに限定されるものではない。

【0019】

また、本発明は、サッカロファガス・デグラダンスを培養し、培養液から本発明の酵素を採取することを含む、本発明の酵素を製造する方法を提供する。

【0020】

さらに、本発明は、本発明の酵素を用いて α -ネオアガロビオースを分解して前記分解物からガラクトース及びアンヒドロガラクトースを採取することを含むガラクトース及びアンヒドロガラクトースを製造する方法を提供する。

10

【0021】

また、本発明は、図8に示すモチーフ1～50（計50個のモチーフ）で構成された群より選択されたモチーフのうち、1、2、3、4、5、6、7、14、16、17、20、34、40を含む13個のモチーフを含む α -ネオアガロビオース加水分解酵素（ α -neoeagarobiose hydrolase）を提供し、より好ましくは、図8に示す50個のモチーフのうち、モチーフ7と34を少なくとも含む α -ネオアガロビオース加水分解酵素（ α -neoeagarobiose hydrolase）を提供する。

【0022】

蛋白質モチーフは、規則的に表されるパターンで表示できれば、通常パターンの表現様式は正規表現式で表す；

20

<http://www.expasy.ch/prosite/prosuser.html>；例えば：

PA[AC]-x-V-x4-{ED}。

【0023】

本パターンは、以下の通り解析される：[Ala or Cys]-any-Val-any-any-any-any-{any but Glu or Asp}

PA<A-x-[ST](2)-x(0,1)-V。

【0024】

このパターンは配列のN-末端になければならず（「<」）、以下の通り解析される：Ala-any-[Ser or Thr]-[Ser or Thr]-(any or none)-Val；Sigrist C.J.A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. Brief Bioinform. 3:265-274 (2002)；Sigrist C.J.A., De Castro E., Langendijk-Genevaux P.S., Le Saux V., Bairoch A., Hulo N. ProRule: a new database containing functional and structural information on PROSITE profiles. Bioinformatics. 2005 Nov 1;21(21):4060-6. Epub 2005 Aug 9；Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Mislé, and Wilfred W. Li, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, Nucleic Acids Research, Vol. 34, pp. W369-W373, 2006)。

30

40

【0025】

本発明で細胞、核酸、蛋白質又はベクターに関連して用いられる時、用語の「組み換え」とは、前記細胞、核酸、蛋白質又はベクターが異種核酸又は蛋白質の導入又は本来的な核酸又は蛋白質の変更ににより変形されたり、又は前記細胞がこのように変形された細胞か

50

ら由来したことを意味する。即ち、例えば、組み換え細胞は、前記細胞の本来的（非組み換え）な形態内では発見されない遺伝子を発現したり、又は異なっては発現時に異常に発現したり、又は全く発現されない本来的な遺伝子を発現する。

【0026】

用語の「蛋白質」及び「ポリペプチド」は、本発明で相互交換可能に用いられる。本発明ではアミノ酸残基について通常の1文字又は3文字のコードが用いられる。

【0027】

本発明において「遺伝子」は、本発明の酵素のコーディング領域の前及び後の領域、それだけでなく、個別のコーディング断片間の介在配列が含まれた、ポリペプチドを生産するのに係わるDNA断片を意味し得る。

10

【0028】

本発明において、用語の「核酸」とは単鎖又は二重鎖のDNA、RNA、及びこれらの化学的変形体を包括する。用語の「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、本発明で相互交換可能に使用され得る。遺伝暗号が縮退しているため、特定アミノ酸をコードするために、1つ以上のコドンを使用でき、本発明は特定のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを包括する。本発明において、「ベクター」とは1つ以上細胞類型内に核酸を導入するために設計されたポリヌクレオチド配列を意味する。ベクターには、クローニングベクター、発現ベクター、シャトルベクター、プラスミド、ファージ粒子、カセットなどがある。

【0029】

20

本発明で用いられた「発現ベクター」は適当な宿主内で目的のDNAを発現させることができる適当な制御配列に作動可能に連結されているDNA配列を有するDNA構造物を意味する。このような制御配列には、転写を招くプロモータ、転写を調節する任意的オペレーター（operator）配列、mRNA上の適当なりボソーム結合部位をコードする配列、エンハンサー及び転写及び翻訳の終結を調節する配列が含まれ得る。

【0030】

本発明で「プロモータ」は遺伝子の転写を開始するために、RNA重合酵素を結合させるのに係わる調節配列である。前記プロモータは、誘導性プロモータ又は構成的（constitutive）プロモータであり得る。

【0031】

30

本発明における用語の「由来する」は用語の「～から起源する」、「得られる」又は「～から得ることが可能な」、及び「～から単離された」を包括し、本発明で用いられる時、これは前記ヌクレオシド配列によりコードされるポリペプチドが前記ヌクレオシドが本来的に存在するか、又は前記ヌクレオシド配列が挿入されている細胞から生産されることを意味する。

【0032】

用語の「培養」は、液体又は固体培地で適当な条件下で微生物細胞集団を成長させることを意味する。好ましい実施例において、培養は（典型的には容器又は反応器内での）アガロースを含む基質を最終生成物として生物転換することを意味する。発酵は、微生物により有機物質を酵素的及び嫌氣的に分解してより単純な有機化合物を生産することを意味する。発酵が嫌氣的条件下で起きるものではあるが、さらに発酵は酸素の存在下でも起きるので、前記用語を厳格な嫌氣的条件にのみ限定しようとする意図はない。

40

【0033】

本発明で用いられた用語の「回収」、「単離」及び「分離」は、自然に結合されている1つ以上の成分から除去された化合物、蛋白質、細胞、核酸又はアミノ酸を意味する。

【0034】

本発明で用いられた細胞と関連して使われた用語の「形質転換」、「安定した形質転換」及び「遺伝子導入（transgenic）」は、細胞が複数世代を通じて維持されるエピゾームプラスミドとしての、又はそのゲノム内に統合された非本来的（例えば、異種）な核酸配列を有することを意味する。

50

【0035】

本発明で用いられた用語の「発現」は、遺伝子の核酸配列に基づいてポリペプチドが生産される方法を意味する。前記方法には転写及び翻訳が含まれる。

【0036】

核酸配列を細胞内に挿入する用語の「導入」は「トランスフェクション (transfection)」、又は「形質転換」又は「形質導入 (transduction)」を意味し、核酸配列の真核又は原核細胞内への統合に関する言及が含まれ、この時、前記核酸配列は細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、色素体、又はミトコンドリアDNA）内に統合されて、自律レプリコンに転換されるか、又は一時的に発現する。

【0037】

以下、本発明について説明する。

【0038】

1. 紅藻類を含む海洋バイオマスの前処理工程過程中、 α -ネオアガラビオースから発酵性糖であるガラクトースを生成する酵素処理工程

寒天多糖体から発酵性糖を生成するために単糖類に分解する前処理過程としては、大きく化学的方法と酵素的な方法の2つの方法が利用可能である。まず、化学的方法は、複合多糖類を無作為的に分解するため、所望の発酵性単糖類を選択的に生産することが非常に難しいだけでなく、生成された糖の発酵を阻害する副産物を生成することもある。また、アルカリ処理や酸処理の場合、相当量の汚染物質を排出し、これを浄化させるために多くの費用がかかり、微生物が利用可能な発酵性糖の生産方法には適していない。酵素的な方法としては、微生物が生成するアガロースを用いて寒天多糖体を分解させることが可能である。このような方法に使用可能な酵素としては、 α アガララーゼ又は β アガララーゼが挙げられる。寒天多糖体を分解する酵素として、 α アガララーゼは寒天多糖体に存在する α -1,3と β -1,4結合のうち、 α 結合を加水分解して最終的に β -アガラビオース二糖体を作り、 β アガララーゼは β 結合を切断して α -ネオアガラビオース二糖体を生成する。このような酵素的な前処理の過程に β アガララーゼを用いる場合、最終産物は α -ネオアガラビオースであって、これは通常の微生物が使用できない非発酵性糖である。これを発酵性糖であるガラクトースに最終的に変換する前処理工程のためには、 α -ネオアガラビオース加水分解酵素が欠かせない。

【0039】

2. 寒天多糖体の酵素的分解産物である α -ネオアガラビオースからガラクトース又はAHGの生産

現在、ネオアガラビオースの加水分解で得られる3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース (3,6-Anhydro-L-galactose) は商業的にも販売されておらず、D型のAHGのみ購入可能な状況にあり、しかも高価で販売されている (2009年現在、200ポンド (英国) / 100mg、dextra Laboratories)。従って、本酵素を用いてアガロースから高価のAHGの大量生産が可能である。

【0040】

本発明の発明者らは、海洋細菌サッカロファガス・デグラダンスで α -ネオアガラビオース加水分解酵素の活性を確認し、該当遺伝子を初めて確認した。また、大腸菌に形質転換して蛋白質を大量生産して α -ネオアガラビオース加水分解酵素の活性を確認した。新規な α -ネオアガラビオース加水分解酵素遺伝子の酵素活性を用いて寒天多糖体を含む海洋バイオマスの前処理工程で適用し、前処理工程で得られた α -ネオアガラビオースからガラクトースを含む発酵性糖の獲得に利用する。

【0041】

近年、寒天多糖体を炭素源として用いて成長できる海洋細菌であるサッカロファガス・デグラダンス (Saccharophagus degradans) が発見され、ゲノム配列が決定された。

【0042】

α -ネオアガロビオース加水分解酵素の遺伝子をスクリーニングするために、まずサッカロファガス・デグラダンスで α -ネオアガロビオース加水分解酵素の活性を確認した。その次に、ゲノム配列情報の分析を通じてサッカロファガス・デグラダンスの遺伝子のうち、糖加水分解酵素ファミリー32に属する遺伝子（蛋白質データベースUniprot database ID: Q21HB2）を α -ネオアガロビオース加水分解酵素として予測した。実際に蛋白質が α -ネオアガロビオース加水分解酵素の活性を有しているかを確認するために、発現用ベクターにクローニングし、大腸菌で過発現して蛋白質を分離精製した後、最終的に酵素の活性を確認した。

【発明の効果】

10

【0043】

本発明では新規な α -ネオアガロビオース加水分解酵素の塩基配列と蛋白質配列を報告している。特に、上述した通り、近年、海藻類バイオマスを用いたバイオエネルギーの生産からバイオマスの発酵性糖への酵素的変換工程のうち、寒天多糖体からアンヒドロガラクトース及びガラクトースの生産には α -ネオアガロビオース加水分解酵素の使用が必須であるので、バイオマス前処理のコスト削減及び歩留まりの向上効果を期待できるという効果を奏する。また、バイオ燃料を生産する酵母や細菌などに α -NABH遺伝子を導入して寒天（アガー）又はネオアガロビオースから直接バイオ燃料を生産することも期待できる。さらに、海洋バイオマスから高付加価値の単糖類であるガラクトースとAHGを生産する工程にも α -ネオアガロビオース加水分解酵素を用いて、有用物質の生産も可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】寒天多糖体の構造を示す図である。

【図2】*S. degradans* 2-40から得られた細胞内粗酵素による反応生成物の薄膜クロマトグラフィー（Thin layer chromatography）を示す写真である。レーンA、ガラクトースのスタンダード；レーンB、0.25%（w/v）アガロースを細胞内酵素と培養したもの、レーンC、0.3%（w/v）グリジウム（紅藻類）粉末を細胞内酵素と培養したもの。酵素反応は30℃、20mM Tris-HCl（pH6.8）で12時間行った。

30

【図3】本発明でスクリーニングした遺伝子の塩基配列及び蛋白質配列を示す。

【図4】大腸菌で発現して精製されたアガラーゼ；12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動；A：分子サイズマーカー、B： α -ネオアガロビオース加水分解酵素（ α -neoagarobiase hydrolase）を示す。

【図5】 α -ネオアガロビオース加水分解酵素（ α -neoagarobiase hydrolase）及び β アガラーゼによるアガロース加水分解の産物の薄膜クロマトグラフィー写真を示す。酵素反応を30℃、20mM Tris-HCl（pH6.8）で行い、その基質濃度は0.25%（w/v）であった。（a）ガラクトース（b-c）反応混合物。A：ガラクトース標準物質；B： α -ネオアガロビオース加水分解酵素（ α -neoagarobiase hydrolase）反応産物（2時間反応）；C：ネオアガロビオース。

40

【図6】 α -ネオアガロビオース加水分解酵素（ α -neoagarobiase hydrolase）及び β アガラーゼによるアガロース加水分解の産物の液体クロマトグラフィー質量分析（Mass Spectrometry）を通じた反応産物の確認を示している。質量分析器を用いた反応産物の質量分析結果（formate（HCOO⁻、分子量：45）にアニオン化）、図6に示すように、ガラクトースの質量は225.1（180+45）、アンヒドロガラクトースは207.1（162+45）で確認されている。従って、加水分解酵素の産物がガラクトースとアンヒドロガラクトースであることを確認している。即ち、基礎科学支援センターソウル分所に質量分析を依頼して得た結果が図6に示す質量分析スペクトラムであり、その結果を解析した結果として酵素の加水分解産物

50

を確認した。

【図7】 α -ネオアガロビオース加水分解酵素を含むホモログ (homolog) 蛋白質のモチーフ (motif) 分析結果を示す。

【図8】 α -ネオアガロビオース加水分解酵素の特異的モチーフを示す。

【図9】図8で確認された α -ネオアガロビオース加水分解酵素の特異的モチーフをいづれも含んでいる蛋白質の配列を示す。

【図10】図8で確認された α -ネオアガロビオース加水分解酵素の特異的モチーフをいづれも含んでいる蛋白質の配列を示す。

【図11】図9及び図10から得られた10個の配列と α -ネオアガロビオース加水分解酵素のアミノ酸配列を用いた多重配列整列を示す。

【図12】大腸菌で発現して精製されたシュードアルテロモナスアトランティカ由来アガラーゼ；12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動；Lane A、分子サイズマーカー；Lane B、 α -ネオアガロビオース加水分解酵素を示す。

【図13】大腸菌で発現して精製されたストレプトマイセス・セリカラー由来アガラーゼ；12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動；Lane A、 α -ネオアガロビオース加水分解酵素；Lane B、分子サイズマーカーを示す。

【図14】 α -ネオアガロビオース加水分解酵素 (α -neoagarobiase hydrolase) 及び β アガラーゼによるアガロース加水分解の産物の薄膜クロマトグラフィー写真である。酵素反応を30℃、20mM Tris-HCl (pH6.8) で2時間行い、その基質濃度は0.25% (w/v) であった。(A) ガラクトース (B-D) 反応混合物。Lane A、ガラクトース標準物質；Lane B、サッカロファガス・デグラダンス (Saccharophagus degradans 2-40) 由来 α -ネオアガロビオース加水分解酵素 (α -neoagarobiase hydrolase) 反応産物；Lane C、シュードアルテロモナスアトランティカ (Pseudoalteromonas atlantica T6c) 由来 α -ネオアガロビオース加水分解酵素 (α -neoagarobiase hydrolase) 反応産物；Lane D、ストレプトマイセス・セリカラー (Streptomyces coelicolor A3) 由来 α -ネオアガロビオース加水分解酵素 (α -neoagarobiase hydrolase) 反応産物。

【実施例】

【0045】

以下、非限定的な実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。ただし、下記の実施例は本発明を説明する目的で記載されたものであって、本発明の範囲は、下記の実施例により制限されない。

【0046】

実施例1：サッカロファガス・デグラダンス粗抽出液からの α -ネオアガロビオース加水分解酵素の酵素活性の確認

サッカロファガス・デグラダンスが α -ネオアガロビオース加水分解を通じて単糖類であるガラクトースとAHGを生成する酵素活性を有しているかを確認するために、次のような方法で粗抽出液を得て活性を確認した。サッカロファガス・デグラダンスを、海水塩を含む培地で対数増殖期の間まで育成させた後、40mlの培養液を遠心分離した後に超音波を利用して細胞を破碎し、粗抽出液を得た後、寒天多糖体を β アガラーゼで分解して得られたアガロースを基質として反応分解産物をTLCで観察した。Aレーンではガラクトース標準物、Bレーンでは0.25% (w/v) のアガロースをサッカロファガス・デグラダンスの細胞内粗酵素液と反応させた産物、Cレーンでは0.3% (w/v) 紅藻類である乾燥した寒天粉をサッカロファガス・デグラダンスの細胞内粗酵素液と反応させた後、産物をTLCで分析した結果である。サッカロファガス・デグラダンスの細胞内粗酵素液との反応を通じてアガロースと寒天からいづれも単糖類であるAHGとガラクトース、そして二糖類を生成することが確認された。従って、サッカロファガス・デグラダンスは細胞内に α -ネオアガロビオース加水分解を通じて単糖類であるガラクトースとAH

10

20

30

40

50

Gを生成する酵素を有していることが分かる。

【0047】

本発明でスクリーニングした遺伝子の塩基配列及び蛋白質のアミノ酸配列は、図3の通りである。

【0048】

実施例2： α -ネオアガラビオース加水分解酵素の生化学的活性及び特徴調査

精製された α -ネオアガラビオース加水分解酵素の活性は、以下の通り確認された。まず寒天多糖体を β アガラゼで処理して酵素的処理の最終産物であるネオアガラビオースを生成した後、それを基質として α -ネオアガラビオース加水分解酵素の反応産物をTLCで確認した(図5のTLC結果)。TLC溶媒条件(n-Butanol:EtOH:Water; 3:2:2)で α -ネオアガラビオース加水分解酵素で処理された基質は、ガラクトースとアンヒドロガラクトースと推定される物質に分解されることが確認された。ガラクトースRf値は約0.46、ネオアガラビオースのRf値は約0.58でTLC上で確認された。

【0049】

ネオアガラビオース加水分解酵素により生成された産物の分子量を測定するために、液体クロマトグラフィー-質量分析器(Liquid chromatography-mass spectrometry)を通じて分子量を確認した。アンヒドロガラクトース(AHG)は分子量が162であり、ガラクトース分子量は180であることをLC-MS分析結果で示された207.1m/zはアンヒドロガラクトースに蟻酸(formic acid)が結合された状態である分子量でアンヒドロガラクトースが検出されたことが分かり、179.1m/zと225.1m/zはガラクトースとガラクトースと結合した蟻酸の分子量でガラクトースが検出されたことが確認できる。従って、LC-MSで示されるように、ネオアガラビオース加水分解酵素の反応産物である2種類の単糖類であるガラクトースとアンヒドロガラクトースが反応産物であることが確認できる(図6参照)。

【0050】

実施例3： α -ネオアガラビオース分解酵素の特異的ペプチドモチーフ配列

*一般に、蛋白質モチーフとは、同一の分子的機能を有する蛋白質で一種のパターンのように現れる短いペプチド配列を意味する。このような蛋白質モチーフは、蛋白質全体の配列中、大体進化的に正常に保存されており、活性部位を含む分子的機能を代表する領域で表示されるパターン化されたアミノ酸配列で表示される(Sigrist C.J.A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. Brief Bioinform. 3:265-274 (2002); Sigrist C.J.A., De Castro E., Langendijk-Genevaux P.S., Le Saux V., Bairoch A., Hulo N. ProRule: a new database containing functional and structural information on PROSITE profiles. Bioinformatics. 2005 Nov 1; 21(21):4060-6. Epub 2005 Aug 9; Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Mislleh, and Wilfred W. Li, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, Nucleic Acids Research, Vol. 34, pp. W369-W373, 2006)。

【0051】

α -ネオアガラビオース加水分解酵素を規定付けられる蛋白質モチーフの配列を確認するために、まず α -ネオアガラビオース加水分解酵素のアミノ酸配列をテンプレートとして用いて公共データベースをNCBIブラスト(blast)を用いて検索して統計的留意性(E-value<0.001)を有する60個(α -ネオアガラビオース加水分解酵素を

含む)の蛋白質のアミノ酸配列を収集した。これらの配列を蛋白質モチーフ検索プログラムであるMEME (http://meme.sdsc.edu/meme4_1/intro.html; 使用パラメーター: mode=zero or one occurrence & nsites=50、mwin=8 それ以外の条件は default parameter を用いた; Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Mislleh, and Wilfred W. Li, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, pp. W369-W373, 2006) を用いて α -ネオアガラビオース分解酵素に特異的なモチーフを検索した。その結果、図7のように、サッカロファガス・デグラダンスの α -ネオアガラビオース加水分解酵素は相同性を有する蛋白質の分析から得られた計50個のモチーフのうち、13個の特異的モチーフ(1、2、3、4、5、6、7、14、16、17、20、34、40)を有することが確認された。従って、この13個の特異的モチーフが α -ネオアガラビオース分解酵素の活性を代表するモチーフであることが確認できた。その中でもモチーフ7と34は、 α -ネオアガラビオース加水分解酵素の活性を代表する蛋白質に必ず現れる必須の2個のモチーフであって、それぞれ図8及び図9に示す(通常、蛋白質モチーフは、正規表現式(regular expression)を用いて表すので、図面でも同じ方式で表現した; Sigrist C.J.A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* 3:265-274 (2002))。従って、13個の特異的モチーフのうち一部を含み、その中でもモチーフ7と34を必ず含む蛋白質は α -ネオアガラビオース加水分解活性を有すると言える(図8参照)。 α -ネオアガラビオース分解酵素と配列相同性を示す蛋白質の中でこれらの13個の特異的モチーフの一部を含む一方、モチーフ7と34を必ず含む蛋白質は10個であることが確認された(図9及び10参照)。

【0052】

*前記 α -ネオアガラビオース分解酵素で発見される13個の特異的モチーフの一部を含む一方、モチーフ7と34を必ず含む蛋白質は現在公共データベース上で10個が発見されている。それらのオリジンはそれぞれ、*Pseudoalteromonas atlantica* T6c, *Microscilla* sp. PRE1, *Bacteroides plebeius* DSM 17135, *Gramella forsetii* (Strain KT0803), *Flavobacteriales bacterium* H TCC2170, *Paenibacillus* sp. oral taxon 786 str. D14, *Ruminococcus* sp. 5_1_39 BFAA, *Streptomyces coelicolor* A3である。それぞれのアミノ酸配列は図10に示す。

【0053】

図11に示されている配列は、上述したように、 α ネオアガラビオース加水分解酵素と配列相同性を有する蛋白質の中で13個の特異的モチーフの一部を含む一方、モチーフ7と34を必ず含む10個の蛋白質を選んで多重整列したものであり、それらの10個の蛋白質の配列は、図9及び図10に示す。

【0054】

実施例4: α -ネオアガラビオース加水分解酵素遺伝子の蛋白質配列の相同性の確認

サッカロファガス・デグラダンス由来の加水分解酵素の蛋白質配列の相同性の検索を通じて類似する機能を有すると予想される候補遺伝子を確認した。候補遺伝子の具体的な機能は知られていないが、炭水化物関連の酵素/蛋白質データベースであるCAZy (<http://www.cazy.org>) によれば皆文リコーシード加水分解酵素(glycoside hydrolase family 32, GH32)に属することが確認された。GH32 familyに属する蛋白質が有する知られている機能はinvert

ase (EC 3.2.1.26) ; endo-inulinase (EC 3.2.1.7) ; β -2,6-fructan 6-levanbiohydrolase (EC 3.2.1.64) ; endo-levanase (EC 3.2.1.65) ; exo-inulinase (EC 3.2.1.80) ; fructan β -(2,1)-fructosidase / 1-exohydrolase (EC 3.2.1.153) ; fructan β -(2,6)-fructosidase / 6-exohydrolase (EC 3.2.1.154) ; sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase (EC 2.4.1.99) ; fructan : fructan 1-fructosyltransferase (EC 2.4.1.100) ; sucrose : fructan 6-fructosyltransferase (EC 2.4.1.10) ; fructan : fructan 6G-fructosyltransferase (EC 2.4.1.243) ; levan fructosyltransferase (EC 2.4.1.-) である。従って、GH32 family に属する一部の蛋白質がネオアガラビオース加水分解能と同じ分子機能を有することは、本発明で初めて報告している。

【0055】

サッカロファガス・デグラダンス (Saccharophagus degradans 2-40) 由来 α -ネオアガラビオース加水分解酵素 (以下、 α -NABH という) のアミノ酸配列の相同性の検索 (ブラスト検索-添付ファイル参照) から得られた配列のうち、50%以上の相同性を有する蛋白質配列をブラストの E-value により羅列すれば、以下の通りである (次は UniProt データベース番号を使用、括弧内は由来微生物及び % identity)。

1. Q15UF2 (Pseudoalteromonas atlantica (Strain T6c / BAA-1087)、70%)、
2. Q93PB3 (Microscilla sp. PRE1., 59%)、
3. B4CY74 (Bacteroides plebeius DSM17135., 60%)、
4. A0M245 (Gramella forsetii (Strain KT0803) ., 56%)、
5. A4AR39 (Flavobacteriales bacterium HTCC 2170., 57%)、
6. C6J3P3 (Paenibacillus sp. oral taxon 786 str.D14., 58%)、
7. C6JDD4 (Ruminococcus sp. 5_1_39 BFAA., 58%)、
8. C6J313 (Paenibacillus sp. oral taxon 786 str.D14., 57%)、
9. Q15XP8 (Pseudoalteromonas atlantica (Strain T6c / BAA-1087)、55%)、
10. Q9RKF6 (Streptomyces coelicolor、56%)

【0056】

実施例 5：大腸菌での発現及び大きさの確認

前記で獲得した 50% identity 以上の配列相同性を有する蛋白質の中で最も高い配列相同性を有するシュードアルテロモナスアトランティカ (Pseudoalteromonas atlantica T6c) 由来蛋白質 (Q15UF2) と最も低いストレプトマイセス・セリカラー (Streptomyces coelicolor A3) 由来蛋白質 (Q9RKF6) をそれぞれクローニングして α -NABH 活性を有しているかを確認した。まず、これらを暗号化する遺伝子の塩基配列をそれぞれ大腸菌発現ベクターである pET21a (ノバジェン、米国) に挿入した (以下、シュードアルテロモナスアトランティカ由来 α -NABH 遺伝子を含む発現ベクターを「pPSAGA J」、ストレプトマイセス・セリカラー由来 α -NABH 遺伝子を含む発現ベクターを「pScAG

A J」という)。組み換え α -NABHが大腸菌で成功裏に発現することを確認するために、pPsAGA JとpScAGA Jを発現用大腸菌である*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換させた後に、50 mg/L濃度のアンピシリン抗生剤を含む固体培地に塗抹した。前記形質転換により得られたコロニーを50 mg/L濃度のアンピシリン抗生剤が添加されたルリアベルターニ (LB) 培地に接種した後、37℃で一日間振盪培養して菌体を確保した。その後、発現の確認のために、形質転換体を50 mg/L濃度のアンピシリン抗生剤が添加されたルリアベルターニ (LB) 培地に接種した後、37℃でOD₆₀₀ = 0.5~1.0まで振盪培養し、0.5 mM/Lの濃度でIPTGを添加して180 rpmで4時間発現を誘導した。培養液は遠心分離 (12000 rpm、4℃、10分) して菌体を回収し、回収した菌体は20 mMのトリス緩衝液 (Tris-HCl pH 7.4) に懸濁して超音波破碎機で破碎した後、12%のSDS-PAGEで大きさを確認した。大きさが確認された破碎した懸濁液を15分間遠心分離して上澄み液を粗酵素液として用いた。

10

【0057】

実施例6： α -ネオアガロビオース加水分解酵素の生化学的活性の確認

精製された α -NABHの活性は、以下の通り確認された。まず寒天多糖体を β アガラーゼで処理して酵素的処理の最終産物であるネオアガロビオースを生成した後、それを基質として α -NABHの反応産物をTLCで確認した。TLCを通じた確認は、Silica gel 60 TLC平板に反応液を1 μ l点滴し、TLC溶媒条件 (n-Butanol : EtOH : Water ; 3 : 2 : 2) で展開した。展開したTLC平板は1次処理溶液である硫酸 (10% (v/v) H₂SO₄ in Etanol) で処理した後、乾燥し、1次処理された平板は再び2次処理溶液であるナフトレゾルシノール (0.2% (w/v) naphthoresorcinol in Etanol) で処理した。このように処理されたTLC平板は乾燥後、加熱した。

20

【0058】

前記実施例4~6の結果は、以下の通りである。

【0059】

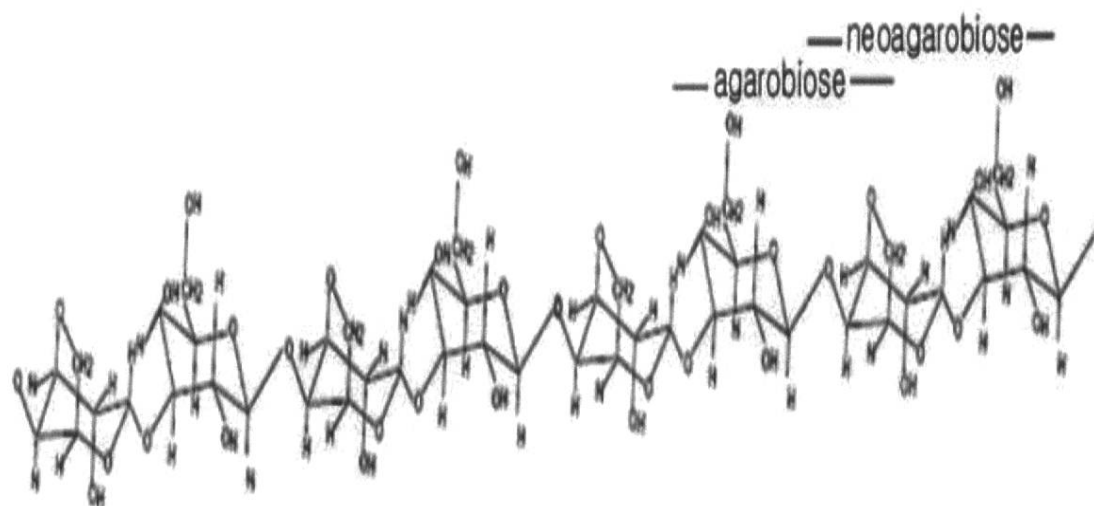
発現用菌株である*E. coli* BL21 (DE3) を用いて形質転換したシュードアルテロモナスアトランティカとストレプトマイセス・セリカラー由来 α -NABHの発現と大きさの確認は12%のSDS-PAGEを通じて確認した。シュードアルテロモナスアトランティカとストレプトマイセス・セリカラー由来 α -NABHの予想分子量は、それぞれ40.7 kDaと41.1 kDa程度であり、予想分子量と同一であることが確認された (図12、図13)。

30

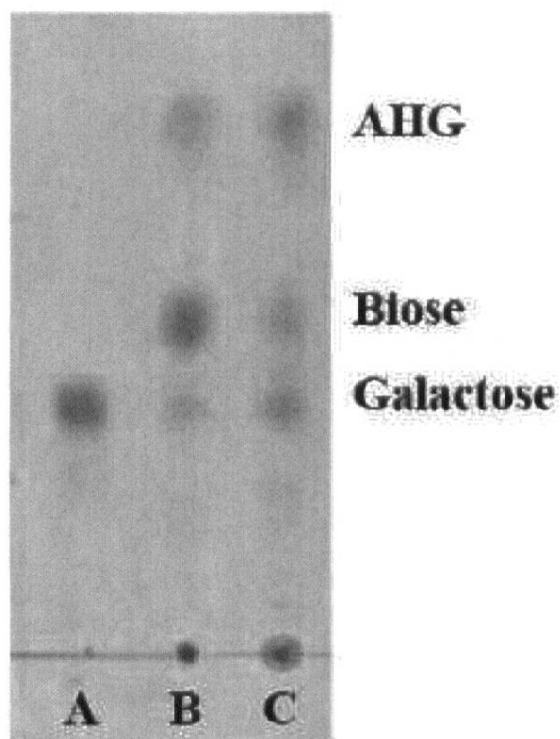
【0060】

また、分解産物を確認するために、標準物質としてD-ガラクトースを用いて予想分解産物を確認した。 α -NABHで処理された二糖類であるネオアガロビオースはD-ガラクトースと同一のRf値で確認されたガラクトースとアンヒドロガラクトースと推定される物質に分解されることを確認した (図14)。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

```

ATG ACC GAT TCA AAA GTA AAT AAA AAA TCG ACT AAA GCG ACC CCG CCA CCC ALA GAG CGC < 60
M S D S K V N K K L S K A S L R A C E R

GGC TAC GAT GAA AAG GGG CCT GAA TGG CCG TTT GAG TTT GAT AIT ACC CCA CTA AAA GGC < 120
G Y D E K G P E W L F E F C I T P C K G

GAC TTA GCG TAC GAA GAA GGC GTA ACT CGT CGA GAC CCC AGC GCA GTA TTA AAG GTG GAC < 180
C I A Y E E G V T R R D F S A V L K V C

GAT GAA TAT CAC GTT TGG TAC ACC AAG GGC GAA GGT GAA ACA GTA GGC TTC GGC AGC GAC < 240
C E Y E V W Y T K G E G E T V G F G S C

AAC CCC GAA CAC AAA CTC CTC CCA TCG CAT AAA ACA GAA GTT TCG CAC CCC ACC CTC AAA < 300
N P E D K V F P W D K T E V W H A T S K

GAT AAG ACT ACT TGG AAA GAA ATT GGC CCT GCC ACA GAA CGC GGC GCA GGT GGC GCA TAT < 360
C K I C W K C C G P A C Q R G A A G A Y

GAT GAC CTT CCA CTC CTC ACC CCG GAA CCG CCG GCG GAT AAG CCG ACC TAC TAC GTT GTA < 420
C C R A V E T P E V C R H N G T Y Y L V

TAC CAA ACC CTA AAA GCG CCC TAC TTA AAC CCA TCG CTA GAG CAT ATA CCC ACC GCA TAC < 480
Y Q I V K A P Y L N R S C C H C A C A Y

AGC GAT TCG CCG TTT GGC CCA TGG ACC AAA TCG GAT GCG CCA ATT TTA AGC CCA GAA AAT < 540
S C S C E G P W C K S D A F I C S P C N

GAC GGC GTT TGG GAT ACC GAC GAA GAC AAT CGA TTT TTA GTA AAA GAG AAA GGC AGT TTC < 600
C G V W D T D E C K R F C V K E K G S F

GAT ACC CAC AAA CTA CAC GAC CCC TCG TTA ACC TTT TTT AAC AAT CCG TTC TAC CTC TAC < 660
C S A K V H C P C L M E F N N R E Y L Y

TAC AAA GGC GAG ACT ATG GGC GAA AGC ATG AAC ATG GGC GGC AGA GAA ATA AAA CAC GGT < 720
Y K S E T M G E S M N M E G R E I K I E

GTA GCC ATT GCC GAC TCG CCA CTT GGG CCC TAC ACC AAA AGC GAA TAC AAC GGT ATT ACC < 780
V A T A D S P I G C V T K S P Y N P T T

AAC AGT GGC CAT GAA GTT GCC GTA TGG CCC TAC AAA GGT GGA ATG GCC ACC ATG CTA ACC < 840
N S G E E V A V W C Y K G C Y A C M L I

ACC GAC GGG CCA GAA AAG AAC ACC TCG CAG TGG GCA GAA GAC GGC ATT AAC TTT GAC ATT < 900
T C G C E K N T C Q W A E C C C N F C I

ATG TCG CMT ACA AAA GGC GCA CCA GAA GCA GTA GGT TTT TTT AGA CCA GAA AGC GAT AGC < 960
M S F I K G A P F A V G F F R P E S C S

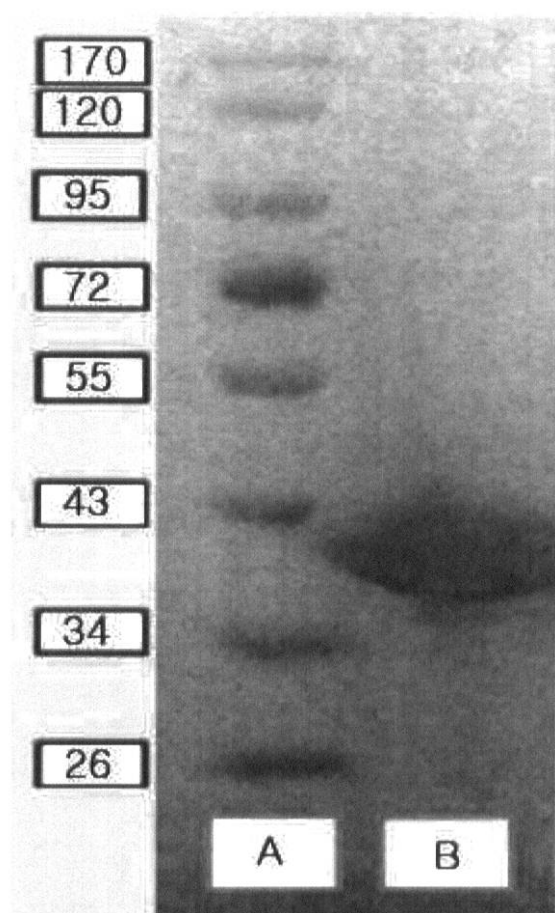
GAC GAC CCG ATA AGC GGC ATT GAA TGG GGG CCA AGC CAC AAG TAC GAC GCC AGC TGG AAC < 1020
C C P I S G I E W G C S H K Y D A S W N

TGG AAC TAT CCA TGC TTT CTC AAA AGC CGT CGA CAA GTT TTA GAT GCA GGT AGC TAC CAG < 1080
W N Y L C F F K C R R Q V L D A G S Y Q

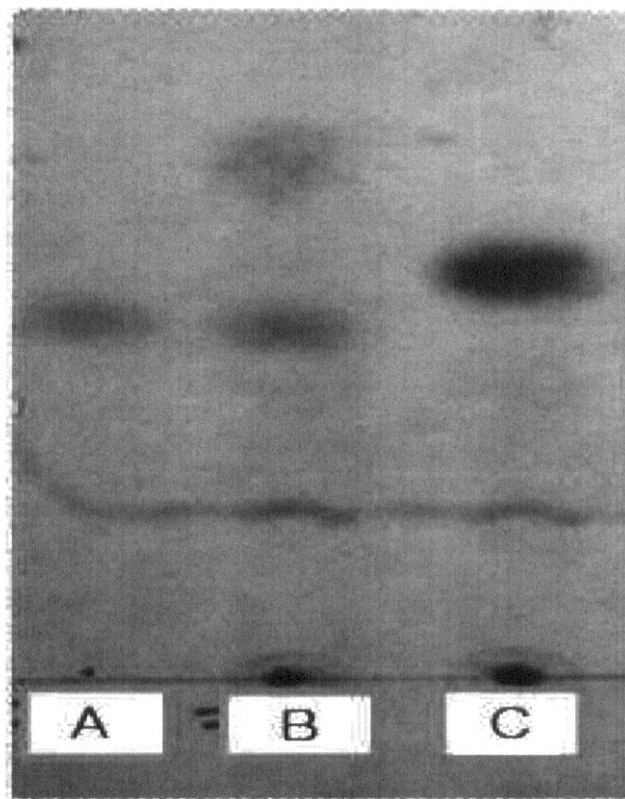
CAA ACA GGC GAT TCC GGA GCA GTA TAA < 1107
Q T S D S G A V *

```

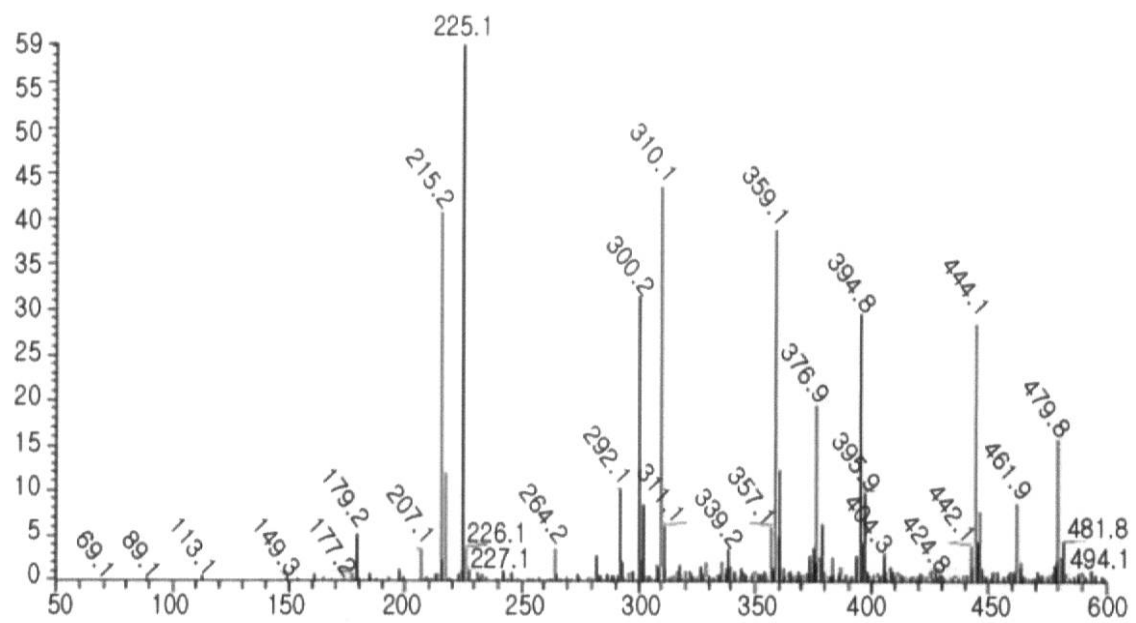
【図 4】



【図 5】



【図 6】



Combined block diagrams: non-crawling sites with p -value < 0.0001

^a Above-Mean Diagram represents Sequence Spacing (Mottly-value), Sequence Spacing (Mottly-value), Sequence Spacing (Mottly-value).¹⁰

Regular Expression of Motifs

Motif 1	[IV]GVAV[AS]DSPxGP[WF][KET][KR]
Motif 2	[ATN]PE[IV][LY]EH[DN]GK[YF]Y[LM][YF][YF]
Motif 3	VGVA[TI][AS]D[SD][PI][LE]GP[YF]TKSxNP[IV]
Motif 4	NSGHE[TV]C[VL][WFI]PQ[YF]K[GD]G[IM]A[AS]L[LJ]TTDGPENKTIQ[YWF]A[PE]DGI[IV]NFIEDI[MK]IAS[IVH]KIGN[API]EHJA
Motif 5	[AY]TSKD[GL][VI][TN]WKE
Motif 6	VxRR[DE]P[SP]S[VI][IL]K[EV]D[GD]xYY[VM]WY[ST]
Motif 7	DNR[FL][LT]V[KV][SH][KQ]G[DS]FDS[HL]KVHDP[CIT]L[FL][FP][FY][INR][GN][KQR][FY]LYYKGE[QRT]MGEEM[NT][FAM]GGR[ET][IT][KR]
Motif 14	GFG[IG][DG][DI][PE][DN][DA]KVFPWDR[CS][DE][IV]W[YH]
Motif 16	[DEK][QAEK]P[IL]L[RS]P[GS][DN][DTN]G[EIS]WD[GD]
Motif 17	[IVL]GRGE[KP]G[SA][YF]DDR[SA]VF
Motif 20	G[LP][YFN]R[INPST][ELP]DA[DES]DKR[ENS]P[LT][EA][GI][LJ][RE]WGL[CS]H[DIKN][YV][NDH][SAN][SK][WD]
Motif 34	Q[TV]A[VI][QK][SA]PY[TLN][NVL]R[STV]
Motif 40	PLKGDLAYEEG

>tr|Q9RKF6|Q9RKF6_STR00 Putative uncharacterized protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SC03481 PE=4 SV=1
 WTMAESATVGRGVADPWFODFRITFPVQGLDPEVGVHRDPSSVLTVDGRVHWVT
 RSTGETDGFGTGDPMAKYFPMQWSEIWHATSDOGATWVEQGRALGRGEGSYDORSVFIP
 EYVLEHQGFVLYVQVIRSPYVALAMAKPSPDGPVRSQPILRPQADGEWAGEE
 QDNRLSVSGSSFSDSKYHDPILYPFGGRFFLYYKGEQMGEGFSGGRITTRWGLAIDOLE
 GSPVHRCPANPVTNSGHETCVNRYGDIAMLLTDGPENTIQAPDGINFEIMAHINPP
 WATGATGLRLPDHAYAPLDGVRWGLCHDYASWHYIQGFADDERQKWFYTRGLSPETAESA
 ADALPAPEK
 >tr|Q15XP8|Q15XP8_PSE46 Putative uncharacterized protein OS=Pseudoalteromonas atlantica (strain T6c / BAA-1087) GN=Pat1_0812 PE=3 SV=1
 MKYWLIGALSLTADNNTMESETRASTVSAPNAKVSQADYAYLAISQDTWSAAK
 RALALANVHNQEGNFEHRHETLFGDFADPNVSRPSPKVLKVDNVFYTWYTRTGEAVG
 FGTGDPNAKYFPMQDAEIIWYATSKDGYHDEKGRALGTGDWGFORSVFTPEVLAHQGM
 FVLYVQVIAKAPLKRNTKNTAMAYSSPDGPWRKLDAPILTASDTGEAGTQDNPLVKS
 QGDFDSKYHDPHTLFLYRDKFVLYYKGERMGEKTAGGREIRWGYAIDNPQGPVKSFAF
 NPIITSHGHELCWQVQDGIAYSSHDGPEKQITQVAPDGINFEYNSVLPSPSAIGLVES
 LDKNAVPTAGLEWGLYHEWVIPPCKTWNSGINHIIKRFSEFAPNRYSMQGSIGNTPQNS
 GEFINKQSDH
 >tr|D6J313|D6J313_9BAQ Putative uncharacterized protein OS=Paenibacillus sp. oral taxon 786 str. D14 GN=P0T6_D2762 PE=4 SV=1
 MGNKKESAAITRAKQYTKNAWFDCKYVEVGLGYEEGIIHRDPSSVIKVGDLVYVWT
 KSVLGEAVGNTGDPKVPFWDQSDWYATSDGTTWTERGMVGRGPKGSYDORSVFTP
 EILHHQGFVLYVQVIEGGVLLRYKENIAMAFAESPEGPWRKLDAPILRPANNGEWFQDD
 DNPLTKHKGDFSLKYHDPVLYVNDQFVLYYKGEQKGEEMFGGRITTKWGLAIDSHPE
 GPVYKSEYNPVTNSGHETLLWYVRGMAALLSTDGPEKNTIQVAPDGINFEIEAVIKNPP
 EAAAGPRTEDTRSPLEGIHWGLCHNVHTKWNHILKFRITVEDYKHYVANKINPEVLLGK
 KAKKKO
 >tr|D6J004|D6J004_9FIRM Putative uncharacterized protein OS=Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA GN=RSAG_01951 PE=4 SV=1
 MKLSSASKRAIEBNVYQSDWFDCKESGLEIGVKEGIHRDPSSVIKVGDDVFWVSR
 SVYSPHKGFTIGDEAKVFPWDQSDIIWYAYSKDGYWEEKGPAYVVRGERGAYDORSVFTE
 ILVEVEKLYVLYVQVHPVWNSFDSIAIAVADSPHGPFTKSKPEILTPDKGIWEGEED
 NPFAYKKGSFDSKYHDPILFAFRGKFVLYYKGERMGEELVNGGRETIKWGLAIDNLLG
 PVYHRSEYNPVTNSGHETLLWYVNGGIIAFLRTDGEKNTIQFAEDGINFEIKSVIKQGP
 ACGPVRLHESDNLKGMFWGLCHDYQSDYGFIKRFDIDEWQKYYTNRNWEY
 >tr|D6J3P3|D6J3P3_9BAQ Putative uncharacterized protein OS=Paenibacillus sp. oral taxon 786 str. D14 GN=P0T6_D2958 PE=4 SV=1
 MKKESAAIKRAKQYTKNSQWFCFEFRI SPVQGLGYEEGVHRDPSSVIKYNLYVWYTKT
 EGEAAQFGTGDPAKYFPMQDLSEVWYATSPDGVNWTTERGHAIIRGPKGSYDORSVFTEI
 LHEDKFVLYVQVQSPVTLRTLENIAMAFAESPEGPWRKLDDEILRPNNNGEWFQDDON
 RLTKHKGDFSLKYHDPHTLFLVNDQFVLYYKGEQMGEEWFGGRITTKWGLAIDHPEGP
 VYKSEYNPVTNSGHETLLWYVRGMAALLTDGPEKNTIQVAPDGINFEIEAVIKNPP
 PGVYRTPDAORSPLEGLHWGLCHNVHSHWNYIQMYTVDESFKHYWNKINPEELWLGKSP
 KRNG
 >tr|A4AR99|A4AR99_9FLA0 Putative uncharacterized protein OS=Flavobacteriales bacterium HTC2170 GN=FB2170_15408 PE=4 SV=1
 MKKEVEWEKSFETISNEQLDNLGINTRSDLSASAKRALKWPNIGNEWFIETSAKPLKG
 DLAYEEGVHRDPSSALIFENGKYVWYVWYSLGESQGFGGIENDKYFPMQDQIWWYATSV
 DQWITVEEGPAIVYRVNGEFDORSVFTVEIMKYENNMYLYCYQTVYRVKNDQVGLAW
 SDSFDGPWTKSKQPIVLPADNGIWKGLDQNPFSYEKKGDFDSKYHDPCLIPWNGKELY
 YKGEQMGEEITFGGRQIRHGLAIAENPQGPVTKSPYNPISNSGHEICVWVEVDGIASLIT
 TDGPEKNTIQVANDGINFEIMAVIKGAPHAIGLNRNVONGKFTPELHWGLSHVYNNSDV
 GSTIRFSSQLTKVTHAKGEKAK

【図 10】

```

>tr|A0M245|A0M245_GRAFK_Secreted protein OS=Gramella forsetii (strain KT0803) GN=GF0_1720 PE=4 SV=1
MIKTKALIVIGLWATLVSNQNTSEKISAEKTEKPEISQVDIDRLGINTPDSLSAASVYR
ALDWDVGNWEFIEFSELOPLKGLAYEEGVYRDPSSALLKHGKYVWYTKSVGTQGF
GGDIENDKVFPPDRCDIIVYATSEDCMTWEEGGIIVAREKEGEYDORSVFTVEIMEDKGY
VLSYQTIGSPYNYRINKVQGLAWADSPNGFWTKSKDPTLSPADNGIWKGEENHFAVEKK
GDFDSHKYHDPCLIPYNGKYVLYKGEQMGEEITFGGRQIRHGVAIADNPKGPYVYSAYN
PISNSGHEICVWKKHGGIASLITTDGPEKNTIQWAPDGVNFGIKSVIKGAPHAIGLNFEL
NTDESEEPGALQWGLSHIVNNSDYQSIWRFSSKPRTSVAKGEKAE
>tr|B5CY74|B5CY74_9BADE_Putative uncharacterized protein OS=Bacteroides plebeius DSM 17135 GN=BACPLE_01671 PE=4 SV=1
MRKIIFAAGMSSLACDNTGNTQITAVDQTONYDERKADSLGIPKGNLSAAMKRAWKW
ENHONKWFEEYKMEPLKGLAYEEGVYRDPSSAMLIKIGDTYVWYKSVGTQGFAGDIE
KOKYFPWDRCDIIVYATSKDGLTWKEGIIAYRBEKGAYDORSVFTPEWMEWKGYLYCYQ
AYKSPYTRYKNTIGMACADSPGLWTIKDKPYLEPSOTGEWEGEDNRFYVSKGDFDS
HKYHDPCLIPYNGKYVLYKGEQMGEEITWGGREIKHGVAIAENPMGPYVYSAYNPISNS
GHEVCYWPYKGGIASLITTDGPEKNTIQWSPDGINFEIWSYKGAHAIGLNRSDAEKE
PTEILWGLTHIVNNSDYQSIWRFSTWTLQHTAKBESKERK
>tr|Q93PB9|Q93PB9_9SPHI_Putative uncharacterized protein OS=Microscilla sp. PREI PE=4 SV=1
MKIMNVKYSTIGAMTALLFFASQTPCEEENFEITQDKIDVLGITNPKLSAASKRA
LQWPDIGNEWYGEFYVGLKGLAYEEGVYRDPSSIIGHGKYVWYKSVGTQGFAG
DIEKOKYFPWDRCDIIVYATSEDCMTWKEEGMAYRBEKGITVDORSVFTTEWMEHGTGYL
VYQTYKSPYNYRINKVQGLAWSDSPYGPWTCKSEPIILSPDNGIWKGEENHFLVEKKGQ
FDSHKYHDPCLIPWNGKYVLYKGEQMGEEITFGGRQIRHGVAIADNPKGPYVYSAYNPI
SNSGHEICVWKKHGGIASLITTDGPEKNTIQWAPDGINFDIIAIPGAPHAIGLNFELNN
EDPFGIFQWGLTHEWYTDWQVIRFEKGKTTTHARGETGSKKSSDE
>tr|Q15UF2|Q15UF2_PSEAG_Putative uncharacterized protein OS=Pseudoalteromonas atlantica (strain T6c / BAA-1087) GN=Pat1_1968 PE=4 SV=1
MTQAKQKSLATKRAIERGVDSKNADWNIIEFETSPKGGFAFEEGVIRDPSTVSYSDDY
VHCWYTKGTGETVGFSTNPQDKVFPWDLTEVWHATSHOGETWHEQGAITRGTGAFDD
RAYFTPEVLAHNGKYVLYVQTYQVPTNRQIEQIAIAHADSPFGPIKSTAPIILSPMDG
EWRRDEDMRFHHSKGSFDSHKYHDPCLLYFNGKFLHYKGETWGEENWFGGREIKHGVA
IADDIILGPYKSEYNPISNSGHEVYVWYVGGVYASLLITTDGPEKNTIQWAPDGINFDIIKA
HIKGAPEAYGLYRPSNIEDTSPPLHIGLCHKYDSSWNNWYICRYLKKQVLDAGTQNS
N
>tr|Q21HB2|Q21HB2_SAKD2_Glycosyl hydrolase family 32, N terminal OS=Saccharophagus degradans (strain 2-40 / ATCC 43961 / DSM 17024) GN=Sde_2657 PE=4 SV=1
MSDSKYNKKLSKASLRAIERGVDEKGPWILFEFDITPLKGLAYEEGVIRDPSSAVLKVD
DEYHWYTKGEETVGFSDNPEDKVFPWQTEVWHATSKOKITWKEIGPAIQRGAGAY
DORAVFTPEVLAHNGKYVLYVQTYKAPYLNRSLEHIAIAYSDSPFGPIKSDAPIILSPEN
DGYWDTDEDMRFHVKKGSFDSHKYHDPCLMFFNRFYLYKGETWGEENWFGGREIKHG
VAIADSPGLPYTKSEYNPISNSGHEVAVWPKGMAIHLITTDGPEKNTQWAEEDGINFDI
MSHIGKGAPEAVGFPPESQSDPIISGIEWGLSHKYDAIWNWYLDFFKTRQVLDAGSYQ
QITGDSGAY

```

【図 11】

C6j313/C6j313_9BACL/1-367 1-----MGMKKESATIRAKQYTKNAD 23
 C6j3P3/C6j3P3_9BACL/1-364 1-----MRKESATKRAKQYTKNSDF 21
 Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370 1-----MTMPAESATVRGRRYPADP 23
 C6jDD4/C6jDD4_9FIRM/1-353 1-----MKLSASAKRAIERNNYQSC 22
 Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361 1-----MTQAKQKQSLATKRAIERGYDSKNADM 28
 Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368 1-----MSDSKVNKKLSKASLRAIERGYDEKCP 30
 A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382 1-----MKKEKEVVEKKSFEISNEQLDNLCTINRDSLSASKRALKWPINIGNE 49
 AOM245/AOM245_GRAFK/1-407 1-MIKKTKALIVIGLMATLYSCNNTSEKISAEKTEDKPEISQVDIDRLCTINPDSLSAASVRLDWPDVGN 72
 Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408 1--MKIMNVKYSTIGAMTALLFASQCTPCPEEQEENFEITQDKIDYLCITNPDKLSAASKRALQWPDIGN 71
 B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402 1----MRKIIFAAGMMSLLAACNTGNTQTIAVDDTQNYDERKADSLGIPKGNKLSAAMKRAMKWENHDN 68
 Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430 1MKYWLIGALSLSLTACNNTTMESETRAASTSVSAPNKAYSQADYAYLAISQPDMSAASKRALARNYHKN 73

C6j313/C6j313_9BACL/1-367 24CEKYEF--VEGLGYEEIHRDDPSVIXVGDLYYMYTKSVGEAVGNTGDPDSVFPWQSDVYAT 94
 C6j3P3/C6j3P3_9BACL/1-364 22CEKISF--VQGLGYEEVHRDDPSVIXVNDLYYMYTKTEGAACTGDPDAVFPWQSDVYAT 92
 Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370 24CDRTFF--VQGLGPVYHRDDPSVLTVDGRHMYIRRTGCTDGGTGDPMALVFPWQSEI 94
 C6jDD4/C6jDD4_9FIRM/1-353 23CDKESG--IEGIGYKIIHRDDPSVIXVGDGFMYSRVPHKCHTGDEEAVFPWQSDVYAT 93
 Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361 29IEETSF--LKGDGFEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSTNPDVFPWQSDVYAT 100
 Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368 31FEDITH--LKGDLAYEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSDNPDVFPWQSDVYAT 102
 A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382 50IESALKPLKGDLAYEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSDNPDVFPWQSDVYAT 122
 AOM245/AOM245_GRAFK/1-407 73IESALQPLKGDLAYEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSDNPDVFPWQSDVYAT 145
 Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408 72GELQVYD--LKGDLAYEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSDNPDVFPWQSDVYAT 143
 B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402 69FHYKME--LKGDLAYEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSDNPDVFPWQSDVYAT 140
 Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430 74FGEFRHET--LKGDLAYEEVIRDDPSVIXVDDVHCWYTKGTEGCTGSDNPDVFPWQSDVYAT 146

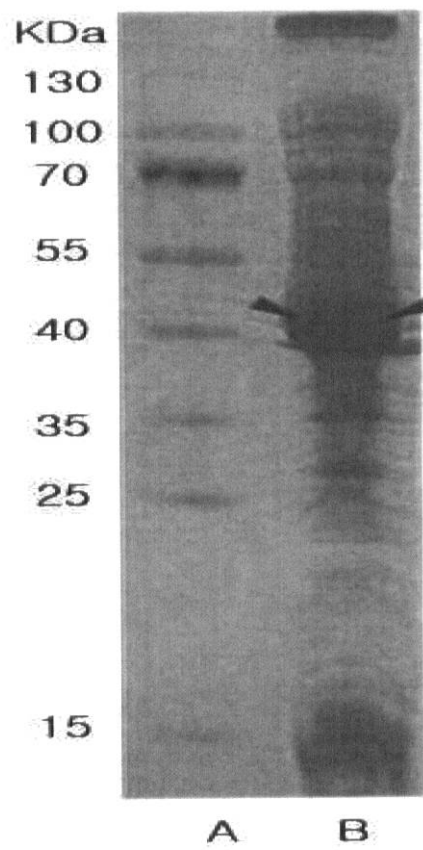
C6j313/C6j313_9BACL/1-367 95TITRIMVGRPKSYDDRSVTPPIIHNDKFFLVYVIEGQLLKYENJAMVVESEFPRLDA 167
 C6j3P3/C6j3P3_9BACL/1-364 93VNTTRIRIMVGRPKSYDDRSVTPPIIHNDKFFLVYVIEGQLLKYENJAMVVESEFPRLDA 165
 Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370 95ATVYQIRALGCEPASYDDRSVTPPIIHNDKFFLVYVIEGQLLKYENJAMVVESEFPRLDA 167
 C6jDD4/C6jDD4_9FIRM/1-353 94YREKIPAVYGERAKDDRSVTPPIIEYEKYYLVYVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 166
 Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361 101ETWHQPAITITTPAFIDDAATPPIIVANNKYLVYVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 173
 Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368 103ITWKIPPIQIGAAAYDDRSVTPPIIVIRHNITYLVYVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 175
 A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382 123WTKIEPPIVIGVNEFDDRSVTPPIIMKYENMYTCTVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 195
 AOM245/AOM245_GRAFK/1-407 146WTKIEPPIVIGVNEFDDRSVTPPIIMKYENMYTCTVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 218
 Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408 144WTKIEPPIVIGVNEFDDRSVTPPIIMKYENMYTCTVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 216
 B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402 141LTKIPPIVIGVNEFDDRSVTPPIIMKYENMYTCTVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 213
 Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430 147YHQQKIRLGTIDVYQDDRSVTPPIIAHGMFLLVYVQVQHYVNSFESIAIIVADSHEFTSK 219

C6j313/C6j313_9BACL/1-367 168RAMNTEFDDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 240
 C6j3P3/C6j3P3_9BACL/1-364 166RAMNTEFDDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 238
 Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370 168RQADIEFAEEDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 240
 C6jDD4/C6jDD4_9FIRM/1-353 167RTKDIINEEEDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 239
 Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361 174SMDENRDEEDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 246
 Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368 176SENDEVTDENRLLKESQDSDSHKVHDCIMFFNNRYLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 248
 A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382 196SADNINKLDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 268
 AOM245/AOM245_GRAFK/1-407 219SADNINKLDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 291
 Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408 217SADNINKLDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 289
 B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402 214ESDTEFAEEDDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 286
 Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430 220TASDTEFAETQDNLTLLKHGDFSLVHVDVLFYNNQWLYYKCEQKHEMNFQRTTKWVAISH 292

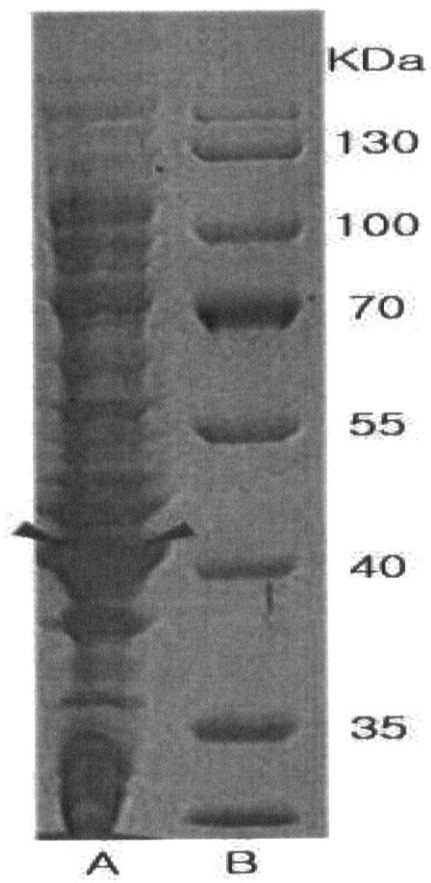
C6j313/C6j313_9BACL/1-367 241PYVSENPVTNSCHITLLHTRGEMALLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 311
 C6j3P3/C6j3P3_9BACL/1-364 239PYVSENPVTNSCHITLLHTRGEMALLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 309
 Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370 241PYHRCAPVVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 311
 C6jDD4/C6jDD4_9FIRM/1-353 240PYHRCAPVVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 310
 Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361 247PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 317
 Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368 249PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 319
 A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382 269PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 339
 AOM245/AOM245_GRAFK/1-407 292PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 364
 Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408 290PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 359
 B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402 287PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 357
 Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430 293PYHSENPVTNSCHITVYRGDTIAMLTDGPERNTIQYPOGINFEIYAVKKNPFAAPF 363

C6j313/C6j313_9BACL/1-367 312DRSLEIRWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 367
 C6j3P3/C6j3P3_9BACL/1-364 310DRSLEIRWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 364
 Q9RKF6/Q9RKF6_STRCO/1-370 312AVALLDVRWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 370
 C6jDD4/C6jDD4_9FIRM/1-353 311DSNLLKQMEWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 353
 Q15UF2/Q15UF2_PSEA6/1-361 318EDTSPPGLHWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 361
 Q21HB2/Q21HB2_SACD2/1-368 320SDDISLEWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 368
 A4AR39/A4AR39_9FLAO/1-382 340GKNTEVLRWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 382
 AOM245/AOM245_GRAFK/1-407 365SEEGAILGWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 407
 Q93PB9/Q93PB9_9SPH/1-408 360NEDFGIFGWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 408
 B5CY74/B5CY74_9BACE/1-402 358EKEITEIRWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 402
 Q15XP8/Q15XP8_PSEA6/1-430 364NAYTALLWGLCNVHTKWNHILKFRTVEDYKHYYNKNINPEVLWLGKKAKQKQD 430

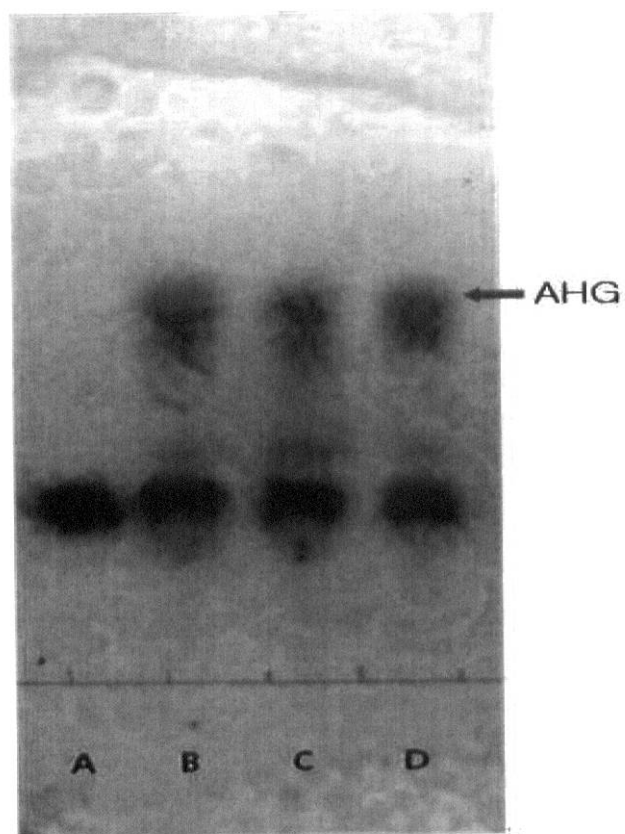
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0005468680000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
- (74)代理人 100114409
弁理士 古橋 伸茂
- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 チェ, インーギョル
大韓民国, 156-827 ソウル, ドンジャクグ, サダン 1-ドン, 419-92
- (72)発明者 キム, キョンーヒョン
大韓民国, 463-400 キョンギード, ソンナムーシ, ブンダング, サムピョンードン, ボッドルマウル, #907-1704
- (72)発明者 リ, セーヨン
大韓民国, 437-734 キョンギード, ウィワンーシ, オジョンドン, エルギー アパートメント, #103-1502

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 Appl.Environ.Microbiol.,2006 May,72(5),p.3396-405
Weiner,R.M.et al., "Accession:NC_007912 REGION: 3371827..3372933[gi:90019649],Definition:Saccharophagus degradans 2-40, complete genome.", NCBI Entrez Nucleotide[online];21-JAN-2009 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/90019649?sat=13&satkey=744270>
- Copeland,A.et al., "Accession:NC_008228 REGION: 2388901..2389986[gi:109896332],Definition:Pseudoalteromonas atlantica T6c, complete genome.", NCBI Entrez Nucleotide[online];25-JUL-2008 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/109896332?sat=13&satkey=849759>
- Bentley,S.D.et al., "Accession:NC_003888 REGION: 3844670..3845782[gi:32141095],Definition:Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome.", NCBI Entrez Nucleotide[online];26-SEP-2008 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/32141095?sat=13&satkey=727208>
- Bauer,M.et al., "Accession:NC_008571 REGION: 1790819..1792042[gi:120434372],Definition:Gramella forsetii KT0803, complete genome.", NCBI Entrez Nucleotide[online];29-JUL-2008 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/120434372?sat=13&satkey=851002>
- Copeland,A.et al., "Accession:NC_008228 REGION: 943674..944966[gi:109896332],Definition:Pseudoalteromonas atlantica T6c, complete genome.", NCBI Entrez Nucleotide[online];25-JUL-2008 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/109896332?sat=13&satkey=849759>
- Ward,D.et al., "Accession:GG695980 REGION: 69109..70212[gi:251844538],Definition:Paenibacillus sp. oral taxon 786 str. D14 genomic scaffold supercont1.11, whole genome shotgun sequence.", NCBI Entrez Nucleotide[online];08-JUL-2009 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/251844538>
- Ward,D.et al., "Accession:GG696048 REGION: 279122..280183[gi:251848973],Definition:Ruminococcus sp. 5_1_39B_FAA genomic scaffold supercont1.4, whole genome shotgun sequence.", NCBI Entrez Nucleotide[online];08-JUL-2009 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GG696048>
- Ward,D.et al., "Accession:GG695982 REGION: 16777..17871[gi:251844322],Definition:Paeni

bacillus sp. oral taxon 786 str. D14 genomic scaffold supercont1.13, whole genome shotgun sequence.", NCBI Entrez Nucleotide[online];08-JUL-2009 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GG695982>>

"Accession:EAR01928[gi:88709695],Definition:hypothetical protein FB2170_15408 [Flavobacteriales bacterium HTCC2170].", NCBI Entrez Protein[online];23-FEB-2006 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/88709695?sat=19&satkey=18267058>>

Sudarsanam,P.et al., "Accession:ABQC02000019 REGION: 77306..78514[gi:197299667],Definition:Bacteroides plebeius DSM 17135 B_plebeius-2.0.1_Cont2578, whole genome shotgun sequence.", NCBI Entrez Nucleotide[online];05-SEP-2008 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/197299667?sat=16&satkey=10341775>>

Zhong,Z.et al., "Accession:NC_002806 REGION: 18732..19958[gi:14518304],Definition:Microscilla sp. PRE1 plasmid pSD15, complete sequence.", NCBI Entrez Nucleotide[online];18-JUL-2008 uploaded,NCBI,[retrieved on 23 May 2013], Retrieved from the Internet:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/14518304?sat=17&satkey=1345699>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

CAPLUS/BIOSIS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

Thomson Innovation