(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4655374号
(P4655374)

(45)発行日　平成23年3月23日(2011.3.23)　(24)登録日　平成23年1月7日(2011.1.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 13/06	(2006.01)	C12P	13/06	D
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 9/16	(2006.01)	C12N	9/16	B
C12R 1/19	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 3　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-18359(P2001-18359)
(22)出願日　平成13年1月26日(2001.1.26)
(65)公開番号　特開2001-275689(P2001-275689A)
(43)公開日　平成13年10月9日(2001.10.9)
審査請求日　平成19年5月28日(2007.5.28)
(31)優先権主張番号　特願2000-23341(P2000-23341)
(32)優先日　平成12年1月27日(2000.1.27)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　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　100100549
弁理士　川口　嘉之
(74)代理人　100090516
弁理士　松倉　秀実
(74)代理人　100126505
弁理士　佐貫　伸一
(74)代理人　100131392
弁理士　丹羽　武司
(72)発明者　菅　美喜子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コリネ型細菌のホスホセリンホスファターゼ遺伝子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記（Ａ）又は（Ｂ）に示すタンパク質をコードするＤＮＡによって形質転換されたことによりホスホセリンホスファターゼの活性が上昇した細菌を培地に培養し、該培地中にＬ－セリンを生成蓄積させ、該培地からＬ－セリンを採取することを特徴とするＬ－セリンの製造法。
（Ａ）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
（Ｂ）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質。
【請求項２】
前記ＤＮＡが、下記（ａ）又は（ｂ）に示すＤＮＡである、請求項１に記載のＬ－セリンの製造法。
（ａ）配列表の配列番号１に記載の塩基配列のうち、塩基番号２１０～１５４７からなる塩基配列を含むＤＮＡ。
（ｂ）配列表の配列番号１に記載の塩基配列のうち、塩基番号２１０～１５４７からなる塩基配列を有す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、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。
【請求項３】
前記ストリンジェントな条件が、０．１×ＳＳＣ及び０．１％ＳＤＳに相当する塩濃度

で６０℃で洗浄が行われる条件である請求項２記載のＬ－セリンの製造法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、コリネ型細菌のホスホセリンホスファターゼをコードするＤＮＡに関する。同ＤＮＡは、コリネ型細菌のＬ－セリン生産菌の育種等、微生物工業に利用することができる。
【０００２】
【従来の技術】
従来の発酵法によるＬ－セリンの製造法としては、グリシン及び糖からＬ－セリンに変換できる菌株を使用して、３０ｇ／Ｌのグリシンを有する培地で最高１４ｇ／ＬのＬ－セリンを製造したという報告がある。この方法におけるグリシンからＬ－セリンへの変換収率は４６％に相当する（Ｋｕｂｏｔａ Ｋ. Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４９，７～１２，１９８５）。また、グリシンとメタノールからＬ－セリンに変換できる菌株を使用して、１００ｇ／Ｌのグリシンから５３ｇ／ＬのＬ－セリンが生産できる（Ｔ．Ｙｏｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｆｅｒｍｅｎｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｖｏｌ．７９，Ｎｏ．２，１８１－１８３．１９９５）。また、ノカルディア属細菌を使用する方法では、セリンハイドロキサメイトやアザセリン等の耐性菌を育種することによりＬ－セリン生産能が改善されることが知られている（特公昭５７－１２３５号）。しかし、これらの方法はＬ－セリンの前駆体であるグリシンを使用しなければならず、操作が煩雑でコスト的にも不利であった。
【０００３】
Ｌ－セリンを糖より直接発酵でき、かつ培地にＬ－セリンの前駆体を添加する必要のない菌株として、Ｄ－セリン、α－メチル－セリン、ｏ－メチルセリン、イソセリン、セリンハイドロキサメイト、３－クロロアラニンに耐性なコリネバクテリウム グルタミカムが知られているが、そのＬ－セリン蓄積は０．８ｇ／Ｌと極めて低いものであり（農芸化学会誌、第４８巻、第３号、ｐ２０１－２０８，１９７４）、工業的にＬ－セリンの直接発酵を行うには更なる菌株改良が望まれた。
【０００４】
一方、コリネ型細菌において、菌体内で自律増殖可能でかつ、薬剤耐性マーカー遺伝子を有するベクタープラスミド（米国特許第４５１４５０２号参照）、遺伝子の菌体への導入方法（特開平２－２０７７９１号等）が開示されており、これらの技術を用いたＬ－アミノ酸生産菌育成が行われている。Ｌ－セリンについては、Ｌ－セリン生産能を有するコリネ型細菌において、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除されたＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（ｓｅｒＡ遺伝子）（欧州特許出願公開第９４３，６８７号）の導入、又はホスホセリンホスファターゼをコードする遺伝子（ｓｅｒＢ）もしくはホスホセリントランスアミナーゼをコードする遺伝子（ｓｅｒＣ）（欧州特許出願公開第９３１，８３３号）の増幅が、Ｌ－セリン生産性を向上させることを見出している。しかし、ｓｅｒＢ遺伝子は、エシェリヒア・コリ（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｘ０３０４６，Ｍ３０７８４）、酵母（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｕ３６４７３）、ヘリコバクター・ピロリ（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ＡＦ００６０３９）等では知られているが、コリネ型細菌では知られていない。
【０００５】
【発明が解決しようとする課題】
本発明は、上記観点からなされたものであり、コリネ型細菌のホスホセリンホスファターゼをコードする遺伝子を提供することを課題とする。
【０００６】
【課題を解決するための手段】
本発明者らは、ブレビバクテリウム・フラバムの染色体ＤＮＡライブラリーから、エシェ

リヒア・コリのｓｅｒＢ欠損を相補するＤＮＡ断片を取得した。そして、同ＤＮＡ断片から既知のｓｅｒＢ遺伝子と相同性を有するオープン・リーディング・フレームをサブクローニングし、前記エシェリヒア・コリのｓｅｒＢ欠損株に導入したが、ｓｅｒＢ欠損は相補されなかった。ところが、前記ＯＲＦをｌａｃプロモーターを用いて強制発現させたところ、ｓｅｒＢ欠損が相補されることを見出し、前記ＯＲＦがブレビバクテリウム・フラバムのｓｅｒＢ相同遺伝子であることが確認され、さらに、オペロンを形成しているために同遺伝子固有のプロモーターは存在しないことが示唆された。

【０００７】

本発明は、上記のようにしてなされたものであり、その要旨は以下のとおりである。

（１）下記（Ａ）又は（Ｂ）に示すタンパク質。

（Ａ）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（Ｂ）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質。

（２）下記（Ａ）又は（Ｂ）に示すタンパク質をコードするＤＮＡ。

（Ａ）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（Ｂ）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質。

（３）配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

（４）前記ストリンジェントな条件が、１×ＳＳＣ及び０．１％ＳＤＳに相当する塩濃度で６０℃で洗浄が行われる条件である（３）のＤＮＡ。

（５）下記（ａ）又は（ｂ）に示すＤＮＡである（２）のＤＮＡ。

（ａ）配列表の配列番号１に記載の塩基配列のうち、塩基番号２１０～１５４７からなる塩基配列を含むＤＮＡ。

（ｂ）配列表の配列番号１３に記載の塩基配列のうち、塩基番号２１０～１５４７からなる塩基配列又はその一部を有す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、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

（６）前記ストリンジェントな条件が、１×ＳＳＣ及び０．１％ＳＤＳに相当する塩濃度で６０℃で洗浄が行われる条件である（５）のＤＮＡ。

（７）（１）～（６）のいずれかのＤＮＡを含むベクター。

（８）（１）～（６）のいずれかのＤＮＡによってコードされるホスホセリンホスファターゼの活性が上昇した細菌。

（９）（８）の細菌を培地に培養し、該培地中にＬ－セリンを生成蓄積させ、該培地からＬ－セリンを採取することを特徴とするＬ－セリンの製造法。

【０００８】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のＤＮＡは、ブレビバクテリウム・フラバム、例えばブレビバクテリウム・フラバムＡＴＣＣ１４０６７株の染色体ＤＮＡから、該染色体ＤＮＡを鋳型とし、配列表の配列番号３に示す塩基配列を有するプライマー及び配列表の配列番号４に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCR（ポリメラーゼ・チェイン・リアクション）により取得することができる。これらのプライマーは、それぞれ5'端近くに、制限酵素ＥｃｏＲ又はＳａｌＩの認識配列が組み込まれているので、増幅産物をこれらの制限酵素で消化すれば、ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ切断末端を有するベクターに挿入することができる。

【０００９】

上記プライマーの塩基配列は、エシェリヒア・コリのｓｅｒＢ欠損株ＭＥ８３２０（thi, serB, zji-1::Tn10）（国立遺伝学研究所より入手できる）のｓｅｒＢ欠損を相補するＤ

ＮＡ断片の塩基配列に基づいて設計されたものであり、これらのプライマーを用いれば、ｓｅｒＢ相同遺伝子のコード領域及び隣接領域（約２００塩基の５’非翻訳領域及び約３００塩基の３’非翻訳領域）を含むＤＮＡ断片が得られる。

【００１０】

上記のようにして得られる本発明のＤＮＡの塩基配列及びこの配列がコードし得るアミノ酸配列の一例を配列番号１に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号２に示す。

【００１１】

前記ｓｅｒＢ相同遺伝子は、ＭＥ８３２０株のｓｅｒＢ欠損を相補するＤＮＡ断片中に存在し、かつ、エシェリヒア・コリ及び酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）のｓｅｒＢ遺伝子と相同性を有するオープン・リーディング・フレーム（ＯＲＦ）として見出されたものである。このＯＲＦ及びプロモーターを含むのに十分と考えられる長さの隣接領域を含むＤＮＡ断片を、上記配列番号３及び４に示すプライマーを用いたＰＣＲによりブレビバクテリウム・フラバムＡＴＣＣ１４０６７株から取得し、ＭＥ８３２０株に導入したが、ｓｅｒＢ欠損は相補されなかった。したがって、当初は前記ＯＲＦはｓｅｒＢ相同遺伝子ではないとも考えられた。しかし、このＯＲＦをｌａｃＺプロモーターに連結して強制発現させたところ、ｓｅｒＢ欠損が相補され、前記ＯＲＦがｓｅｒＢ相同遺伝子であることが確認された。

【００１２】

また、前記のｓｅｒＢ欠損を相補するＤＮＡ断片中には、ｓｅｒＢ相同遺伝子のＯＲＦのすぐ上流に別のＯＲＦが見出された。これらのことから、これらのＯＲＦはオペロンを形成しており、ｓｅｒＢ相同遺伝子の直ぐ上流にはプロモーター領域等が存在しないことが示唆される。

【００１３】

当初、ブレビバクテリウム・フラバムからのｓｅｒＢ相同遺伝子の取得は、既知のｓｅｒＢ遺伝子の配列を利用して行うことを試みた。すなわち、既知の他の生物種のｓｅｒＢ遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列の比較を行い、アミノ酸配列が各種生物間で高度に保存されている領域を検索し、同領域の塩基配列に基づいてＰＣＲ用のプライマーを作製し、同プライマーを用いてｓｅｒＢ相同遺伝子を増幅しようと考えた。しかし、そのような保存領域は非常に少なく、ＰＣＲにより目的とする遺伝子を取得することは困難であると判断した。そのため、ｓｅｒＢ欠損株を用いた相補性試験を行うこととした。

【００１４】

本発明のＤＮＡは、上記のようにｓｅｒＢ欠損株を用いた相補性試験によるクローニング及びＰＣＲによるサブクローニングにより取得されたものであるが、本発明のＤＮＡ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ローブとするハイブリダイゼーションによって、ブレビバクテリウム・フラバムの染色体ＤＮＡリブラリーから取得することもできる。

【００１５】

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の切断及び連結、形質転換等の方法は、Sambrook,J.,Fritsch,E.F.,Maniatis,T.,Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1.21(1989)に記載されている。

【００１６】

本発明のＤＮＡは、コードされるホスホセリンホスファターゼ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、付加、又は逆位を含むホスホセリンホスファターゼをコードするものであってもよい。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、具体的には２から２００個、好ましくは、２から５０個、より好ましくは２から２０個である。

また、本発明のＤＮＡは、コードされるホスホセリンホスファターゼの活性が損なわれない限り、配列番号２に示すアミノ酸配列と５０％以上、好ましくは６０％以上、より好ま

しくは７０％以上、さらに好ましくは８０％以上、特に好ましくは９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするものであってもよい。

【００１７】

上記のようなホスホセリンホスファターゼ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、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。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、ホスホセリンホスファターゼをコードするＤＮＡをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びホスホセリンホスファターゼをコードするＤＮＡを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、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）もしくは亜硝酸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。

【００１８】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、ホスホセリンホスファターゼを保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異（mutant又はvariant）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、発現産物のホスホセリンホスファターゼ活性を調べることにより、ホスホセリンホスファターゼ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、変異を有するホスホセリンホスファターゼをコードするＤＮＡまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号１に記載の塩基配列のうち塩基番号２１０～１５４７からなる塩基配列を有す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、ホスホセリンホスファターゼ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、ホスホセリンホスファターゼ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。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、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件、例えば６０℃、０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳに相当する塩濃度で洗浄が行われる条件が挙げられる。配列番号１に示す塩基配列と９０％以上の相同性を有し、ホスホセリンホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡは、本発明のＤＮＡである。

【００２０】

プローブとして、配列番号１の塩基配列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、配列番号１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、配列番号１の塩基配列を含むＤＮＡ断片を鋳型とするＰＣＲによって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×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳが挙げられる。

【００２１】

上記のような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎホスホセリンホスファターゼ活性を、例えばＬｅｗｉｓ，Ｉ．　Ｐｉｚｅｒ，　Ｊ．Ｂ．Ｃ．　２３８（１２），３９３４－３９４４（１９６３）の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

【００２２】

本発明のＤＮＡは、適当なベクター、例えばエシェリヒア・コリ及び／又はコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターＤＮＡに接続して組み換えＤＮＡを調製し、これをエシェリヒア・コリ細胞に導入しておくと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自律複製可能なものが好ましく、例えば　ｐＵＣ１９、ｐＵＣ１８、ｐ

ＢＲ３２２、ｐＨＳＧ２９９、ｐＨＳＧ３９９、ｐＨＳＧ３９８、ＲＳＦ１０１０等が挙げられる。

【００２３】

組み換えＤＮＡの調製は、トランスポゾン（ＷＯ０２／０２６２７国際公開パンフレット、ＷＯ９３／１８１５１国際公開パンフレット、欧州特許公開０４４５３８５号、特開平６－４６８６７号、Ｖｅｒｔｅｓ，Ａ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１１，７３９－７４６（１９９４）、Ｂｏｎａｍｙ，Ｃ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１４，５７１－５８１（１９９４）、Ｖｅｒｔｅｓ，Ａ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，２４５，３９７－４０５（１９９４）、Ｊａｇａｒ，Ｗ．ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ，１２６，１－６（１９９５）、特開平７－１０７９７６号、特開平７－３２７６８０号等）やファージベクター、染色体組み換え（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｐｒｅｓｓ（１９７２）；Ｍａｔｓｕｙａｍａ，Ｓ．ａｎｄ Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ，Ｓ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６２，１１９６（１９８５））等を利用することによっても行うことができる。

【００２４】

また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつＤＮＡ断片を挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【００２５】

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。なお、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をかっこ内に示した。

ｐＨＣ４　エシェリヒア・コリＡＪ１２６１７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－３５３２）

ｐＡＪ６５５　エシェリヒア・コリＡＪ１１８８２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１３６）、コリネバクテリウム　グルタミカムＳＲ８２０１（ＡＴＣＣ３９１３５）

ｐＡＪ１８４４　エシェリヒア・コリＡＪ１１８８３（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１３７）、コリネバクテリウム・グルタミカムＳＲ８２０２（ＡＴＣＣ３９１３６）

ｐＡＪ６１１　エシェリヒア・コリＡＪ１１８８４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１３８）

ｐＡＪ３１４８　コリネバクテリウム・グルタミカムＳＲ８２０３（ＡＴＣＣ３９１３７）

ｐＡＪ４４０　バチルス　ズブチリスＡＪ１１９０１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１４０）

【００２６】

これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びＳＤＳを用いて溶菌し、３００００×ｇで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド－エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【００２７】

エシェリヒア・コリにプラスミドを導入して形質転換するには　Ｄ．Ａ．Ｍｏｒｒｉｓｏｎの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，６８，３２６，１９７９）あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してＤＮＡの透過性を増す方法（Ｍａｎｄｅｌ，Ｍ．ａｎｄ Ｈｉｇａ，Ａ．，Ｊ．Ｍｏｌ．，Ｂｉｏｌ．，５３，１５９（１９７０））等により行うことができる。

【００２８】

コリネ型細菌にプラスミドを導入して形質転換するには、電気パルス法（杉本ら、特開平２－２０７７９１号　公報）によって行うことができる。

本発明のＤＮＡを、適当な宿主－ベクター系を用いて発現させることにより、ホスホセリンホスファターゼを製造することができる。

【００２９】

本発明のＤＮＡを発現させるための宿主としては、ブレビバクテリウム・フラバム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリスをはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）をはじめとする種々の真核細胞、動物細胞、植物細胞が挙げられるが、これらの中では原核細胞、特にコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ及びバチルス・ズブチリスが好ましい。

【００３０】

本発明のＤＮＡはプロモーターを有していないため、発現させるには本発明のＤＮＡの上流に、宿主細胞内で働くｌａｃ、ｔｒｐ、P_L等のプロモーターを連結する必要がある。ベクターとして、プロモーターを含むベクターを用いると、本発明のＤＮＡと、ベクター及びプロモーターとの連結を一度に行うことができる。このようなベクターとしては、ｌａｃＺプロモーターを含むｐＭＷ２１９（日本ジーン社から購入できる）等が挙げられる。

【００３１】

尚、本発明のＤＮＡを高発現させると、それを含むプラスミドが不安定化することがあるが、その場合は低コピーベクターを用いるとよい。

形質転換は、例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してＤＮＡの透過性を増す方法（ Mandel,M.and Higa,A.,J.Mol.,Biol.,53,159(1970) ）や、バチルス　ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してＤＮＡを導入する方法（ Duncan,C.H.,Wilson,G.A.and Young,F.E.,Gene,1,153(1977) ）を用いることができる。あるいは、バチルス　ズブチリス、放線菌類および酵母について知られているような、ＤＮＡ受容菌の細胞を、組換えＤＮＡを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えＤＮＡをＤＮＡ受容菌に導入する方法（ Chang,S.and Choen,S.N.,Molec.Gen.,Genet.,168.111(1979);Bibb,M.J.,Ward,J.M.and Hopwood,O.A.,Nature,274,398(1978);Hinnen,A.,Hicks,J.B.and Fink,G.R.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,75 1929(1978)）も応用できる。また、コリネ型細菌には、電気パルス法（特開平２－２０７７９１号公報）も有効である。これらの方法は、宿主として用いる細胞に応じて適宜選択すればよい。

【００３２】

上記のようにして本発明のＤＮＡを発現可能な形態で導入された細胞を培地で培養し、ホスホセリンホスファターゼを培養物中に生成蓄積させ、該培養物よりホスホセリンホスファターゼを採取することにより、ホスホセリンホスファターゼを製造することができる。培養に用いる培地は、用いる宿主に応じて適宜選択すればよい。

【００３３】

上記のようにして製造されるホスホセリンホスファターゼは、必要に応じて、菌体抽出液又は培地からイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、溶媒沈殿等、通常の酵素の精製法を用いて精製することができる。

【００３４】

また、本発明のＤＮＡは、コリネ型細菌等のＬ－セリン生産菌の育種に利用することができる。すなわち、本発明のＤＮＡを発現可能な形態で微生物に導入することにより、ホスホセリンホスファターゼ活性が付与又は増強され、その結果、Ｌ－セリン生産能が付与又は増強される。また、ホスホセリンホスファターゼ活性の増強は、ｓｅｒＢ相同遺伝子のコピー数の増大の他、ブレビバクテリウム・フラバムの染色体上のｓｅｒＢ相同遺伝子の発現を増強するように発現調節配列を改変することによっても、行うことができる。染色体ＤＮＡ上の発現調節配列の改変は、例えば、ｓｅｒＢ相同遺伝子を含むオペロンのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換する（特開平１－２１５２８０号公報参照）ことによって行う。

【００３５】

Ｌ－セリン生産菌の育種に用いることができるコリネ型細菌としては、例えば次のような野生株が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム　　ＡＴＣＣ１３８７０

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム　ＡＴＣＣ１５８０６
コリネバクテリウム・カルナエ　ＡＴＣＣ１５９９１
コリネバクテリウム・グルタミカム　ＡＴＣＣ１３０３２
（ブレビバクテリウム・ディバリカタム）　ＡＴＣＣ１４０２０
（ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）ＡＴＣＣ１３８６９
（コリネバクテリウム・リリウム）　ＡＴＣＣ１５９９０
ブレビバクテリウム・フラバム　ＡＴＣＣ１４０６７
コリネバクテリウム・メラセコーラ　ＡＴＣＣ１７９６５
ブレビバクテリウム・サッカロリティクム　ＡＴＣＣ１４０６６
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム　ＡＴＣＣ１４０６８
ブレビバクテリウム・ロゼウム　ＡＴＣＣ１３８２５
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス　ＡＴＣＣ１９２４０
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム　ＡＴＣＣ１５３５４
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス　ＡＪ１２３４０（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１５３９）

【００３６】
また、アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有する変異株（欧州特許出願公開第９４３，６８７号）も、Ｌ－セリン生産菌育種の出発株として利用することができる。

【００３７】
また、本発明のＤＮＡは、他のＬ－セリン生合成に関与する酵素遺伝子と併せて、Ｌ－セリン生産菌に導入してもよい。そのような遺伝子としては、Ｄ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（ｓｅｒＡ）（欧州特許出願公開第９４３，６８７号）、ホスホセリンホスファターゼをコードする遺伝子（ｓｅｒＢ）及びホスホセリントランスアミナーゼをコードする遺伝子（ｓｅｒＣ）（欧州特許出願公開第９３１，８３３号）が挙げられる。ｓｅｒＡとしては、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除されたＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異型遺伝子が好ましい（欧州特許出願公開第９４３，６８７号参照）。

【００３８】
本発明のＤＮＡが発現可能な形態で導入され、かつ、Ｌ－セリン生産能を有する微生物を培地に培養し、培地中にＬ－セリンを蓄積させ、培地中から当該Ｌ－セリンを回収することにより、Ｌ－セリンを糖から直接に製造することができる。また、本発明のＤＮＡが導入された微生物は、ホスホセリンホスファターゼが関与する限り、グリシン等のＬ－セリンの前駆体を用いてＬ－セリンを製造する方法にも適用することができる。

【００３９】
本発明のＤＮＡが導入された微生物を用いてＬ－セリンを生産するのに使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、及び必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を適宜含有する通常の液体培地が使用される。炭素源としては、グルコース、シュークロース、フラクトース、ガラクトース等の糖類、これら糖類を含有する澱粉糖化液、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜、ハイテストモラセス、さらには酢酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類、グリセリン等も使用される。窒素源としてはアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、コーンスティープリカー、酵母または酵母エキス、ペプトン等のペプチド類等が使用される。無機イオンとしてはリン酸イオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン等が適宜添加される。また本発明の微生物にアミノ酸等の要求性物質がある場合には、その要求物質を添加しなければならない。

【００４０】
微生物の培養は通常ｐＨ５～８、温度２５～４０℃の範囲で好気的条件下で行われる。培養液のｐＨは、無機あるいは有機の酸、アルカリ性物質、さらには尿素、炭酸カルシウム

、アンモニアガスなどによって上記範囲内のあらかじめ定められた値に調節する。
【００４１】
発酵液からＬ－セリンを採取するには、例えば菌体を分離除去し、イオン交換樹脂処理あるいは濃縮冷却晶析法、膜分離法、その他公知の方法を組み合わせることにより行われる。不純物を除くためには常法の活性炭吸着法及び再結晶法を用いて精製してもよい。
【００４２】
【実施例】
以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。
【００４３】
＜１＞高コピーベクターを用いたブレビバクテリウム・フラバム染色体ＤＮＡライブラリーの作製
ブレビバクテリウム・フラバムＡＴＣＣ１４０６７より染色体を調製し、制限酵素Ｓａｕ３ＡＩを用いて、断片が約４～６ｋｂとなるように部分分解した。得られた断片と、コリネ型細菌とエシェリヒア・コリのシャトルベクターｐＳＡＣ４をＢａｍＨＩで切断したものを連結した。
【００４４】
ｐＳＡＣ４は、以下のようにして作製した。エシェリヒア・コリ用ベクターｐＨＳＧ３９９（宝酒造(株)）をコリネ型細菌で自律複製可能にするために、既に取得されているコリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドｐＨＭ１５１９（Miwa, k. et al., Agric. Biol. Chem., 48 (1984) 2901-2903）由来の複製起点（特開平5-7491号公報）を導入した。具体的には、ｐＨＭ１５１９を制限酵素ＢａｍＨＩおよびＫｐｎＩで消化し、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片を宝酒造(株)製Blunting kitを用いて平滑末端化した後、 ＳａｌＩリンカー（宝酒造(株)製）を用いて、ｐＨＳＧ３９９のＳａｌＩサイトに挿入し、ｐＳＡＣ４を得た。
【００４５】
上記連結反応物をＴＥバッファーに溶解し、エレクトロポレーション法によりエシェリヒア・コリＤＨ５αを形質転換した。形質転換液にＳＯＣ培地（組成：バクトトリプトン20g/L、イーストエキストラクト5g/L、NaCl 0.5g/L、グルコース10g/L）を加えて３７℃で１時間保温し、等量の２×ＬＢ培地（クロラムフェニコール４０ｍｇ／Ｌを含む。ＬＢ培地の組成：トリプトン 1%、イーストエキストラクト 0.5%、NaCl 0.1%、グルコース 0.1%、pH7）を加えて、３７℃で２時間培養した。培養液に４０％グリセロールを含む４×ＬＢ培地を等量加えた後、－８０℃で保存した。
【００４６】
上記培養液をＬＢ培地に接種し、得られた菌体よりプラスミドを回収した。プラスミドＤＮＡをエタノール沈殿し、エシェリヒア・コリのｓｅｒＢ欠損株ＭＥ８３２０（thi, serB, zji-1::Tn10）（国立遺伝学研究所より入手）に、エレクトロポレーション法により導入した。ＭＥ８３２０株は、ビタミンB_1 １４０ｍｇ／Ｌを添加したＭ９培地では生育できず、Ｌ－セリン４０ｍｇ／Ｌを含む同培地で生育可能であることを確認した。
【００４７】
形質転換後、菌体を洗浄し、ビタミンB_1およびクロラムフェニコール４０ｍｇ／Ｌを含むＭ９寒天培地にまいて、３７℃で３～４日間培養し、コロニーを形成させた。各コロニーからプラスミドを調製し、電気泳動にて大きさを調べたところ、顕著な欠失が認められた。ｓｅｒＢ遺伝子を菌体内で高発現させることがプラスミドの不安定化の原因と考え、ライブラリーを低コピーベクターを用いて作製し直すこととした。
【００４８】
＜２＞低コピーベクターを用いたブレビバクテリウム・フラバム染色体ＤＮＡライブラリーの作製及びＳｅｒＢ遺伝子の単離
ブレビバクテリウム・フラバムＡＴＣＣ１４０６７より染色体を調製し、Ｓａｕ３ＡＩで消化した。この反応は、切断断片の分布の中心が３ｋｂｐ付近以上になるように調整した。得られた消化物約２００μｇを、１０％～４０％のショ糖密度勾配遠心により分離し、

AUTOMATIC LIQUID CHARG-ER（ADVANTEC社）及びMICRO TUBE PUMP（EYELA社）を用いて１ｍｌずつ分画した。ショ糖密度勾配遠心は、ベックマン社のＳＷ２８ロータを用い、１０℃、２６０，０００ｒｐｍで２６時間行った。分布の中心が３～４ｋｂｐ付近以上にあるＤＮＡ断片を有する画分をエタノール沈殿した後、Microcon-50（ミリポア社）によりＤＮＡ断片を精製した。

【００４９】

上記のようにして得られた染色体ＤＮＡ断片を、低コピー型ベクターであるｐＭＷ２１９（日本ジーン社、ＢａｍＨＩ切断、脱リン酸化処理済）と連結し、連結反応物をＴＥバッファーに溶解し、エレクトロポレーション法によりエシェリヒア・コリＤＨ５αを形質転換した。形質転換液にＳＯＣ培地を加えて３７℃で１時間保温し、等量の２×ＬＢ培地（カナマイシン２５ｍｇ／Ｌを含む）を加えて、３７℃で２時間培養した。培養液に４０％グリセロールを含む４×ＬＢ培地を等量加えた後、－８０℃で保存した。

【００５０】

上記培養液をＬＢ培地に接種し、得られた菌体よりプラスミドを回収した。プラスミドＤＮＡをエタノール沈殿し、ＭＥ８３２０にエレクトロポレーション法により導入した。

【００５１】

形質転換後、菌体を洗浄し、ビタミンB_1およびカナマイシン２５ｍｇ／Ｌを含むＭ９寒天培地にまいて、３７℃で３～４日間培養し、コロニーを形成させた。各コロニーを、再度同じ培地およびカナマイシン２５ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に塗布し、生育可能な株を選択し、同株からプラスミドを調製した。

【００５２】

取得したプラスミドの挿入断片の塩基配列を決定するため、ベクターのマルチクローニングサイトの両端から、はじめにユニバーサルプライマーを用いて塩基配列決定を開始した。続いて、約３００～４００ｂｐずつ読み進め、挿入断片の両端各々約５ｋｂｐずつを決定した。決定された塩基配列についてオープン・リーディング・フレーム（ＯＲＦ）の検索を行ったところ、既知である他種生物由来のホスホセリンホスファターゼ（ｓｅｒＢ遺伝子によりコードされる）と相同性が認められるＯＲＦが１つ見出されたた。同ＯＲＦ中に相同性のある領域は数カ所認められたが、エシェリヒア・コリとの相同性はアミノ酸配列で４３％、塩基配列で４９．４％であり、酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）との相同性はアミノ酸配列で３６．６％、塩基配列で５０．９％と低いものであった。

塩基配列及びアミノ酸配列は、Genetyx-Mac computer program（ソフトウェア開発、東京）により解析した。相同性解析は、LipmanとPeason (Science, 227, 1435-1441, 1985)の方法にしたがって行った。

【００５３】

上記のようにして決定した、既知のｓｅｒＢ遺伝子と相同性を有するＯＲＦ及びその隣接領域の塩基配列（配列番号１）及び同ＯＲＦがコードし得るアミノ酸配列（配列番号２）を、配列表に示す。

【００５４】

＜３＞ｓｅｒＢと相同性を有するＯＲＦのクローニング

上記にようにしてｓｅｒＢ遺伝子と相同性が認められたＯＲＦが実際にｓｅｒＢ相同遺伝子であるかを確認するため、同ＯＲＦ及びその上流・下流約２００～３００ｂｐを含む染色体ＤＮＡ断片をクローニングし、ｓｅｒＢ欠損株の相補性試験を行った。

【００５５】

目的とするＤＮＡ断片をＰＣＲにより取得するために、配列番号３及び４に示す塩基配列を有するプライマーを設計した。これらのプライマーを用い、ブレビバクテリウム・フラバムＡＴＣＣ１４０６７の染色体ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行った。ＰＣＲ反応は、Ｐｙｒｏｂｅｓｔ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造（株））を用い、９８℃ １０秒、５５℃ ３０秒、７２℃ ２分の反応を３０回繰り返した。

【００５６】

増幅されたＤＮＡ断片及びベクターｐＭＷ２１９をＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩで消化した

後、連結し、プラスミドｐＭＷ２１９ＢＳＢを構築した。ＰＣＲ反応により導入されたエラーが存在しないことは、増幅断片の塩基配列決定により確認した。ｐＭＷ２１９ＢＳＢ中、前記ＯＲＦはベクターに含まれるｌａｃＺプロモーターに対して逆向きに挿入されている。

【００５７】

ｐＭＷ２１９ＢＳＢを、＜２＞と同様にしてＭＥ８３２０株に導入し、カナマイシン２５ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に塗布した。形成されたコロニーを１０株ずつ拾い、これらをＭ９培地に接種し培養したが、生育は認められなかった。

【００５８】

＜４＞ｓｅｒＢと相同性を有するＯＲＦの強制発現

ｐＭＷ２１９ＢＳＢの挿入断片の向きを変え、ベクター中のｌａｃＺプロモーターに下流にＯＲＦが順方向となるように配向し、ＯＲＦが強制発現されるようにした。得られたプラスミドをＭＥ８３２０株に導入し、カナマイシン２５ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に塗布した。形成されたコロニーは、最少培地で生育が認められた。

【００５９】

上記の結果から、前記ｓｅｒＢ遺伝子と相同性を有するＯＲＦがエシェリヒア・コリのｓｅｒＢ欠損相補能を有することが明らかとなり、同ＯＲＦがブレビバクテリウム・フラバムのｓｅｒＢ相同遺伝子であることが確認された。

【００６０】

前記＜２＞で得られたクローン化断片には、ｓｅｒＢ遺伝子と相同性を有するＯＲＦのすぐ上流に別のＯＲＦが見出された。したがって、これらのＯＲＦはオペロンを形成しており、ｓｅｒＢ遺伝子と相同性を有するＯＲＦの直ぐ上流にはプロモーター領域等が存在しないため、ｐＭＷ２１９ＢＳＢはｓｅｒＢ欠損を相補しなかったと考えられる。

【００６１】

【発明の効果】

本発明により、ブレビバクテリウム・フラバムのホスホセリンホスファターゼをコードするＤＮＡが提供される。本発明のＤＮＡは、コリネ型細菌のＬ－セリン生産菌の育種等の利用することができる。

【００６２】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

〈120〉 コリネ型細菌のホスホセリンホスファターゼ遺伝子

〈130〉 P-8327

〈140〉
〈141〉 2001-01-26

〈150〉 JP 2000-23341
〈151〉 2000-01-27

〈160〉 4

〈170〉 PatentIn Ver. 2.0
【００６３】

〈210〉 1
〈211〉 1875
〈212〉 DNA
〈213〉 Brevibacterium flavum

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (210)..(1547)

〈400〉 1

```
gaattcggta ccgcccagcc cttgcatctg actccagtcg ctaaaagcgt ctgatttaag 60
tcggtacctg actaaataag caccagcccc agcagagata atctgccggg gctggtgctt 120
ttcatattcc gacttggggc acccctgaat acatctcacc caatccccca aagctacaca 180
attgtccagc aacgactgat aaatctcca atg tcg tgt tcc gcg ctc aga cat   233
                               Met Ser Cys Ser Ala Leu Arg His
                                 1               5
gag aca att gtt gcc gtg act gaa ctc atc cag aat gaa tcc caa gaa   281
Glu Thr Ile Val Ala Val Thr Glu Leu Ile Gln Asn Glu Ser Gln Glu
     10                  15                  20
atc gct gag ctg gaa gcc gga cag cag gtt gca ttg cgt gaa ggt tat   329
Ile Ala Glu Leu Glu Ala Gly Gln Gln Val Ala Leu Arg Glu Gly Tyr
 25                  30                  35                  40
ctt cct gcg gtg atc aca gtg agc ggt aaa gac cgc cca ggt gtg act   377
Leu Pro Ala Val Ile Thr Val Ser Gly Lys Asp Arg Pro Gly Val Thr
                 45                  50                  55
gcc gcg ttc ttt agg gtc ttg tcc gct aat cag gtt cag gtc ttg gac   425
Ala Ala Phe Phe Arg Val Leu Ser Ala Asn Gln Val Gln Val Leu Asp
             60                  65                  70
gtt gag cag tca atg ttc cgt ggc ttt ttg aac ttg gcg gcg ttt gtg   473
```

```
Val Glu Gln Ser Met Phe Arg Gly Phe Leu Asn Leu Ala Ala Phe Val
        75                  80                  85
ggt atc gca cct gag cgt gtc gag acc gtc acc aca ggc ctg act gac   521
Gly Ile Ala Pro Glu Arg Val Glu Thr Val Thr Thr Gly Leu Thr Asp
     90                  95                 100
acc ctc aag gtg cat gga cag tcc gtg gtg gtg gag ctg cag gaa act   569
Thr Leu Lys Val His Gly Gln Ser Val Val Val Glu Leu Gln Glu Thr
105                 110                 115                 120
gtg cag tcg tcc cgt cct cgt tct tcc cat gtt gtt gtg gtg ttg ggg   617
Val Gln Ser Ser Arg Pro Arg Ser Ser His Val Val Val Val Leu Gly
                125                 130                 135
gat ccg gtt gat gcg ttg gat att tcc cgc att ggt cag acc ctg gcg   665
Asp Pro Val Asp Ala Leu Asp Ile Ser Arg Ile Gly Gln Thr Leu Ala
            140                 145                 150
gat tac gat gcc aac att gac acc att cgt ggt att tcg gat tac cct   713
Asp Tyr Asp Ala Asn Ile Asp Thr Ile Arg Gly Ile Ser Asp Tyr Pro
        155                 160                 165
gtg acc ggc ctg gag ctg aag gtg act gtg ccg gat gtc agc cct ggt   761
Val Thr Gly Leu Glu Leu Lys Val Thr Val Pro Asp Val Ser Pro Gly
    170                 175                 180
ggt ggt gaa gcg atg cgt aag gcg ctt gct gct ctt acc tct gag ctg   809
Gly Gly Glu Ala Met Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Thr Ser Glu Leu
185                 190                 195                 200
aat gtg gat att gcg att gag cgt tct ggt ttg ctg cgt cgt tct aag   857
Asn Val Asp Ile Ala Ile Glu Arg Ser Gly Leu Leu Arg Arg Ser Lys
                205                 210                 215
cgt ctg gtg tgc ttc gat tgt gat tcc acg ttg atc act ggt gag gtc   905
Arg Leu Val Cys Phe Asp Cys Asp Ser Thr Leu Ile Thr Gly Glu Val
            220                 225                 230
```

```
att gag atg ttg gcg gct cac gcg ggc aag gaa gct gaa gtt gcg gca   953
Ile Glu Met Leu Ala Ala His Ala Gly Lys Glu Ala Glu Val Ala Ala
        235                 240                 245
gtt act gag cgt gcg atg cgc ggt gag ctc gat ttc gag gag tct ctg  1001
Val Thr Glu Arg Ala Met Arg Gly Glu Leu Asp Phe Glu Glu Ser Leu
    250                 255                 260
cgt gag cgt gtg aag gcg ttg gct ggt ttg gat gcg tcg gtg atc gat  1049
Arg Glu Arg Val Lys Ala Leu Ala Gly Leu Asp Ala Ser Val Ile Asp
265                 270                 275                 280
gag gtc gct gcc gct att gag ctg acc cct ggt gcg cgc acc acg atc  1097
Glu Val Ala Ala Ala Ile Glu Leu Thr Pro Gly Ala Arg Thr Thr Ile
                285                 290                 295
cgt acg ctg aac cgc atg ggt tac cag acc gct gtt gtt tcc ggt ggt  1145
Arg Thr Leu Asn Arg Met Gly Tyr Gln Thr Ala Val Val Ser Gly Gly
            300                 305                 310
ttc atc cag gtg ttg gaa ggt ttg gct gag gag ttg gag ttg gat tat  1193
Phe Ile Gln Val Leu Glu Gly Leu Ala Glu Glu Leu Glu Leu Asp Tyr
        315                 320                 325
gtc cgc gcc aac act ttg gaa atc gtt gat ggc aag ctg acc ggc aac  1241
Val Arg Ala Asn Thr Leu Glu Ile Val Asp Gly Lys Leu Thr Gly Asn
    330                 335                 340
gtc acc ggc aag atc gtt gac cgc gct gcg aag gct gag ttc ctc cgt  1289
Val Thr Gly Lys Ile Val Asp Arg Ala Ala Lys Ala Glu Phe Leu Arg
345                 350                 355                 360
gag ttc gct gcg gat tct ggc ctg aag atg tac cag act gtc gct gtc  1337
Glu Phe Ala Ala Asp Ser Gly Leu Lys Met Tyr Gln Thr Val Ala Val
                365                 370                 375
ggt gat ggc gct aat gac atc gat atg ctc tcc gct gcg ggt ctg ggt  1385
Gly Asp Gly Ala Asn Asp Ile Asp Met Leu Ser Ala Ala Gly Leu Gly
```

```
            380                 385                 390
gtt gct ttc aac gcg aag cct gcg ctg aag gag att gcg gat act tcc   1433
Val Ala Phe Asn Ala Lys Pro Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Thr Ser
        395                 400                 405
gtg aac cac cca ttc ctc gac gag gtt ttg cac atc atg ggc att tcc   1481
Val Asn His Pro Phe Leu Asp Glu Val Leu His Ile Met Gly Ile Ser
    410                 415                 420
cgc gac gag atc gat ctg gcg gat cag gaa gac ggc acc ttc cac cgc   1529
Arg Asp Glu Ile Asp Leu Ala Asp Gln Glu Asp Gly Thr Phe His Arg
425                 430                 435                 440
gtt cca ttg acc aat gcc taaagattcg cttctcgacg cccacctcct          1577
Val Pro Leu Thr Asn Ala
                445
cctcaaggcc cgggctagcg acgggccaca tagcgaggat ccttcggatc cttcgaccgt 1637
tcaggcaatg cagatcgcgt tgcacattcc gaaacagaat ccgccccggc ggacagatgt 1697
gttggaagcg gcggcgagga gtgtggtcaa gctttgcctc gacgaacgag tatccaccga 1757
tcctgatttt cgggcggcct tggaacgttg gtacggacac ttgattcgga aggtgtcacg 1817
tcgcgctcgt aatgcggcgt gggatcgggt gcaagattta cccggcgtga ctgtcgac   1875
```

【００６４】

〈210〉 2
〈211〉 446
〈212〉 PRT
〈213〉 Brevibacterium flavum

〈400〉 2

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

```
          180                 185                 190
Leu Ala Ala Leu Thr Ser Glu Leu Asn Val Asp Ile Ala Ile Glu Arg
        195                 200                 205
Ser Gly Leu Leu Arg Arg Ser Lys Arg Leu Val Cys Phe Asp Cys Asp
    210                 215                 220
Ser Thr Leu Ile Thr Gly Glu Val Ile Glu Met Leu Ala Ala His Ala
225                 230                 235                 240
Gly Lys Glu Ala Glu Val Ala Ala Val Thr Glu Arg Ala Met Arg Gly
                245                 250                 255
Glu Leu Asp Phe Glu Glu Ser Leu Arg Glu Arg Val Lys Ala Leu Ala
            260                 265                 270
Gly Leu Asp Ala Ser Val Ile Asp Glu Val Ala Ala Ala Ile Glu Leu
        275                 280                 285
Thr Pro Gly Ala Arg Thr Thr Ile Arg Thr Leu Asn Arg Met Gly Tyr
    290                 295                 300
Gln Thr Ala Val Val Ser Gly Gly Phe Ile Gln Val Leu Glu Gly Leu
305                 310                 315                 320
Ala Glu Glu Leu Glu Leu Asp Tyr Val Arg Ala Asn Thr Leu Glu Ile
                325                 330                 335
Val Asp Gly Lys Leu Thr Gly Asn Val Thr Gly Lys Ile Val Asp Arg
            340                 345                 350
Ala Ala Lys Ala Glu Phe Leu Arg Glu Phe Ala Ala Asp Ser Gly Leu
        355                 360                 365
Lys Met Tyr Gln Thr Val Ala Val Gly Asp Gly Ala Asn Asp Ile Asp
    370                 375                 380
Met Leu Ser Ala Ala Gly Leu Gly Val Ala Phe Asn Ala Lys Pro Ala
385                 390                 395                 400
Leu Lys Glu Ile Ala Asp Thr Ser Val Asn His Pro Phe Leu Asp Glu
                405                 410                 415

Val Leu His Ile Met Gly Ile Ser Arg Asp Glu Ile Asp Leu Ala Asp
            420                 425                 430
Gln Glu Asp Gly Thr Phe His Arg Val Pro Leu Thr Asn Ala
        435                 440                 445
```

【００６５】

〈210〉 3
〈211〉 36
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 3
gctccagaat tcggtaccgc ccagcccttg catctg 36

【００６６】

〈210〉 4
〈211〉 36
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 4
catcgtcgac agtcacgccg ggtaaatctt gcaccc 36

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C１２R 1:19
C１２P 13/06 D
C１２R 1:19

(72)発明者 朝倉 陽子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者 杉本 雅一
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者 伊藤 久生
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第０１／０００８４３（WO，Ａ１）
国際公開第０１／０６４８９９（WO，Ａ１）
特表２００３－５１７２９１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12P 13/06
C12N 15/09
C12N 9/16
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed