

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4330041号
(P4330041)

(45) 発行日 平成21年9月9日(2009.9.9)

(24) 登録日 平成21年6月26日(2009.6.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 7/20 (2006.01)

C 1 2 P 7/20

請求項の数 7 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-522687
 (86) (22) 出願日 平成9年11月10日(1997.11.10)
 (65) 公表番号 特表2001-503634(P2001-503634A)
 (43) 公表日 平成13年3月21日(2001.3.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/020293
 (87) 国際公開番号 WO1998/021340
 (87) 国際公開日 平成10年5月22日(1998.5.22)
 審査請求日 平成16年10月22日(2004.10.22)
 (31) 優先権主張番号 60/030,602
 (32) 優先日 平成8年11月13日(1996.11.13)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 98187

微生物の受託番号 ATCC 98248

(73) 特許権者 390023674
 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・
 アンド・カンパニー
 E. I. DU PONT DE NEMO
 URS AND COMPANY
 アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイリミ
 ントン、マーケット・ストリート 100
 7

(73) 特許権者 500513767
 ジエネンカー・インターナショナル・イン
 コーポレーテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9430
 4-1013パロアルト・ベイジミルロー
 ド925

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え生物体によるグリセロールの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) グリセロール-3-リン酸ホスファターゼ酵素をコードする遺伝子およびグリセロール-3-リン酸脱水素酵素をコードする遺伝子を含む発現カセットで適当な宿主細胞を形質転換すること；

(ii) 単糖、オリゴ糖、多糖および単一炭素基質から成る群から選択される最低1種の炭素源の存在下に(i)の形質転換された宿主細胞を培養してそれによりグリセロールを産生すること；および

(iii) (ii)で産生されたグリセロールを回収すること、
 を含んで成る、組換え生物体からのグリセロールの産生方法。

【請求項2】

適する宿主細胞が、細菌、酵母および糸状菌から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

適する宿主細胞が、シトロバクター属(Citrobacter)、エンテロバクター属(Enterobacter)、クロストリジウム属(Clostridium)、クレブシエラ属(Klebsiella)、アエロバクター属(Aerobacter)、乳酸桿菌属(Lactobacillus)、アスペルギルス属(Aspergillus)、サッカロミセス属(Saccharomyces)、スキゾサッカロミセス属(Schizosaccharomyces)、ジゴサッカロミセス属(Zygosaccharomyces)、ピキア属(Pichia)、クルイベロミセス属(Kluyveromyces)、カンジダ属(Candida)、ハンセヌラ属(Hansenula)、

デバリオミセス属 (Debaryomyces)、ケカビ属 (Mucor)、トルロプシス属 (Torulopsis)、メチロバクター属 (Methylobacter)、エシェリキア属 (Escherichia)、サルモネラ属 (Salmonella)、バチルス属 (Bacillus)、ストレプトミセス属 (Streptomyces) およびシュードモナス属 (Pseudomonas) から成る群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

適当な宿主細胞が大腸菌 (E.coli) もしくはサッカロミセス属 (Saccharomyces) である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

炭素源がグルコースである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

グリセロール 3-リン酸脱水素酵素をコードする遺伝子が配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 もしくは配列番号 12 に示されるアミノ酸配列に対応し、また、そのアミノ酸配列が、その酵素の機能特性を変えないアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入を包含する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

グリセロール 3-ホスファターゼ酵素をコードする遺伝子が配列番号 13 もしくは配列番号 14 に示されるアミノ酸配列に対応し、また、そのアミノ酸配列が、その酵素の機能を変えないアミノ酸の置換、欠失もしくは付加を包含する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は分子生物学の分野および所望の化合物の製造のための組換え生物体の使用に関する。より具体的には、本発明は、グリセロールの高められた産生のための、別個にもしくは一緒にのいずれかのグリセロール 3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH) およびグリセロール 3-ホスファターゼ (G3Pホスファターゼ) のクローン化された遺伝子の発現を記述する。

背景

グリセロールは、化粧品、液体石鹸、食物、医薬品、潤滑剤、不凍液、および多数の他の応用での使用のため産業による大きな要求にある化合物である。グリセロールのエステルは脂肪および油脂工業で重要である。

30

全ての生物体がグリセロールを合成する生来の能力を有するわけではない。しかしながら、グリセロールの生物学的産生はいくつかの種の細菌、藻類および酵母について既知である。細菌バチルス リケニフォルミス (Bacillus licheniformis) およびラクトバチルス

リコペルシカ (Lactobacillus lycopersica) はグリセロールを合成する。グリセロール産生は、耐塩藻ドゥナリエラ属 (Dunaliella) の種およびアステロモナス グラチリス (Asteromonas gracilis) で高い外的塩濃度に対する保護のため見出される (ベン・アモツ (Ben-Amotz) ら、(1982) Experientia 38:49-52)。同様に、多様な耐浸透圧酵母が保護手段としてグリセロールを合成する。サッカロミセス属 (Saccharomyces) の大部分の株はアルコール醗酵の間に若干のグリセロールを産生し、そしてこれは浸透圧ストレスの適用により生理学的に増大され得る (アルバーティン (Albertyn) ら、(1994) Mol. Cell Biol. 14、4135-4144)。今世紀の初期には、亜硫酸塩もしくはアルカリのようなスティアリング剤 (steering reagent) を添加するサッカロミセス属 (Saccharomyces) の培養によりグリセロールを商業的に産生していた。不活性複合体の形成により、スティアリング剤はアセトアルデヒドのエタノールへの転化を阻止もしくは阻害し；従って、過剰の還元同等物 (NADH) が、グリセロールを産生する還元用のジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) に利用可能か、またはこれに向けて「舵取り (スティアリング) される」。この方法は、亜硫酸塩による酵母の成長の部分的阻害により制限される。この制限は、異なる機構により過剰の NADH 同等物を創製するアルカリの使用により部分的に克服され得る。この実施に際して、アルカリはカニッツァロ不均化を引き起こして 2 当量のアセ

40

50

トアルデヒドからエタノールおよび酢酸を生じた。

グリセロールー３ーリン酸脱水素酵素をコードする遺伝子（D A R 1、G P D 1）は、サッカロミセス ジアスタチクス（*Saccharomyces diastaticus*）（ワン（Wang）ら、（1994）、J.Bact.176:7091-7095）からクローニングされかつ配列決定されている。D A R 1 遺伝子をシャトルベクターにクローニングし、そして大腸菌（*E.coli*）を形質転換するのに使用し、ここで発現が活性の酵素を産生した。ワン（Wang）ら、上記は、D A R 1 が細胞の浸透圧環境により調節されることを認識するが、しかし、当該遺伝子が組換え生物体でのグリセロール産生を高めるのにどのように使用されうるかを示唆しない。

他のグリセロールー３ーリン酸脱水素酵素が単離されている。例えば、s nーグリセロールー３ーリン酸脱水素酵素が、S. セレビシエ（*S.cerevisiae*）からクローニングされかつ配列決定されている（ララソン（Larason）ら、（1993）Mol.Microbiol.、10:1101、（1993））。アルバーティン（Albertyn）ら（（1994）Mol.Cell.Biol.、14:4135）はS. セレビシエ（*S.cerevisiae*）からのグリセロールー３ーリン酸脱水素酵素をコードするG P D 1のクローニングを教示する。ワン（Wang）らと同様、アルバーティン（Albertyn）らおよびララソン（Larason）らの双方がこの遺伝子の調節の浸透圧感受性を認識するが、しかし、当該遺伝子が組換え生物体でのグリセロール産生にどのように使用されうるかを示唆しない。

G 3 D P Hのように、グリセロールー３ーホスファターゼがサッカロミセス セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）から単離されており、また、当該タンパク質はG P P 1 およびG P P 2 遺伝子によりコードされると同定されている（ノルベック（Norbeck）ら、（1996）J.Biol.Chem.、271:13875）。G 3 D P Hをコードする遺伝子と同様にG P P 2 は浸透圧で誘導されるようである。

一緒にもしくは別個に発現されるG 3 P D H／G 3 Pホスファターゼをもつ組換え生物体からのグリセロール産生を教示する既知の技術は存在しない。細胞に対する何らかのストレス（塩もしくはオスモライト（osmolyte））を適用することを必要としないこれら２種の酵素活性をもついずれかの野生型生物体からのグリセロール産生を教示する既知の技術も存在しない。ユーステース（Eustace）（（1987）、Can.J.Microbiol.、33:112-117）は組換えDNA技術によりグリセロール産生を達成することから離れて教示する。選択的育種技術により、これらの研究者は親株より高いレベルでグリセロールを産生した交配酵母株を創製したが；しかしながらG 3 P D H活性は不変もしくはわずかにより低いままであった。

生理学的条件下でグリセロールを産生することが可能な微生物は、とりわけ浸透圧ストレスもしくはステアリング剤の添加により混乱され得るより複雑な異化もしくは生合成経路の一部としてインピボでグリセロールそれ自身が基質として使用されうる場合に、工業的に望ましい。

従って、解決されるべき問題は、ある酵素活性、とりわけそれぞれジヒドロキシアセトンリン酸（D H A P）のグリセロールー３ーリン酸（G 3 P）およびその後グリセロールへの転化を触媒するG 3 P D HおよびG 3 Pホスファターゼの添加もしくは強化により炭素の流れをグリセロールの産生に向かわせる方法である。この方法は組換え生物体に関して以前には記述されておらず、また、２種の酵素をコードする遺伝子の単離およびそれらのその後の発現を必要とする。遭遇された驚くべきおよび予期されない困難は宿主に対するG 3 Pホスファターゼの毒性であり、これは成長障害を避けるためのその発現レベルの慎重な制御を必要とした。

発明の要約

本発明は、（i）（a）グリセロールー３ーリン酸脱水素酵素をコードする遺伝子；

（b）グリセロールー３ーリン酸ホスファターゼ酵素をコードする遺伝子、

のいずれかもしくは双方を含む発現カセットで適当な宿主細胞を形質転換すること；（ii）単糖、オリゴ糖、多糖、および単一炭素基質、もしくはそれらの混合物から成る群から選択される最低１種の炭素源の存在下に、形質転換された宿主細胞を培養して、それによりグリセロールを産生すること；そして（iii）グリセロールを回収すること、を含んで

成る、組換え生物体からのグリセロールの製造方法を提供する。グルコースが最も好ましい炭素源である。

本発明は、さらに、グリセロールの産生のための、グリセロールー３ーリン酸脱水素酵素およびグリセロールー３ーホスファターゼ活性を発現することが可能な発現カセットを含んで成る形質転換された宿主細胞を提供する。

生物学的寄託物および配列表の簡単な記述

発明者は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約（the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Micro-organisms for the Purposes of Patent Procedure）の合意のもとに以下の生物学的寄託を行った。すなわち

10

寄託者の同定の引用

国際寄託当局の指定

寄託日

大腸菌(*Escherichia coli*)

A T C C 9 8 1 8 7

1996年9月26日

p A H 2 1 / D H 5 α

(G P P 2 遺伝子を含む)

大腸菌(*Escherichia coli*)

A T C C 9 8 2 4 8

1996年11月6日

(p D A R 1 A / A A 2 0 0)

20

(D A R 1 遺伝子を含む)

「A T C C」は、1 2 3 0 1 パークローンドライブ、ロックヴィル、米国メリーランド州、2 0 8 5 2 (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 U.S.A.) に位置するアメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection) 国際寄託所を指す。指定は寄託された試料の受託番号である。

発明者は、特許出願におけるヌクレオチドおよびアミノ酸配列の標準的表示規則 (the Rules for the Standard Representation of Nucleotide and Amino Acid Sequences in Patent Applications) (1992年12月のO J E P O に対する補遺第2号に出版されたE P O 会長決定に対する付属書類 I および II (Annexes I and II to the Decision of the President of the EPO, published in Supplement No.2 to OJ EP0, 12/1992))、ならびに連邦規則集 1. 8 2 1 - 1. 8 2 5 ならびに付録 A および B (ヌクレオチドおよび／もしくはアミノ酸配列を含む出願開示の要件 (Requirements for Application Disclosures Containing Nucleotides and/or Amino Acid Sequences)) に従って23個の配列を提供した。

30

発明の詳細な記述

本発明は、組換え生物体での醗酵可能な炭素源からのグリセロールの生物学的産生方法を提供する。当該方法は、化粧品および医薬品工業で有用なグリセロールの迅速、安価かつ環境的に信頼できる供給源を提供する。当該方法は、グリセロールー３ーリン酸脱水素酵素 (G 3 P D H) および／もしくはグリセロールー３ーホスファターゼ (G 3 P ホスファターゼ) をコードするクローニングされた同種もしくは異種の遺伝子を含む微生物を使用する。当該微生物を炭素源と接触させ、そしてグリセロールをコンディションド培地 (conditioned medium) から単離する。遺伝子はグリセロールの産生のため別個にもしくは一緒に宿主微生物中に組込まれうる。

40

本明細書で使用されるところの以下の用語が請求の範囲および明細書の解釈に使用される。

「グリセロールー３ーリン酸脱水素酵素」および「G 3 P D H」という用語は、ジヒドロキシアセトンリン酸 (D H A P) のグリセロールー３ーリン酸 (G 3 P) への転化を触媒する酵素活性の原因であるポリペプチドを指す。インビボの G 3 P D H は N A D H ; N A

50

D P H ; もしくは F A D 依存性である。N A D H 依存性の酵素 (E C . 1 . 1 . 1 . 8) は、G P D 1 (ジェンバンク (GenBank) Z 7 4 0 7 1 x 2) もしくは G P D 2 (ジェンバンク (GenBank) Z 3 5 1 6 9 x 1) もしくは G P D 3 (ジェンバンク (GenBank) G 9 8 4 1 8 2) もしくは D A R 1 (ジェンバンク (GenBank) Z 7 4 0 7 1 x 2) を包含するいくつかの遺伝子によりコードされる。N A D P H 依存性の酵素 (E C . 1 . 1 . 1 . 9 4) は、g p s A (ジェンバンク (GenBank) U 3 2 1 6 4 3 、 (c d s 1 9 7 9 1 1 - 1 9 6 8 9 2) G 4 6 6 7 4 6 および L 4 5 2 4 6) によりコードされる。F A D 依存性の酵素 (E C . 1 . 1 . 9 9 . 5) は、G U T 2 (ジェンバンク (GenBank) Z 4 7 0 4 7 x 2 3) もしくは g l p D (ジェンバンク (GenBank) G 1 4 7 8 3 8) もしくは g l p A B C (ジェンバンク (GenBank) M 2 0 9 3 8) によりコードされる。

10

「グリセロールー 3 - ホスファターゼ」、「s n - グリセロールー 3 - ホスファターゼ」もしくは「d , 1 - グリセロールホスファターゼ」、および「G 3 P ホスファターゼ」という用語は、グリセロールー 3 - リン酸のグリセロールへの転化を触媒する酵素活性の原因であるポリペプチドを指す。G 3 P ホスファターゼは G P P 1 (ジェンバンク (GenBank) Z 4 7 0 4 7 x 1 2 5) もしくは G P P 2 (ジェンバンク (GenBank) U 1 8 8 1 3 x 1 1) によりコードされる。

「グリセロールキナーゼ」という用語は、反応条件に依存してグリセロールのグリセロールー 3 - リン酸への、もしくはグリセロールー 3 - リン酸のグリセロールへの転化を触媒する酵素活性の原因であるポリペプチドを指す。グリセロールキナーゼは G U T 1 (ジェンバンク (GenBank) U 1 1 5 8 3 x 1 9) によりコードされる。

20

「G P D 1」、「D A R 1」、「O S G 1」、「D 2 8 3 0」および「Y D L 0 2 2 W」という用語は互換可能に使用され、そして、サイトゾルのグリセロールー 3 - リン酸脱水素酵素をコードしかつ配列番号 1 に示される塩基配列を特徴とする遺伝子を指す。

「G P D 2」という用語は、サイトゾルのグリセロールー 3 - リン酸脱水素酵素をコードしかつ配列番号 2 に示された塩基配列を特徴とする遺伝子を指す。

「G U T 2」および「Y I L 1 5 5 C」という用語は互換可能に使用され、そして、ミトコンドリアのグリセロールー 3 - リン酸脱水素酵素をコードしかつ配列番号 3 に示された塩基配列を特徴とする遺伝子を指す。

「G P P 1」、「R H R 2」および「Y I L 0 5 3 W」という用語は互換可能に使用され、そして、サイトゾルのグリセロールー 3 - ホスファターゼをコードしかつ配列番号 4 に示された塩基配列を特徴とする遺伝子を指す。

30

「G P P 2」、「H O R 2」および「Y E R 0 6 2 C」という用語は互換可能に使用され、そして、サイトゾルのグリセロールー 3 - ホスファターゼをコードしかつ配列番号 5 に示された塩基配列を特徴とする遺伝子を指す。

「G U T 1」という用語は、サイトゾルのグリセロールキナーゼをコードしかつ配列番号 6 に示された塩基配列を特徴とする遺伝子を指す。

本明細書で使用されるところの「機能」および「酵素機能」という用語は、特定の化学反応を実施するのに必要とされるエネルギーを変えることにおける酵素の触媒活性を指す。こうした活性は、生成物および基質双方の産生が適する条件下で成し遂げられうる平衡での反応に当てはまりうる。

40

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は本明細書で互換可能に使用される。

「炭素基質」および「炭素源」という用語は、本発明の宿主生物体により代謝されうる炭素源を指し、そしてとりわけ単糖、オリゴ糖、多糖および一炭素基質もしくはそれらの混合物から成る群から選択される炭素源を意味する。

「宿主細胞」および「宿主生物体」という用語は、外来すなわち異種の遺伝子を受領しかつそれらの遺伝子を発現して活性の遺伝子産物を産生することが可能な微生物を指す。

「外来遺伝子」、「外来 D N A」、「異種遺伝子」および「異種 D N A」という用語は全て、異なる宿主生物体内に置かれた 1 種の生物体生来の遺伝子物質を指す。

「組換え生物体」および「形質転換された宿主」という用語は異種すなわち外来の遺伝子で形質転換されたすべての生物体を指す。本発明の組換え生物体は、適する炭素基質から

50

のグリセロールの産生のためG 3 P D HおよびG 3 P ホスファターゼをコードする外来遺伝子を発現する。

「遺伝子」は、コーディング領域に先行する（5' 非コーディング）および後に続く（3' 非コーディング）調節配列を包含する特定のタンパク質を発現する核酸断片を意味する。「天然」および「野生型」の遺伝子という用語は、それ自身の調節配列を伴い天然に見出されるような遺伝子を意味する。

本明細書で使用されるところの「コーディング(encoding)」および「コーディング(coding)」という用語は、それにより遺伝子が転写および翻訳の機構によりアミノ酸配列を生じる方法を指す。特定のアミノ酸配列をコードする方法は、コードされたアミノ酸の変化を引き起こさない塩基の変化を伴いうる、または1個もしくはそれ以上のアミノ酸を変えうるがしかしそのDNA配列によりコードされるタンパク質の機能特性に影響を及ぼさない塩基の変化を伴うDNA配列を包含することを意味する。従って、本発明は特定の例示的配列以上を包含する。生じるタンパク質分子の機能特性に本質的に影響を及ぼさない沈黙変化を生じる配列中の欠失、挿入もしくは置換のような配列に対する改変もまた企図される。例えば、遺伝コードの縮重を反映する、もしくは与えられた部位での化学的に同等なアミノ酸の産生をもたらす遺伝子配列の変化が企図され；従って、疎水性アミノ酸であるアミノ酸アラニンのコドンは、グリシンのような別のより少なく疎水性の残基またはバリン、ロイシンもしくはイソロイシンのようなより疎水性の残基をコードするコドンにより置換されうる。同様に、グルタミン酸の代わりにアスパラギン酸のような1個の負に荷電した残基の代わりの別のもの、もしくはアルギニンの代わりにリシンのような1個の正に荷電した残基の代わりの別のものの置換をもたらす変化が生物学的に同等の産物を生じることにもまた期待され得る。タンパク質分子のN末端およびC末端部分の変化をもたらすヌクレオチド変化がそのタンパク質の活性を変えることが期待されないともまたみられる。いくつかの場合では、実際、そのタンパク質の生物学的活性に対する変化の影響を研究するためにその配列の突然変異体を作成することが望ましいであろう。提案された改変のそれぞれは、コードされた産物での生物学的活性の保持の測定がそうであるように、当該技術分野における慣用技術内に十分ある。さらに、当業者は、本発明により包含される配列がストリンジェントな条件下(0.1×SSC、0.1%SDS、65℃)で本明細書に例示される配列とハイブリダイゼーションするそれらの能力によってもまた定義されることを認識する。

「発現」という用語は、その遺伝子産物の配列をコードする遺伝子からの遺伝子産物への転写および翻訳を指す。

本明細書で使用されるところの「プラスミド」、「ベクター」および「カセット」という用語は、その細胞の中心的代謝の一部でなくかつ通常は環状の二本鎖DNA分子の形態にある遺伝子をしばしばもつ染色体外要素を指す。こうした要素は、いずれかの起源由来の一本鎖もしくは二本鎖のDNAもしくはRNAの直鎖状もしくは環状の自律的複製性配列、ゲノム組込み配列、ファージもしくはヌクレオチド配列であることができ、ここでは、多数のヌクレオチド配列が、プロモーター断片および適切な3' 非翻訳配列と一緒に選択された遺伝子産物のDNA配列を細胞中に導入することが可能である独特の構築物中に結合もしくは再結合されている。「形質転換カセット」は、外来遺伝子を含有しかつその外来遺伝子に加えて特定の宿主細胞の形質転換を助長する要素を有する特定のベクターを指す。「発現カセット」は、外来遺伝子を含有しかつその外来遺伝子に加えて異種宿主中でのその遺伝子の高められた発現を見込む要素を有する特定のベクターを指す。

「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、核酸の取り込み後の細胞中での新たな遺伝子の獲得を指す。獲得された遺伝子は染色体DNAに組込まれうるか、もしくは染色体外複製配列として導入されうる。「形質転換体」という用語は形質転換から生じる細胞を指す。

「遺伝子的に変えられた」という用語は、形質転換もしくは突然変異により遺伝物質を変化させる方法を指す。

代表的酵素経路

10

20

30

40

50

グリセロールは大部分の微生物で見出されるグリセロール生合成経路の操作により組換え生物体で産生されることが企図される。典型的には、グルコースのような炭素基質がATPの存在下にヘキソキナーゼを介してグルコース-6-リン酸に転化される。グルコースリン酸異性化酵素がグルコース-6-リン酸のフルクトース-6-リン酸、そしてその後6-ホスホフルクトキナーゼの作用によりフルクトース-1, 6-二リン酸への転化を触媒する。二リン酸はその後、アルドラーゼを介してジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)に取られる。最後に、NADH依存性のG3PDHがDHAPをグリセロール-3-リン酸に転化し、これはその後G3Pホスファターゼによりグリセロールに脱リン酸化される(アガルワル(Agarwal)(1990)、Adv.Biochem.Engrg.41:114)。

グリセロール産生の代替経路

DHAPからのグリセロール産生の代替経路が提案されている(ワン(Wang)ら、(1994) J.Bact.176:7091-7095)。この提案された経路では、DHAPは特異的もしくは非特異的ホスファターゼにより脱リン酸化されてジヒドロキシアセトンを与え得、これがその後ジヒドロキシアセトン還元酵素によりグリセロールに還元され得る。ジヒドロキシアセトン還元酵素は原核生物およびスキゾサッカロミセス ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)で既知であり、そして、適切なホスファターゼと一緒にこうした活性のクローニングおよび発現がグリセロール産生につながり得る。DHAPからのグリセロール産生の別の代替経路が提案されている(レドカー(Redkar)(1995)、Experimental Mycology, 19:241, 1995)。この経路では、DHAPが普遍的糖分解酵素トリオースリン酸異性化酵素によりグリセルアルデヒド-3-リン酸に異性化される。グリセルアルデヒド-3-リン酸はグリセルアルデヒドに脱リン酸化され、これがその後アルコール脱水素酵素もしくはNADP依存性グリセロール脱水素酵素活性により還元される。アスペルギルス ニズランズ(Aspergillus nidulans)からのホスファターゼおよび脱水素酵素活性のクローニングおよび発現がグリセロール産生につながり得る。

G3PDHおよびG3Pホスファターゼをコードする遺伝子

本発明は、宿主細胞中でのG3PDHおよびG3Pホスファターゼ活性の発現に適する遺伝子を提供する。

G3PDHをコードする遺伝子は既知である。例えば、GPD1がサッカロミセス属(Saccharomyces)から単離されており、そして配列番号7に与えられるアミノ酸配列をコードする配列番号1により与えられる塩基配列を有する(ワン(Wang)ら、上記)。同様に、配列番号8に与えられるアミノ酸配列をコードする配列番号2に与えられる塩基配列を有するGPD2によりコードされるG3PDH活性もまたサッカロミセス属(Saccharomyces)から単離されている(エリクソン(Eriksson)ら、(1995) Mol.Microbiol., 17:95)。

本発明の目的上、G3PDH活性の原因であるポリペプチドをコードするいかなる遺伝子も適することが企図され、ここでその活性はジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)のグリセロール-3-リン酸(G3P)への転化を触媒することが可能である。さらに、それぞれ遺伝子GPD1、GPD2、GUT2、gpsA、glpDおよびglpABCのαサブユニットに対応する配列番号7、8、9、10、11および12に示されるようなG3PDHのアミノ酸配列をコードするいかなる遺伝子も本発明において機能性であることができることが企図され、ここでそのアミノ酸配列は酵素の機能を変えないアミノ酸の置換、欠失もしくは付加を包含しうる。当業者は、他の起源から単離されたG3PDHをコードする遺伝子もまた本発明での使用に適することができることを真価を認めることができる。例えば、原核生物から単離された遺伝子は、ジェンバンク(GenBank)受託M34393、M20938、L06231、U12567、L45246、L45323、L45324、L45325、U32164、U32689およびU39682を包含する。真菌から単離された遺伝子はジェンバンク(GenBank)受託U30625、U30876およびX56162を包含し；昆虫から単離された遺伝子はジェンバンク(GenBank)受託X61223およびX14179を包含し；そして哺乳動物の起源から単離された遺伝子はジェンバンク(GenBank)受託U12424、M25558およびX78593

10

20

30

40

50

を包含する。

G 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子は既知である。例えば、G P P 2 はサッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から単離されており、かつ、配列番号 5 に示される塩基配列を有し、これは配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列をコードする (ノルベック (Norbeck) ら、(1996)、J.Biol.Chem.、271:13875)。

本発明の目的上、G 3 P ホスファターゼ活性をコードするいかなる遺伝子も当該方法での使用に適し、ここでその活性はグリセロール-3-リン酸のグリセロールへの転化を触媒することが可能である。さらに、それぞれ遺伝子 G P P 2 および G P P 1 に対応する配列番号 1 3 および 1 4 に示されるような G 3 P ホスファターゼのアミノ酸配列をコードするいかなる遺伝子も、G 3 P ホスファターゼ酵素の機能を変えないアミノ酸の置換、欠失もしくは付加を包含するいかなるアミノ酸配列も包含する本発明で機能性であることができる。当業者は、他の起源から単離された G 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子もまた本発明での使用に適するであろうと認識するであろう。例えば、グリセロールを生じるグリセロール-3-リン酸の脱リン酸化は、以下の一般的もしくは特異的ホスファターゼ、すなわちアルカリホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 1) [ジェンバンク (GenBank) M 1 9 1 5 9、M 2 9 6 6 3、U 0 2 5 5 0 もしくは M 3 3 9 6 5] ; 酸ホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 2) [ジェンバンク (GenBank) U 5 1 2 1 0、U 1 9 7 8 9、U 2 8 6 5 8 もしくは L 2 0 5 6 6] ; グリセロール-3-ホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 1) [ジェンバンク (GenBank) Z 3 8 0 6 0 もしくは U 1 8 8 1 3 x 1 1] ; グルコース-1-ホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 1 0) [ジェンバンク (GenBank) M 3 3 8 0 7] ; グルコース-6-ホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 9) [ジェンバンク (GenBank) U 0 0 4 4 5] ; フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 1 1) [ジェンバンク (GenBank) X 1 2 5 4 5 もしくは J 0 3 2 0 7] またはホスファチジルグリセロリン酸ホスファターゼ (E C 3. 1. 3 2 7) [ジェンバンク (GenBank) M 2 3 5 4 6 および M 2 3 6 2 8] の 1 種もしくはそれ以上を用いて達成されうる。

グリセロールキナーゼをコードする遺伝子は既知である。例えば、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からのグリセロールキナーゼをコードする G U T 1 が単離されかつ配列決定されており (パヴリク (Pavlik) ら (1993)、Curr.Genet.、24:21)、そしてその塩基配列が配列番号 6 に示されており、これは配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列をコードする。当業者は、グリセロールキナーゼは本来グリセロールの分解を触媒するとは言え、同一の酵素がグリセロールの合成で機能して適切な反応エネルギー条件下でグリセロール-3-リン酸をグリセロールに転化しうるであろうと認識するであろう。グリセロールキナーゼによるグリセロール産生の証拠が存在する。嫌氣的もしくは呼吸阻害条件下で、トリパノソーマ ブルセイ (*Trypanosoma brucei*) はグリセロール-3-P および A D P の存在下にグリセロールを生じさせる。この反応はグリコソーム (glycosome) 区画で起こる (ハモンド (Hammond)、(1985)、J.Biol.Chem.、260:15646-15654)。

宿主細胞

G 3 P D H および G 3 P ホスファターゼの発現によるグリセロールの組換え産生に適する宿主細胞は原核生物もしくは真核生物のいずれかであることができ、そして、活性の酵素を発現するそれらの能力によってのみ制限されうる。好ましい宿主細胞は、シトロバクター属 (*Citrobacter*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、アエロバクター属 (*Aerobacter*)、乳酸桿菌属 (*Lactobacillus*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、スキゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、ジゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ハンセンヌラ属 (*Hansenula*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、ケカビ属 (*Mucor*)、トルロプシス属 (*Torulopsis*)、メチロバクター属 (*Methylobacter*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) およびシュードモナス属 (*Pseudomonas*) のようなグリセロールの産生に典型的に有用な細菌、酵母および糸状菌であることができ

る。大腸菌 (E.coli) およびサッカロミセス属 (Saccharomyces) が本発明で好ましい。
ベクターおよび発現カセット

本発明は、適当な宿主細胞への G 3 P D H および G 3 P ホスファターゼのクローニング、形質転換および発現に適当な多様なベクターならびに形質転換および発現カセットを提供する。適当なベクターは使用される細菌と適合性であるものであることができる。適当なベクターは、例えば、細菌、ウイルス (バクテリオファージ T 7 もしくは M-13 由来ファージのような)、コスミド、酵母もしくは植物由来であり得る。こうしたベクターを得るおよび使用するためのプロトコールは当業者に既知である (サンプルック (Sambrook) ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual-第 1、2、3 巻 (コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) : ニューヨーク州コールド スプリングハーバー、1989))。

10

典型的には、当該ベクターもしくはカセットは、適当な遺伝子の転写および翻訳を指図する配列、選択可能なマーカー、ならびに自律的複製もしくは染色体組込みを可能にする配列を含有する。適するベクターは、転写開始制御をもつ遺伝子の 5' の領域および転写終止を制御する DNA 断片の 3' の領域を含んで成る。双方の制御領域が、形質転換された宿主細胞と同種の遺伝子由来である場合が最も好ましい。こうした制御領域は産生宿主として選ばれた特定の種に生来の遺伝子由来である必要はない。

所望の宿主細胞での G 3 P D H および G 3 P ホスファターゼ遺伝子の発現に至らせる (drive) のに有用である開始制御領域すなわちプロモーターは多数であり、かつ当業者に馴染みである。事実上、CYC 1、HIS 3、GAL 1、GAL 10、ADH 1、PGK、PHO 5、GAPDH、ADC 1、TRP 1、URA 3、LEU 2、ENO および TPI (サッカロミセス属 (Saccharomyces) での発現に有用) ; AOX 1 (ピキア属 (Pichia) での発現に有用) ; ならびに lac、trp、 λP_L 、 λP_R 、T 7、tac および trc (大腸菌 (E.coli) での発現に有用) を包含するがしかしこれらに制限されない、これらの遺伝子を至らせることが可能ないかなるプロモーターも本発明に適する。

20

終止制御領域もまた、好ましい宿主に生来の多様な遺伝子由来でありうる。場合によっては終止部位は不必要でありうるが ; しかしながら包含される場合が最も好ましい。

本酵素の有効な発現のためには、当該酵素をコードする DNA は、発現が適切なメッセンジャー RNA の形成をもたらすように選択された発現制御領域に開始コドンにより操作可能に連結される。

30

グリセロール産生のための適当な宿主の形質転換ならびに G 3 P D H および G 3 P ホスファターゼの発現

適当なカセットが構築されれば、それらを使用して適当な宿主細胞を形質転換する。G 3 P D H および / もしくは G 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子を含有するカセットの宿主細胞への導入は、例えばカルシウムで浸透可能にされた (permeabilized) 細胞を使用する形質転換、電気穿孔法、もしくは組換えファージウイルスを使用するトランスフェクションによるような既知の処置により成し遂げられうる (サンプルック (Sambrook) ら、上記)。

本発明では、一般的方法および実施例に完全に記述されるように、AH 2 1 および DAR 1 カセットを使用して大腸菌 (E.coli) DH 5 α を形質転換した。

40

培地および炭素基質

本発明の醗酵培地は適する炭素基質を含有しなければならない。適する基質は、グルコースおよびフルクトースのような単糖、乳糖もしくはショ糖のようなオリゴ糖、デンプンもしくはセルロースのような多糖、またはそれらの混合物、ならびにチーズホエー浸透液、トウモロコシ浸出液、テンサイ糖蜜およびオオムギ麦芽のような再生可能な供給原料からの未精製の混合物を包含してよいがしかしこれらに制限されなくてよい。加えて、炭素基質は、二酸化炭素、もしくはそれについて重要な生化学的中間体への代謝転化が立証されているメタノールのような単一炭素基質でもよい。

単一炭素源 (例えば、メタノール、ホルムアルデヒドもしくはギ酸) からのグリセロール産生は、メチル栄養性酵母 (ヤマダ (Yamada) ら (1989)、Agric.Biol.Chem.、53 (2) :

50

541-543) および細菌 (ハンター (Hunter) ら (1985)、Biochemistry、24:4148-4155) で報告されている。これらの生物体は、メタンからギ酸までの酸化段階の範囲にわたる単一炭素化合物を同化し得、そしてグリセロールを産生し得る。炭素同化の経路は、リブローサーリン酸、セリン、もしくはキシロースーリン酸を通してであり得る (ゴットシャルク (Gottschalk)、Bacterial Metabolism、第2版、シュプリンガー・フェアラーク (Springer-Verlag) : ニューヨーク (1986))。リブローサーリン酸経路は六炭糖を形成するリブローサー 5-リン酸とのギ酸の縮合を必要とし、この六炭糖はフルクトースそして最終的に三炭素産物グリセルアルデヒド-3-リン酸になる。同様に、セリン経路は単一炭素化合物をメチレンテトラヒドロ葉酸を介して解糖経路に同化する。

単一および二炭素基質に加え、メチル栄養性の生物体は、代謝活性のためにメチルアミン、グルコサミンおよび多様なアミノ酸のような多数の他の炭素含有化合物を利用することもまた既知である。例えば、メチル栄養性酵母はメチルアミンからの炭素を利用してトレハロースもしくはグリセロールを形成することが既知である (ベリオン (Bellion) ら (1993)、Microb.Growth Cl Compd.、[国際シンポジウム]、第7回、415-32。編者: マレル (Murrell, J. Collin); ケリー (Kelly, Don P.)。発行者: インターセプト (Intercept)、英国アンドーヴァー (Andover))。同様に、カンジダ属 (Candida) の多様な種はアラニンもしくはオレイン酸を代謝することができる (サルター (Sulter) ら (1990)、Arch.Microbiol.、153 (5):485-9)。これゆえに、本発明で利用される炭素源は広範な炭素含有基質を包含してよく、かつ、生物体の選択によってのみ制限されることができる。

上述された炭素基質の全ておよびそれらの混合物が本発明で適するとは言え、好ましい炭素基質は単糖、オリゴ糖、多糖、一炭素基質もしくはそれらの混合物である。グルコース、フルクトース、ショ糖、麦芽糖、乳糖のような糖類ならびにメタノールおよび二酸化炭素のような単一炭素基質がより好ましい。グルコースが炭素基質として最も好ましい。適切な炭素源に加え、醗酵培地は、培養物の成長およびグリセロール産生に必要な酵素経路の促進に適する当業者に既知の適するミネラル、塩、補因子、緩衝液および他の成分を含有しなければならない。

培養条件

典型的には、細胞は適切な培地中で30℃で成長される。好ましい成長培地は、ルリア・ベルタニ (Luria Bertani) (LB) 培地、サブローグルコース (Sabouraud Dextrose) (SD) 培地、もしくは酵母培地 (yeastmedium) (YM) 培地のような普遍的な商業的に製造された培地である。他の合成 (defined) すなわち合成 (synthetic) 成長培地もまた使用されることができ、そして、特定の微生物の成長に適切な培地が微生物学もしくは醗酵科学の当業者により知られることができる。直接もしくは間接的に同化抑制を調節することが既知の作用物質、例えば環状アデノシン 2' : 3' -リン酸の使用もまた反応培地に組み込まれうる。同様に、グリセロール産生の強化につながる酵素活性を調節することが既知の作用物質 (例えば、スルフェート、ビスルフェートおよびアルカリ) の使用は、遺伝子操作とともにもしくはこれに対する代替として使用されうる。

醗酵に適する pH 範囲は pH 5.0 ないし pH 9.0 の間であり、ここで pH 6.0 ないし pH 8.0 の範囲が初期条件に好ましい。

反応は好氣的もしくは嫌氣的条件下で実施されることができ、ここで嫌氣的もしくは微小好氣的 (microaerobic) 条件が好ましい。

G 3 P DH および G 3 P ホスファターゼの同定および精製

タンパク質 G 3 P DH および G 3 P ホスファターゼの発現レベルを酵素活性により測定する。G 3 P DH 活性のアッセイは G-3-P への DHA P の転化における共基質 (cosubstrate) NADH のスペクトル特性に頼る。NADH は固有の UV/可視吸収を有し、そしてその消費を 340nm で分光測光的にモニターし得る。G 3 P ホスファターゼ活性はこの反応で遊離される無機リン酸を測定するいずれかの方法により測定し得る。最も普遍的に使用される検出方法は青色のリンモリブデン酸アンモニウム錯体の可視分光測光的測定を使用する。

グリセロールの同定および回収

グリセロールは、細胞を含まない抽出物での高速液体クロマトグラフィー（HPLC）およびガスクロマトグラフィー／質量分析法（GC/MS）分析により同定かつ定量される。醗酵培地を0.01N硫酸の移動相を定組成の様式で使用する分析的イオン交換カラムで分析する方法が好ましい。

醗酵培地からのグリセロールの回収方法は当該技術分野で既知である。例えば、グリセロールは、反応混合物を以下の一連の段階、すなわち濾過；水の除去；有機溶媒抽出；および分別蒸留にかけることにより細胞培地から得ることができる（米国特許第2,986,495号）。

補足による形質転換体の選択

機能性の *g p s A* にコードされた *G 3 P D H* の非存在下すなわち膜の生合成の阻止につながる条件では、大腸菌 (*E.coli*) 細胞は *G 3 P* を合成することが不可能である。こうした封止を伴う細胞は栄養要求性であり、グリセロールもしくは *G 3 P* のいずれかが膜のリン脂質の合成のため培養培地中に存在することを必要とする。

クローニングされた異種の野生型 *g p s A* 遺伝子は染色体の *g p s A* の突然変異を補足してグリセロールもしくは *G 3 P* を欠く培地中での成長を可能にすることが可能である（ワン (Wang) ら (1994)、*J.Bact.*176:7091-7095）。この補足 (complementation) 戦略を基礎とすれば、*g p s A* 欠損細胞のグルコースでの成長は、それらがプラスミドにコードされた *g p s A* を保有する場合にのみ起こるとみられ、*D H A P* からの *G 3 P* の合成を基礎とした選択を可能にする。培養の間に組換え *g p s A* プラスミドを喪失する細胞は *G 3 P* を合成することに失敗するとみられ、そして細胞の成長がその後阻害されるとみられる。補足する *G 3 P D H* 活性は *g p s A* からのみならずしかした *G P D 1*、*G P D 2*、*G P D 3*、*G U T 2*、*g l p D* および *g l p A B C* のような *G 3 P D H* 活性を発現する他のクローニングされた遺伝子からもまた発現され得る。これらは *B B 2 0* のような *g p s A* 欠損大腸菌 (*E.coli*) 株中で維持され得（クロナン (Cronan) ら (1974)、*J.Bact.*、118:598）、抗生物質の選択を使用する必要性および大スケール醗酵でのそのひどく高い費用を軽減する。

関連する戦略が *S. セレビシエ* (*S.cerevisiae*) の浸透圧調節突然変異体の発現および選択に使用され得る（ラーソン (Larsson) ら (1993)、*Mol.Microbiol.*、10:1101-1111）。

これらの *o s g 1* 突然変異体は低水分潜在性で成長することが不可能であり、そしてグリセロール産生の低減された能力および抑制された *G 3 P D H* 活性を示す。*o s g 1* の塩感受性の欠損はクローニングかつ発現された *G 3 P D H* 遺伝子により補足され得る。かように、グリセロールを合成する能力が所望のグリセロール産生細胞についての選択マーカーとして同時に使用され得る。

実施例

一般的方法

リン酸化、連結および形質転換の手順は当該技術分野で公知である。以下の実施例での使用に適する技術は、サンプブルック (Sambrook) ら、Molecular Cloning:A laboratory Manual、第2版、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989) に見出されうる。

細菌培養物の維持および成長に適する材料および方法は当該技術分野で公知である。以下の実施例での使用に適する技術は、Manual of Methods for General Bacteriology (ゲルハルト (Phillipp Gerhardt)、マーレイ (R.G.E.Murray)、コスティロウ (Ralph N.Costilow)、ネスター (Eugene W.Nester)、ウッド (Willis A.Wood)、クリーク (Noel R.Krieg) とフィリップス (G.Briggs Phillips) 編)、アメリカ微生物学会 (American Society for Microbiology)、ワシントン D C (1994) もしくは Biotechnology:A Textbook of Industrial Microbiology (ブロック (Thomas D.Brock)、第2版 (1989) サイナウアー アソシエーツ インク (Sinauer Associates, Inc.)、マサチューセッツ州サンダーランド) に見出されうる。細菌細胞の成長および維持に使用される全ての試薬および材料は、別の方法で明記されない限り、アルドリッチ ケミカルズ (Aldrich Chemicals) (

10

20

30

40

50

ウィスコンシン州ミルウォーキー)、ディフコ ラボラトリーズ (DIFCO Laboratories) (ミシガン州デトロイト)、ギブコ/BRL (GIBCO/BRL) (メリーランド州ゲイタースバーグ) もしくはシグマ ケミカル カンパニー (Sigma Chemical Company) (ミズーリ州セントルイス) から得た。

略語の意味は以下のものである。すなわち、「h」は時間 (1 もしくは複数) を意味し、「min」は分 (1 もしくは複数) を意味し、「sec」は秒 (1 もしくは複数) を意味し、「d」は日 (1 もしくは複数) を意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味する。

細胞株

以下の大腸菌 (*Escherichia coli*) 株を G 3 P D H および G 3 P ホスファターゼの形質転換および発現に使用した。株は大腸菌 (*E. coli*) 遺伝子ストックセンター (*E. coli* Genetic Stock Center) もしくはライフ テクノロジーズ (Life Technologies) (メリーランド州ゲイタースバーグ) から得た。

AA 2 0 0 (g a r B 1 0 f h u A 2 2 o m p F 6 2 7 f a d L 7 0 1 r e l A 1 p i t - 1 0 s p o T 1 t p i - 1 p h o M 5 1 0 m c r B 1) (アンダーソン (Anderson) ら、(1970)、J.Gen.Microbiol.、62:329)。

BB 2 0 (t o n A 2 2 Δ p h o A 8 f a d L 7 0 1 r e l A 1 g l p R 2 g l p D 3 p i t - 1 0 g p s A 2 0 s p o T 1 T 2 R) (クロナン (Cronan) ら、J.Bact.、118:598)。

DH 5 α (d e o R e n d A 1 g y r A 9 6 h s d R 1 7 r e c A 1 r e l A 1 s u p E 4 4 t h i - 1 Δ (l a c Z Y A - a r g F V 1 6 9) p h i 8 0 l a c Z Δ M 1 5 F⁻) (ウッドコック (Woodcock) ら、(1989)、Nucl.Acids Res.、17:3469)。

グリセロールの同定

グルコースのグリセロールへの転化を H P L C および/もしくは G C によりモニターした。分析はクロマトグラフィーの当業者に利用可能な標準的技術および材料を使用して実施した。1 個の適する方法は U V (210nm) および R I 検出を使用するウォーターズ マキシマ (Waters Maxima) 8 2 0 H P L C システムを利用した。サンプルを、0.01N 硫酸を移動相として 0.5mL/min の流速で使用する 50°C に温度制御された ショウデックス (Shodex) S H - 1 0 1 1 P プレカラム (6 mm × 50 mm) を装備された ショウデックス (Shodex) S H - 1 0 1 1 カラム (8 mm × 3 0 0 mm; ウォーターズ (Waters)、マサチューセッツ州ミルフォード) に注入した。定量分析を所望した場合は、サンプルを、0.01N 硫酸を移動相として 0.69mL/min の流速で使用する 50°C に温度制御された ショウデックス (Shodex) S H - 1 0 1 1 P プレカラム (6 mm × 50 mm) を装備された ショウデックス (Shodex) S H - 1 0 1 1 カラム (8 mm × 300 mm; ウォーターズ (Waters)、マサチューセッツ州ミルフォード) に注入した。定量分析を所望した場合は、サンプルを、外部標準としての既知量のトリメチル酢酸を含んで調製した。典型的には、グリセロール (R I 検出) およびグルコース (R I 検出) の保持時間はそれぞれ 17.03min および 12.66min であった。

グリセロールは G C / M S によってもまた分析した。グリセロールの質量分析検出および定量を伴うガスクロマトグラフィーを、以下の条件すなわち注入器: 分割、1 : 15; サンプル量: 1 μL; 温度プロファイル: 30sec の保持を伴う 150°C の初期温度、180°C へ 40°C/min、240°C へ 20°C/min、2.5min 保持で、D B - W A X カラム (30m、直径 0.32mm、0.25 μm 薄膜厚、J & W サイエнтиフィク (J & W Scientific)、カリフォルニア州フォルソン) を使用して行った。検出: E I 質量分析 (ヒューレット パッカード (Hewlett Packard) 5 9 7 1、カリフォルニア州サンフェルナンド)、グリセロールおよびグリセロール-d 8 の標的イオンとしてイオン 61m/z および 64m/z、ならびにグリセロールの修正体 (qualifier) イオンとしてイオン 43m/z を使用する定量的 S I M。グリセロール-d 8 を内部標準として使用した。

グリセロール-3-ホスファターゼ、G P P についてのアッセイ

酵素活性のアッセイを、抽出物をビスートリスもしくは M E S およびマグネシウム緩衝液

10

20

30

40

50

、pH6.5中で有機リン基質とインキュベーションすることにより実施した。使用された基質は1- α -グリセロールリン酸もしくはd, 1- α -グリセロールリン酸のいずれかであった。アッセイでの試薬の最終濃度は、緩衝液(20mM、ピストリスもしくは50mM E S)；塩化マグネシウム(10mM)；および基質(20mM)である。サンプル中の総タンパク質が少なくそして可視的沈殿が酸クエンチ(acidquench)で発生しなかった場合はサンプルをキュベット中で便宜的にアッセイした。この方法は、20mMの基質(50 μ L、200mM)、50mMのM E S、10mMの塩化マグネシウム、pH6.5緩衝液を含有したキュベット中で酵素サンプルをインキュベーションすることを必要とした。最終のホスファターゼアッセイ体積は0.5mLであった。酵素を含有するサンプルを反応混合物に添加し；キュベットの内容物を混合し、そしてその後キュベットを5ないし120分間T=37°Cの循環水浴中に置いた。時間の長さは酵素サンプル中のホスファターゼ活性が2から0.02U/mLまでの範囲にわたったかどうか依存した。酵素反応を酸モリブデン酸試薬(0.4mL)の添加によりクエンチした。フィスケ サバロウ(Fiske SubbaRow)試薬(0.11mL)および蒸留水(1.5mL)を添加した後に溶液を混合しそして発色させた。完全な色の発生を可能にするための10分後に、サンプルの吸光度をケアリー(Cary) 219UV/可視分光光度計を使用して660nmで読み取った。遊離された無機リン酸の量を、ストック無機リン酸溶液(0.65mM)を使用すること、そして0.026から0.130 μ mol/mLまでの範囲にわたる最終無機リン酸濃度の6種の標準品を調製することにより調製した標準曲線と比較した。

10

グリセロール 3-リン酸脱水素酵素(G 3 P D H)活性の分光測光的アッセイ

以下の手順を、ベル(Bell)ら(1975)、J.Biol.Chem., 250:7153-8により発表された方法から下に改変されたように使用した。この方法は、30°Cで1.0mLの総体積中に5mM D T Tを含む0.1Mトリス/塩酸、pH7.5緩衝液中に0.2mM N A D H；2.0mMジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)および酵素を含有したキュベット中で酵素サンプルをインキュベーションすることを必要とした。分光光度計を340nmの固定波長での吸光度変化をモニターするよう設定した。機器を、緩衝液のみを含有するキュベットをブランクにした。酵素をキュベットに添加した後に吸光度の読みを取った。最初の基質N A D H(50 μ Lの4mM N A D H；吸光度はおおよそ1.25A Uに増大するはずである)を添加してバックグラウンド速度を測定した。この速度は最低3分間追跡すべきである。第二の基質D H A P(50 μ Lの40mM D H A P)をその後添加し、そして経時的(over time)吸光度変化を最低3分間モニターして全体速度を測定した。G 3 P D H活性を、全体速度からバックグラウンド速度を差し引くことにより定義した。

20

30

プラスミド構築および株の構築

大腸菌(E.coli)でのグリセロール産生の増大のためのグリセロール 3-ホスファターゼのクローニングおよび発現

サッカロミセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)の染色体Vの λ クローン6592(ジーンバンク(GeneBank)、受託番号U18813x11)をATCCから得た。グリセロール 3-リン酸ホスファターゼ(GPP2)遺伝子を、5'端にBamH I-RBS-Xba I切断部位および3'端にSma I切断部位を組込む合成プライマー(配列番号17と配列番号16)を使用して標的DNAとしての λ クローンからのクローニングによりクローニングした。この産物をSrf I切断部位でpCR-Script(ストラタジーン(Stratagene)、ウィスコンシン州マジソン)にサブクローニングしてGPP2を含有するプラスミドpAH15を生じさせた。プラスミドpAH15はpCR-Script SK+中でlacプロモーターからの発現に関し不活性な向きにGPP2遺伝子を含有する。GPP2遺伝子を含有するpAH15からのBamH I-Sma I断片をpBlueScript II SK+に挿入してプラスミドpAH19を生じさせた。pAH19はlacプロモーターからの発現に適正な向きにGPP2遺伝子を含有する。GPP2遺伝子を含有するpAH19からのXba I-Pst I断片をpPHOX2に挿入してプラスミドpAH21を創製した。pAH21/DH5 α が発現プラスミドである。

40

大腸菌(E.coli)でのDAR1の過剰発現のためのプラスミド

DAR1を、合成プライマー(配列番号19と配列番号18)を使用するゲノムのS. セ

50

レビシエ (*S.cerevisiae*) の DNA からの PCR クローニングにより単離した。成功した PCR クローニングは D A R 1 の 5' 端に N c o I 切断部位を置き、ここで N c o I 内の A T G は D A R 1 のイニシエーターのメチオニンである。D A R 1 の 3' 端には B a m H I 切断部位を翻訳ターミネーターに続いて導入する。PCR 断片を N c o I + B a m H I で消化し、そして発現プラスミド p T r c 9 9 A (ファルマシア (Pharmacia)、ニュージャージー州ピスカタウェイ) 内の同一部位にクローニングして p D A R 1 A を与えた。D A R 1 の 5' 端により良好なリボソーム結合部位を創製するため、合成プライマー (配列番号 2 1 と配列番号 2 0) を連結することにより得られた S p e I - R B S - N c o I リンカーを p D A R 1 A の N c o I 切断部位に挿入して p A H 4 0 を創製した。プラスミド p A H 4 0 は p T r c 9 9 A (ファルマシア (Pharmacia)、ニュージャージー州ピスカタウェイ) のプロモーターからの発現に適正な向きに新たな R B S および D A R 1 遺伝子を含有する。p D A R 1 A からの N c o I - B a m H I 断片、および合成プライマー (配列番号 2 3 と配列番号 2 2) を連結することにより得られた第二の組の S p e I - R B S - N c o I リンカーを、p B C - S K + (ストラタジーン (Stratagene)、ウィスコンシン州マジソン) の S p e I - B a m H I 切断部位に挿入してプラスミド p A H 4 2 を創製した。プラスミド p A H 4 2 はクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有する。

10

D A R 1 および G P P 2 の発現カセットの構築

D A R 1 および G P P 2 の発現カセットを、標準的な分子生物学の方法を使用して、上述された個々の D A R 1 および G P P 2 の二次クローンから集成した。リボソーム結合部位 (R B S) および G P P 2 遺伝子を含有する p A H 1 9 からの B a m H I - P s t I 断片を p A H 4 0 に挿入して p A H 4 3 を創製した。R B S および G P P 2 遺伝子を含有する p A H 1 9 からの B a m H I - P s t I 断片を p A H 4 2 に挿入して p A H 4 5 を創製した。

20

G P P 2 の 5' 端のリボソーム結合部位を以下のように改変した。合成プライマー C T A G T C T G T T T C C T G (配列番号 2 5) を伴う G A T C C A G G A A A C A G A (配列番号 2 4) を、G P P 2 遺伝子を含有する p A H 1 9 からの X b a I - P s t I 断片に連結することにより得られる B a m H I - R B S - S p e I リンカーを、p A H 4 0 の B a m H I - P s t I 切断部位に挿入して p A H 4 8 を創製した。プラスミド p A H 4 8 は D A R 1 遺伝子、改変された R B S および G P P 2 遺伝子を、p T r c 9 9 A (ファルマシア (Pharmacia)、ニュージャージー州ピスカタウェイ) の t r c プロモーターからの発現に適正な向きに含有する。

30

大腸菌 (*E.coli*) の形質転換

ここで記述された全てのプラスミドを標準的な分子生物学の技術を使用して大腸菌 (*E.coli*) D H 5 α に形質転換した。形質転換体をその DNA の R F L P パターンにより確かめた。

実施例 1

G 3 P D H 遺伝子で形質転換された大腸菌 (*E.coli*) からのグリセロールの産生

培地

合成培地を、p D A R 1 A で形質転換された大腸菌 (*E.coli*) 細胞を使用するグリセロールの嫌気的もしくは好氣的産生に使用した。この培地は、1 リットルあたり、6.0g の N a₂H P O₄、3.0g の K H₂ P O₄、1.0g の N H₄ C l、0.5g の N a C l、1 mL の 20% M g S O₄ · 7 H₂O、8.0g のグルコース、40mg のカザミノ酸、0.5ml の 1% 塩酸チアミン、100mg のアンピシリンを含有した。

40

成長条件

p D A R 1 A もしくは p T r c 9 9 A ベクターをもつ株 A A 2 0 0 を、37°C で 250mL フラスコ中、250rpm で振とうする 50mL の培地中で好氣的条件下で成長させた。A₆₀₀ が 0.2~0.3 でイソプロピルチオ- β -D-ガラクトシドを 1mM の最終濃度に添加し、そしてインキュベーションを 48 時間継続した。嫌氣的成長のため、誘導された細胞のサンプルを使用してファルコン (Falcon) # 2 0 5 4 チューブを満たし、これに栓をしそして回転により 37°C で 48 時間穏やかに混合した。グリセロール産生を培養上清の H P L C 分析により測定した

50

。株 p D A R 1 A / A A 2 0 0 は、48時間後に嫌気的条件下で0.38g/L、および好気的条件下で0.48g/Lのグリセロールを産生した。

実施例 2

G 3 P ホスファターゼ遺伝子 (G P P 2) で形質転換された大腸菌 (E.coli) からのグリセロールの産生

培地

合成 p h o A 培地を振とうフラスコ中で使用して大腸菌 (E.coli) での G P P 2 発現によるグリセロールの増加を立証した。p h o A 培地は、1 リットルあたり、アミノイ (Amisoy) 12g; 硫酸アンモニウム 0.62g; M O P S 10.5g; クエン酸ナトリウム 1.2g; N a O H (1 M) 10mL; 1 M N g S O₄ 12mL; 100×微量元素 12mL; 50% グルコース 10mL; 1 % チアミン 10mL; 100mg/mL の L - プロリン 10mL; 2.5mM F e C l₃ 5 mL; 混合リン酸緩衝液 2 mL (5 mL の 0.2M N a H₂ P O₄ + 9 mL の 0.2M K₂ H P O₄)、および 7.0 までの p H を含有した。p h o A 培地 1 リットルについて 100×微量元素は、Z n S O₄ · 7 H₂O、0.58g; M n S O₄ · H₂O、0.34g; C u S O₄ · 5 H₂O、0.49g; C o C l₂ · 6 H₂O、0.47g; H₃ B O₃、0.12g、N a M o O₄ · 2 H₂O、0.48g を含有した。

振とうフラスコ実験

株 p A H 2 1 / D H 5 α (G P P 2 遺伝子を含有する) および p P H O X 2 / D H 5 α (対照) を、250mL 振とうフラスコ中 37°C で 45mL の培地 (p h o A 培地、50 μg/mL のカルベニシリンおよび 1 μg/mL のビタミン B₁₂) 中で成長させた。培養物を嫌気的条件下 (250rpm の振とう) で 24 時間成長させた。グリセロール産生を培養上清の H P L C 分析により測定した。p A H 2 1 / D H 5 α は 24 時間後に 0.2g/L のグリセロールを産生した。

実施例 3

G P P 2 および D A R 1 双方を含有する組換え大腸菌 (E.coli) を使用する D - グルコースからのグリセロールの産生

p A H 4 3 を含有する大腸菌 (E.coli) D H 5 α による増大されたグリセロール産生の立証のための成長を、振とうフラスコ培養 (三角フラスコ、液体体積は総体積の 1 / 5) で 37°C で嫌気的に進行する。

最小培地 / 1 % グルコース振とうフラスコでの培養を、抗生物質選択を伴う一夜 L B / 1 % グルコース培養物からの接種により開始する。最小培地は濾過滅菌された合成培地、最終 p H 6.8 (H C l) であり、1 リットルあたり 12.6g の (N H₄)₂ S O₄、13.7g の K₂ H P O₄、0.2g の酵母抽出物 (ディフコ (Difco))、1g の N a H C O₃、5mg のビタミン B₁₂、5mL の改変バルク (Balch) 微量元素溶液 (その組成は Methods for General and Molecular Bacteriology (ゲルハルト (P.Gerhardt) ら、編、p.158、アメリカ微生物学会 (American Society for Microbiology)、ワシントン D C (1994)) に見出され得る) を含有した。振とうフラスコを活発な振とうを伴い一夜 37°C でインキュベーションし、その後それらを上清の G C 分析のためサンプリングする。p A H 4 3 / D H 5 α は 24 時間後に 3.8g/L のグリセロール産生を示した。

実施例 4

G P P 2 および D A R 1 双方を含有する組換え大腸菌 (E.coli) を使用する D - グルコースからのグリセロールの産生

実施例 4 は G P P 2 および D A R 1 双方の遺伝子を含有する組換え大腸菌 (E.coli) D H 5 α / p A H 4 8 からのグリセロールの産生を具体的に説明する。

株 D H 5 α / p A H 4 8 を一般的方法に上述されたように構築した。

前培養

D H 5 α / p A H 4 8 を醗酵段階での接種 (seeding) のための前培養をした。前培養のための成分およびプロトコルを下に列挙する。

前培養培地

K H ₂ P O ₄	30.0g/L
クエン酸	2.0g/L
M g S O ₄ · 7 H ₂ O	2.0g/L

98% 硫酸	2.0mL/L
クエン酸アンモニウム鉄	0.3g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2g/L
酵母抽出物	5.0g/L
微量金属	5.0mL/L
グルコース	10.0g/L
カルベニシリン	100.0mg/L

上の培地成分を一緒に混合し、そしてpHを水酸化アンモニウムで6.8に調節した。培地をその後濾過滅菌した。

微量金属は以下の配合表に従って使用した。すなわち

10

クエン酸一水和物	4.0g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5g/L
NaCl	1.0g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1g/L
CaCl_2	0.1g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
H_3BO_3	10mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
Na_2SeO_3	10mg/L
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10mg/L

20

培養を、50μLの凍結ストック（低温保護剤として15%グリセロール）から2Lの三角フラスコ中の600mLの培地に接種された接種培養物（seed culture）から開始した。培養物を30°Cで250rpmの振とう機中およそ12時間成長させ、そしてその後醗酵器に接種するのに使用した。

醗酵成長

30

容器

15Lの攪拌タンク醗酵器

培地

K_2PO_4	6.8g/L
クエン酸	2.0g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0g/L
98% 硫酸	2.0mL/L
クエン酸アンモニウム鉄	0.3g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2g/L
メイズ（Mazu）DF204 消泡剤（antifoam）	1.0mL/L

40

上の成分を醗酵器容器中で一緒に滅菌した。pHを水酸化アンモニウムで6.7に上昇させた。酵母抽出物（5g/L）および微量金属溶液（5mL/L）を濾過滅菌されたストック溶液から無菌的に添加した。グルコースを60%供給材料（feed）から添加して10g/Lの最終濃度を与えた。カルベニシリンを100mg/Lで添加した。接種後の体積は6Lであった。

醗酵のための環境的条件

温度を36°Cに制御し、また、空気流速を1分あたり6標準リットル（standard liter）で制御した。背圧を0.5barで制御した。攪拌機を350rpmに設定した。水性アンモニアを使用してpHを6.7に調節した。グルコース供給材料（60%グルコース一水和物）の速度は、過剰のグルコースを維持するように制御した。

結果

50

醗酵運転の結果を表1に与える。

表1

EFT (hr)	OD550 (AU)	[グルコース] (g/L)	[グリセロール] (g/L)	供給された 総グルコース(g)	産生された 総グリセロール(g)
0	0.8	9.3		25	
6	4.7	4.0	2.0	49	14
8	5.4	0	3.6	71	25
10	6.7	0.0	4.7	116	33
12	7.4	2.1	7.0	157	49
14.2	10.4	0.3	10.0	230	70
16.2	18.1	9.7	15.5	259	106
18.2	12.4	14.5		305	
20.2	11.8	17.4	17.7	353	119
22.2	11.0	12.6		382	
24.2	10.8	6.5	26.6	404	178
26.2	10.9	6.8		442	
28.2	10.4	10.3	31.5	463	216
30.2	10.2	13.1	30.4	493	213
32.2	10.1	8.1	28.2	512	196
34.2	10.2	3.5	33.4	530	223
36.2	10.1	5.8		548	
38.2	9.8	5.1	36.1	512	233

10

20

配列表

(1) 一般的情報:

(i) 発明者:

(A) 名称: E. I. デュポンド・ネムール・アンド・カンパニー (E.I.Du Pont de Nemours and Company) 30

(B) 通り: 1007 マーケット, ストリート (1007 Market Street)

(C) 都市名: ウィルミントン

(D) 州名: デラウェア

(E) 国名: 米国

(F) 郵便番号: 19898

(G) 電話: 302-892-8112

(H) ファックス: 302-773-0164

(I) テレックス: 6717325

(A) 名宛人: ジェネンコール インターナショナル, インク (Genencor International, Inc.) 40

(B) 通り: 4 ケンブリッジ プレイス (4 Cambridge Place) 1870 サウス・ウィントンロード (1870 South Winton Road)

(C) 都市名: ロチェスター

(D) 州名: ニューヨーク

(E) 国名: 米国

(F) 郵便番号: 14618

(ii) 発明の名称: 組換え生物体によるグリセロールの製造方法

(iii) 配列の数: 25

(iv) コンピューターで解読可能な形:

50

- (A) 媒体の型：ディスクett, 3.5インチ
- (B) コンピューター：IBM互換機
- (C) オペレーティングシステム マイクロソフト ワードウィンドーズ95
- (D) ソフトウェア：マイクロソフト ワード バージョン7.0A
- (v) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 申請日：

(C) 分類：

(vi) 以前の出願データ：

(A) 出願番号：60/03602

10

(B) 申請日：1996年11月13日

(C) 分類：

(vii) 代理人の情報：

(A) 氏名：フロイド, リンダ・アクサメティ (Floyd, Linda Axamethy)

(B) 登録番号：33, 692

(C) 参照／一件書類番号：CR-9981-P1

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ：1380

(B) 配列の型：核酸

20

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

(xi) 配列：配列番号1：

CTTTAATTTT CTTTATCTT ACTCTCCTAC ATAAGACATC AAGAAACAAT TGTATATTGT 60
 ACACCCCCC CCTCCACAAA CACAAATATT GATAATATAA AGATGTCTGC TGCTGCTGAT 120
 AGATTAAACT TAACTCCGG CCACTTGAAT GCTGGTAGAA AGAGAAGTTC CTCTTCTGTT 180
 TCTTTGAAGG CTGCCGAAAA GCCTTTCAAG GTTACTGTGA TTGGATCTGG TAACTGGGGT 240
 ACTACTATTG CCAAGGTGGT TGCCGAAAAT TGTAAGGGAT ACCCAGAAGT TTTGCTCCA 300
 ATAGTACAAA TGTGGGTGTT CGAAGAAGAG ATCAATGGTG AAAAATTGAC TGAAATCATA 360
 AATACTAGAC ATCAAAACGT GAAATACTTG CCTGGCATCA CTCTACCCGA CAATTTGGTT 420
 GCTAATCCAG ACTTGATTGA TTCAGTCAAG GATGTCGACA TCATCGTTTT CAACATTCCA 480
 CATCAATTTT TGCCCCGTAT CTGTAGCCAA TTGAAAGGTC ATGTTGATTC ACACGTCAGA 540
 GCTATCTCCT GTCTAAAGGG TTTTGAAGTT GGTGCTAAAG GTGTCCAATT GCTATCCTCT 600
 TACATCACTG AGGAACTAGG TATTCAATGT GGTGCTCTAT CTGGTGCTAA CATTGCCACC 660
 GAAGTCGCTC AAGAACACTG GTCTGAAACA ACAGTTGCTT ACCACATTCC AAAGGATTTC 720
 AGAGGCGAGG GCAAGGACGT CGACCATAAG GTTCTAAAGG CCTTGTTCCA CAGACCTTAC 780
 TTCCACGTTA GTGTCATCGA AGATGTTGCT GGTATCTCCA TCTGTGGTGC TTTGAAGAAC 840
 GTTGTGCGCT TAGGTTGTGG TTTGTCGAA GGTCTAGGCT GGGGTAACAA CGCTTCTGCT 900
 GCCATCCAAA GAGTCGGTTT GGGTGAGATC ATCAGATTCG GTCAAATGTT TTTCCAGAA 960
 TCTAGAGAAG AAACATACTA CCAAGAGTCT GCTGGTGTG CTGATTTGAT CACCACCTGC 1020
 GCTGGTGGTA GAAACGTCAA GGTGCTAGG CTAATGGCTA CTTCTGGTAA GGACGCCTGG 1080
 GAATGTGAAA AGGAGTTGTT GAATGGCCAA TCCGCTCAAG GTTTAATTAC CTGCAAAGAA 1140
 GTTCACGAAT GGTGGAAC ATGTGGCTCT GTCGAAGACT TCCCATTATT TGAAGCCGTA 1200
 TACCAAATCG TTTACAACAA CTACCCAATG AAGAACCTGC CGGACATGAT TGAAGAATTA 1260
 GATCTACATG AAGATTAGAT TTATTGGAGA AAGATAACAT ATCATACTTC CCCCCTTTT 1320
 TTCGAGGCTC TTCTATATCA TATTCATAAA TTAGCATTAT GTCATTTCTC ATAACACTT 1380

10

20

30

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2946

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(xi) 配列: 配列番号2:

40

GAATTCGAGC CTGAAGTGCT GATTACCTTC AGGTAGACTT CATCTTGACC CATCAACCCC	60
AGCGTCAATC CTGCAAATAC ACCACCCAGC AGCACTAGGA TGATAGAGAT AATATAGTAC	120
GTGGTAACGC TTGCCTCATC ACCTACGCTA TGGCCGGAAT CGGCAACATC CCTAGAATTG	180
AGTACGTGTG ATCCGGATAA CAACGGCAGT GAATATATCT TCGGTATCGT AAAGATGTGA	240
TATAAGATGA TGTATACCCA ATGAGGAGCG CCTGATCGTG ACCTAGACCT TAGTGGCAAA	300
AACGACATAT CTATTATAGT GGGGAGAGTT TCGTGCAAAT AACAGACGCA GCAGCAAGTA	360
ACTGTGACGA TATCAACTCT TTTTTTATTA TGTAATAAGC AAACAAGCAC GAATGGGGAA	420
AGCCTATGTG CAATCACCAA GGTCGTCCCT TTTTCCCAT TTGCTAATTT AGAATTTAAA	480
GAAACCAAAA GAATGAAGAA AGAAAACAA TACTAGCCCT AACCTGACT TCGTTTCTAT	540
GATAATACCC TGCTTTAATG AACGGTATGC CCTAGGGTAT ATCTCACTCT GTACGTTACA	600
AACTCCGGTT ATTTTATCGG AACATCCGAG CACCCGCGCC TTCCTCAACC CAGGCACCGC	660
CCCAGGTAAC CGTGCGCGAT GAGCTAATCC TGAGCCATCA CCCACCCAC CCGTTGATGA	720
CAGCAATTCTG GGAGGGCGAA AATAAACTG GAGCAAGGAA TTACCATCAC CGTCACCATC	780
ACCATCATAT CGCCTTAGCC TCTAGCCATA GCCATCATGC AAGCGTGTAT CTTCTAAGAT	840
TCAGTCATCA TCATTACCGA GTTTGTTTTT CTTACATGA TGAAGAAGGT TTGAGTATGC	900
TCGAAACAAT AAGACGACGA TGGCTCTGCC ATTGGTTATA TTACGCTTTT GCGGCGAGGT	960
GCCGATGGGT TGCTGAGGGG AAGAGTGTTT AGCTTACGGA CCTATTGCCA TTGTTATTCC	1020
GATTAATCTA TTGTTACGCA GCTCTTCTCT ACCCTGTCAT TCTAGTATTT TTTTTTTTTT	1080
TTTTTGTTTT TACTTTTTTT TCTTCTTGCC TTTTTTCTT GTTACTTTTT TTCTAGTTTT	1140
TTTTCCCTCC ACTAAGCTTT TTCCTTGATT TATCCTTGGG TTCTTCTTTC TACTCCTTTA	1200
GATTTTTTTT TTATATATTA ATTTTAAAGT TTATGTATTT TGGTAGATTC AATTCTCTTT	1260
CCCTTTCCTT TTCCTTCGCT CCCCTTCCTT ATCAATGCTT GCTGTCAGAA GATTAACAAG	1320
ATACACATTC CTTAAGCGAA CGCATCCGGT GTTATATACT CGTCGTGCAT ATAAAAATTT	1380

10

20

30

GCCTTCAAGA TCTACTTTCC TAAGAAGATC ATTATTACAA ACACAACTGC ACTCAAAGAT 1440
 GACTGCTCAT ACTAATATCA AACAGCACAA ACACTGTCAT GAGGACCATC CTATCAGAAG 1500
 ATCGGACTCT GCCGTGTCAA TTGTACATTT GAAACGTGCG CCCTTCAAGG TTACAGTGAT 1560
 TGGTTCTGGT AACTGGGGGA CCACCATCGC CAAAGTCATT GCGGAAAACA CAGAATTGCA 1620
 TTCCCATATC TTCGAGCCAG AGGTGAGAAT GTGGGTTTTT GATGAAAAGA TCGGCGACGA 1680
 AAATCTGACG GATATCATAA ATACAAGACA CCAGAACGTT AAATATCTAC CCAATATTGA 1740
 CCTGCCCCAT AATCTAGTGG CCGATCCTGA TCTTTTACAC TCCATCAAGG GTGCTGACAT 1800
 CCTTGTTTTT AACATCCCTC ATCAATTTTT ACCAAACATA GTCAAACAAT TGCAAGGCCA 1860
 CGTGGCCCCCT CATGTAAGGG CCATCTCGTG TCTAAAAGGG TTCGAGTTGG GCTCCAAGGG 1920
 TGTGCAATTG CTATCCTCCT ATGTTACTGA TGAGTTAGGA ATCCAATGTG GCGCACTATC 1980
 TGGTGCAAAC TTGGCACCGG AAGTGGCCAA GGAGCATTGG TCCGAAACCA CCGTGGCTTA 2040
 CCAACTACCA AAGGATTATC AAGGTGATGG CAAGGATGTA GATCATAAGA TTTTGAAATT 2100
 GCTGTTCCAC AGACCTTACT TCCACGTCAA TGTCATCGAT GATGTTGCTG GTATATCCAT 2160
 TGCCGGTGCC TTGAAGAACG TCGTGGCACT TGCATGTGGT TTCGTAGAAG GTATGGGATG 2220
 GGGTAACAAT GCCTCCGCAG CCATTCAAAG GCTGGGTTTA GGTGAAATTA TCAAGTTCGG 2280
 TAGAATGTTT TTCCCAGAAT CCAAAGTCGA GACCTACTAT CAAGAATCCG CTGGTGTTCG 2340
 AGATCTGATC ACCACCTGCT CAGGCGGTAG AAACGTCAAG GTTGCCACAT ACATGGCCAA 2400
 GACCGGTAAG TCAGCCTTGG AAGCAGAAAA GGAATTGCTT AACGGTCAAT CCGCCCAAGG 2460
 GATAATCACA TGCAGAGAAG TTCACGAGTG GCTACAAACA TGTGAGTTGA CCCAAGAATT 2520
 CCCAATTATT CGAGGCAGTC TACCAGATAG TCTACAACAA CGTCCGCATG GAAGACCTAC 2580
 CGGAGATGAT TGAAGAGCTA GACATCGATG ACGAATAGAC ACTCTCCCCC CCCCTCCCCC 2640
 TCTGATCTTT CCTGTTGCCT CTTTTTCCCC CAACCAATTT ATCATTATAC ACAAGTTCTA 2700
 CAACTACTAC TAGTAACATT ACTACAGTTA TTATAATTTT CTATTCTCTT TTTCTTTAAG 2760
 AATCTATCAT TAACGTTAAT TTCTATATAT ACATAACTAC CATTATACAC GCTATTATCG 2820
 TTTACATATC ACATCACCGT TAATGAAAGA TACGACACCC TGTACACTAA CACAATTAAA 2880
 TAATCGCCAT AACCTTTTCT GTTATCTATA GCCCTTAAAG CTGTTTCTTC GAGCTTTTCA 2940
 CTGCAG 2946

10

20

30

40

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 3 1 7 8

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

50

(xi) 配列：配列番号 3：

CTGCAGAACT TCGTCTGCTC TGTGCCCATC CTCGCGGTTA GAAAGAAGCT GAATTGTTTC	60	
ATGCGCAAGG GCATCAGCGA GTGACCAATA ATCACTGCAC TAATTCCTTT TTAGCAACAC	120	
ATACTTATAT ACAGCACCAG ACCTTATGTC TTTTCTCTGC TCCGATACGT TATCCCACCC	180	
AACTTTTATT TCAGTTTGG CAGGGGAAAT TTCACAACCC CGCACGCTAA AAATCGTATT	240	
TAAACTTAAA AGAGAACAGC CACAAATAGG GAACTTTGGT CTAAACGAAG GACTCTCCCT	300	
CCCTTATCTT GACCGTGCTA TTGCCATCAC TGCTACAAGA CTAAATACGT ACTAATATAT	360	10
GTTTTCGGTA ACGAGAAGAA GAGCTGCCGG TGCAGCTGCT GCCATGGCCA CAGCCACGGG	420	
GACGCTGTAC TGGATGACTA GCCAAGGTGA TAGGCCGTTA GTGCACAATG ACCCGAGCTA	480	
CATGGTGCAA TTCCCCACCG CCGCTCCACC GGCAGGTCTC TAGACGAGAC CTGCTGGACC	540	
GTCTGGACAA GACGCATCAA TTCGACGTGT TGATCATCGG TGGCGGGGCC ACGGGGACAG	600	
GATGTGCCCT AGATGCTGCG ACCAGGGGAC TCAATGTGGC CCTTGTGAA AAGGGGGATT	660	
TTGCCTCGGG AACGTCGTCC AAATCTACCA AGATGATTCA CGGTGGGGTG CGGTACTTAG	720	20
AGAAGGCCTT CTGGGAGTTC TCCAAGGCAC AACTGGATCT GGTCATCGAG GCACTCAACG	780	
AGCGTAAACA TCTTATCAAC ACTGCCCTC ACCTGTGCAC GGTGCTACCA ATTCTGATCC	840	
CCATCTACAG CACCTGGCAG GTCCCGTACA TCTATATGGG CTGTAAATTC TACGATTTCT	900	
TTGGCGGTTC CCAAACTTG AAAAAATCAT ACCTACTGTC CAAATCCGCC ACCGTGGAGA	960	
AGGCTCCCAT GCTTACCACA GACAATTTAA AGGCCTCGCT TGTGTACCAT GATGGGTCCCT	1020	
TTAACGACTC GCGTTTGAAC GCCACTTTAG CCATCACGGG TGTGGAGAAC GGCGCTACCG	1080	30
TCTTGATCTA TGTCGAGGTA CAAAAATTGA TCAAAGACCC AACTTCTGGT AAGGTTATCG	1140	
GTGCCGAGGC CCGGGACGTT GAGACTAATG AGCTTGTCAG AATCAACGCT AAATGTGTGG	1200	
TCAATGCCAC GGGCCCATAC AGTGACGCCA TTTTGCAAAT GGACCGCAAC CCATCCGGTC	1260	
TGCCGGACTC CCCGCTAAAC GACAACTCCA AGATCAAGTC GACTTTCAAT CAAATCTCCG	1320	
TCATGGACCC GAAAATGGTC ATCCCATCTA TTGGCGTTCA CATCGTATTG CCCTCTTTTT	1380	
ACTCCCCGAA GGATATGGGT TTGTTGGACG TCAGAACCTC TGATGGCAGA GTGATGTTCT	1440	40
TTTACCTTG GCAGGGCAAA GTCCTTGCCG GCACCACAGA CATCCCACTA AAGCAAGTCC	1500	

CAGAAAACCC TATGCCTACA GAGGCTGATA TTCAAGATAT CTTGAAAGAA CTACAGCACT 1560
 ATATCGAATT CCCCCTGAAA AGAGAAGACG TGCTAAGTGC ATGGGCTGGT GTCAGACCTT 1620
 TGGTCAGAGA TCCACGTACA ATCCCCGCAG ACGGGAAGAA GGGCTCTGCC ACTCAGGGCG 1680
 TGGTAAGATC CCACTTCTTG TTCACTTCGG ATAATGGCCT AATTACTATT GCAGGTGGTA 1740
 AATGGACTAC TTACAGACAA ATGGCTGAGG AAACAGTCGA CAAAGTTGTC GAAGTTGGCG 1800
 GATTCCACAA CCTGAAACCT TGTCACACAA GAGATATTAA GCTTGCTGGT GCAGAAGAAT 1860
 GGACGCAAAA CTATGTGGCT TTATTGGCTC AAAACTACCA TTTATCATCA AAAATGTCCA 1920
 ACTACTTGGT TCAAACTAC GGAACCCGTT CCTCTATCAT TTGCGAATTT TTCAAAGAAT 1980
 CCATGGAAAA TAAACTGCCT TTGTCCTTAG CCGACAAGGA AAATAACGTA ATCTACTCTA 2040
 GCGAGGAGAA CAACTTGGTC AATTTTGATA CTTTCAGATA TCCATTCACA ATCGGTGAGT 2100
 TAAAGTATTC CATGCAGTAC GAATATTGTA GAACTCCCTT GGACTTCCTT TTAAGAAGAA 2160
 CAAGATTCGC CTTCTTGGAC GCCAAGGAAG CTTTGAATGC CGTGCATGCC ACCGTCAAAG 2220
 TTATGGGTGA TGAGTTCAT TGGTCGGAGA AAAAGAGGCA GTGGGAACTT GAAAAAACTG 2280
 TGAAGTTCAT CCAAGGACGT TTCGGTGTCT AAATCGATCA TGATAGTTAA GGGTGACAAA 2340
 GATAACATTC ACAAGAGTAA TAATAATGGT AATGATGATA ATAATAATAA TGATAGTAAT 2400
 AACAATAATA ATAATGGTGG TAATGGCAAT GAAATCGCTA TTATTACCTA TTTTCCTTAA 2460
 TGGAAGAGTT AAAGTAACT AAAAAACTA CAAAAATATA TGAAGAAAAA AAAAAAAGA 2520
 GGTAATAGAC TCTACTACTA CAATTGATCT TCAAATTATG ACCTTCCTAG TGTTTATATT 2580
 CTATTTCCAA TACATAATAT AATCTATATA ATCATTGCTG GTAGACTTCC GTTTTAATAT 2640
 CGTTTTAATT ATCCCCTTTA TCTCTAGTCT AGTTTTATCA TAAATATAG AAACACTAAA 2700
 TAATATTCTT CAAACGGTCC TGGTGCATAC GCAATACATA TTTATGGTGC AAAAAAATA 2760
 ATGGAAAAAT TTGCTAGTCA TAAACCCTTT CATAAAACAA TACGTAGACA TCGCTACTTG 2820
 AAATTTTCAA GTTTTATCA GATCCATGTT TCCTATCTGC CTTGACAACC TCATCGTCGA 2880
 AATAGTACCA TTTAGAACGC CCAATATTCA CATTGTGTTT AAGGTCTTTA TTCACCAGTG 2940
 ACGTGTAATG GCCATGATTA ATGTGCCTGT ATGGTTAACC ACTCCAAATA GCTTATATTT 3000
 CATAGTGTCA TTGTTTTTCA ATATAATGTT TAGTATCAAT GGATATGTTA CGACGGTGTT 3060
 ATTTTTCTTG GTCAAATCGT AATAAAATCT CGATAAATGG ATGACTAAGA TTTTGGTAA 3120
 AGTTACAAAA TTTATCGTTT TCACTGTTGT CAATTTTTTG TTCTTGTAAT CACTCGAG 3178

10

20

30

40

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 816

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

(xi) 配列：配列番号 4：

ATGAAACGTT TCAATGTTTT AAAATATATC AGAACAACAA AAGCAAATAT ACAAACCATC	60	
GCAATGCCTT TGACCACAAA ACCTTTATCT TTGAAAATCA ACGCCGCTCT ATTCGATGTT	120	
GACGGTACCA TCATCATCTC TCAACCAGCC ATTGCTGCTT TCTGGAGAGA TTTCGGTAAA	180	
GACAAGCCTT ACTTCGATGC CGAACACGTT ATTCACATCT CTCACGGTTG GAGAACTTAC	240	
GATGCCATTG CCAAGTTTCG TCCAGACTTT GCTGATGAAG AATACGTTAA CAAGCTAGAA	300	10
GGTGAAATCC CAGAAAAGTA CGGTGAACAC TCCATCGAAG TTCCAGGTGC TGTCAAGTTG	360	
TGTAATGCTT TGAACGCCTT GCCAAAGGAA AAATGGGCTG TCGCCACCTC TGGTACCCGT	420	
GACATGGCCA AGAAATGGTT CGACATTTTG AAGATCAAGA GACCAGAATA CTTTCATCACC	480	
GCCAATGATG TCAAGCAAGG TAAGCCTCAC CCAGAACCAT ACTTAAAGGG TAGAAACGGT	540	
TTGGGTTTCC CAATTAATGA ACAAGACCCA TCCAAATCTA AGGTTGTTGT CTTTGAAGAC	600	
GCACCAGCTG GTATTGCTGC TGGTAAGGCT GCTGGCTGTA AAATCGTTGG TATTGCTACC	660	20
ACTTTCGATT TGGACTTCTT GAAGGAAAAG GGTGTGACA TCATTGTCAA GAACCACGAA	720	
TCTATCAGAG TCGGTGAATA CAACGCTGAA ACCGATGAAG TCGAATTGAT CTTTGATGAC	780	
TACTTATACG CTAAGGATGA CTTGTTGAAA TGGTAA	816	

(2) 配列番号 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：7 5 3

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (ゲノム)

(xi) 配列：配列番号 5：

10

20

30

ATGGGATTGA	CTACTAAACC	TCTATCTTTG	AAAGTTAACG	CCGCTTTGTT	CGACGTCGAC	60
GGTACCATTA	TCATCTCTCA	ACCAGCCATT	GCTGCATTCT	GGAGGGATTT	CGGTAAGGAC	120
AAACCTTATT	TCGATGCTGA	ACACGTTATC	CAAGTCTCGC	ATGTTGGAG	AACGTTTGAT	180
GCCATTGCTA	AGTTCGCTCC	AGACTTTGCC	AATGAAGAGT	ATGTTAACAA	ATTAGAAGCT	240
GAAATTCCGG	TCAAGTACGG	TGAAAAATCC	ATTGAAGTCC	CAGGTGCAGT	TAAGCTGTGC	300
AACGCTTTGA	ACGCTCTACC	AAAAGAGAAA	TGGGCTGTGG	CAACTTCCGG	TACCCGTGAT	360
ATGGCACAAA	AATGGTTCGA	GCATCTGGGA	ATCAGGAGAC	CAAAGTACTT	CATTACCGCT	420
AATGATGTCA	AACAGGGTAA	GCCTCATCCA	GAACCATATC	TGAAGGGCAG	GAATGGCTTA	480
GGATATCCGA	TCAATGAGCA	AGACCCTTCC	AAATCTAAGG	TAGTAGTATT	TGAAGACGCT	540
CCAGCAGGTA	TTGCCGCCGG	AAAAGCCGCC	GTTTGTAAGA	TCATTGGTAT	TGCCACTACT	600
TTGACTTGG	ACTTCCTAAA	GGAAAAAGGC	TGTGACATCA	TTGTCAAAAA	CCACGAATCC	660
ATCAGAGTTG	GCGGCTACAA	TGCCGAAACA	GACGAAGTTG	AATTCATTTT	TGACGACTAC	720
TTATATGCTA	AGGACGATCT	GTTGAAATGG	TAA			753

10

20

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2 5 2 0

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (ゲノム)

(xi) 配列: 配列番号6:

TGTATTGGCC	ACGATAACCA	CCCTTTGTAT	ACTGTTTTTG	TTTTTCACAT	GGTAAATAAC	60
GACTTTTATT	AAACAACGTA	TGTAAAAACA	TAACAAGAAT	CTACCCATAC	AGGCCATTTT	120
GTAATTCTTC	TCTTCTAATT	GGAGTAAAAC	CATCAATTAA	AGGGTGTGGA	GTAGCATAGT	180
GAGGGGCTGA	CTGCATTGAC	AAAAAAATTG	AAAAAATAAA	AGGAAAAGGA	AAGGAAAAAA	240
AGACAGCCAA	GACTTTTAGA	ACGGATAAGG	TGTAATAAAA	TGTGGGGGGA	TGCCTGTTCT	300
CGAACCATAT	AAAATATACC	ATGTGGTTTG	AGTTGTGGCC	GGAACATATC	AAATAGTTAT	360
ATGTTTCCCT	CTCTCTTCCG	ACTTGTAGTA	TTCTCCAAAC	GTTACATATT	CCGATCAAGC	420
CAGCGCCTTT	ACACTAGTTT	AAAACAAGAA	CAGAGCCGTA	TGTCCAAAAT	AATGGAAGAT	480
TTACGAAGTG	ACTACGTCCC	GCTTATCGCC	AGTATTGATG	TAGGAACGAC	CTCATCCAGA	540
TGCATTCTGT	TCAACAGATG	GGGCCAGGAC	GTTTCAAAAC	ACCAAATTGA	ATATTCAACT	600
TCAGCATCGA	AGGGCAAGAT	TGGGGTGTCT	GGCCTAAGGA	GACCCTCTAC	AGCCCCAGCT	660
CGTGAAACAC	CAAACGCCGG	TGACATCAAA	ACCAGCGGAA	AGCCCATCTT	TTCTGCAGAA	720
GGCTATGCCA	TTCAAGAAAC	CAAATTCCTA	AAAATCGAGG	AATTGGACTT	GGAATTCCAT	780

30

40

50

AACGAACCCA CGTTGAAGTT CCCCAAACCG GGTGGGTTG AGTGCCATCC GCAGAAATTA	840
CTGGTGAACG TCGTCCAATG CCTGCTCA AGTTTGCTCT CTCTGCAGAC TATCAACAGC	900
GAACGTGTAG CAAACGGTCT CCCACCTTAC AAGGTAATAT GCATGGGTAT AGCAAACATG	960
AGAGAAACCA CAATTCTGTG GTCCCGCCGC ACAGGAAAAC CAATTGTTAA CTACGGTATT	1020
GTTTGAACG ACACCAGAAC GATCAAAATC GTTAGAGACA AATGGCAAAA CACTAGCGTC	1080
GATAGGCAAC TGCAGCTTAG ACAGAAGACT GGATTGCCAT TGCTCTCCAC GTATTTCTCC	1140
TGTTCCAAGC TGCCTGGTT CCTCGACAAT GAGCCTCTGT GTACCAAGGC GTATGAGGAG	1200
AACGACCTGA TGTTCGGCAC TGTGGACACA TGGCTGATTT ACCAATTAAC TAAACAAAAG	1260
GCGTTCGTTT CTGACGTAAC CAACGCTTCC AGAACTGGAT TTATGAACCT CTCCACTTTA	1320
AAGTACGACA ACGAGTTGCT GGAATTTTGG GGTATTGACA AGAACCTGAT TCACATGCCC	1380
GAAATTGTGT CCTCATCTCA ATACTACGGT GACTTTGGCA TTCCTGATTG GATAATGGAA	1440
AAGCTACACG ATTCGCCAAA AACAGTACTG CGAGATCTAG TCAAGAGAAA CCTGCCCATA	1500
CAGGGCTGTC TGGGCGACCA AAGCGCATCC ATGGTGGGGC AACTCGCTTA CAAACCCGGT	1560
GCTGCAAAAT GTACTTATGG TACCGTTGC TTTTACTGT ACAATACGGG GACCAAAAAA	1620
TTGATCTCCC AACATGGCGC ACTGACGACT CTAGCATTTT GGTTCCACA TTTGCAAGAG	1680
TACGGTGGCC AAAAACCAGA ATTGAGCAAG CCACATTTTG CATTAGAGGG TTCCGTCGCT	1740
GTGGCTGGTG CTGTGGTCCA ATGGCTACGT GATAATTTAC GATTGATCGA TAAATCAGAG	1800
GATGTCGGAC CGATTGCATC TACGGTTCCT GATTCTGGTG GCGTAGTTTT CGTCCCCGCA	1860
TTTAGTGGCC TATTCGCTCC CTATTGGGAC CCAGATGCCA GAGCCACCAT AATGGGGATG	1920
TCTCAATTCA CTACTGCCTC CCACATCGCC AGAGCTGCCG TGAAGGTGT TTGCTTTCAA	1980
GCCAGGGCTA TCTGAAGGC AATGAGTTCT GACGCGTTTG GTGAAGGTTT CAAAGACAGG	2040
GACTTTTTAG AGGAAATTTT CGACGTCACA TATGAAAAGT CGCCCCTGTC GGTCTGGCA	2100
GTGGATGGCG GGATGTCGAG GTCTAATGAA GTCATGCAAA TTCAAGCCGA TATCCTAGGT	2160
CCCTGTGTCA AAGTCAGAAG GTCTCCGACA GCGGAATGTA CCGCATTGGG GGCAGCCATT	2220
GCAGCCAATA TGGCTTTCAA GGATGTGAAC GAGCGCCCAT TATGGAAGGA CCTACACGAT	2280
GTTAAGAAAT GGGTCTTTTA CAATGGAATG GAGAAAAACG AACAAATATC ACCAGAGGCT	2340
CATCCAAACC TTAAGATATT CAGAAGTGAA TCCGACGATG CTGAAAGGAG AAAGCATTGG	2400
AAGTATTGGG AAGTTGCCGT GGAAAGATCC AAAGTTGGC TGAAGGACAT AGAAGGTGAA	2460
CACGAACAGG TTCTAGAAAA CTTCCAATAA CAACATAAAT AATTTCTATT AACAAATGTAA	2520

10

20

30

40

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 391

50

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：未知

(D) トポロジー：未知

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号 7：

Met	Ser	Ala	Ala	Ala	Asp	Arg	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Gly	His	Leu	Asn	
1				5					10					15		
Ala	Gly	Arg	Lys	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Lys	Ala	Ala	Glu	
			20					25					30			
Lys	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Asn	Trp	Gly	Thr	Thr	10
		35					40				45					
Ile	Ala	Lys	Val	Val	Ala	Glu	Asn	Cys	Lys	Gly	Tyr	Pro	Glu	Val	Phe	
	50					55					60					
Ala	Pro	Ile	Val	Gln	Met	Trp	Val	Phe	Glu	Glu	Glu	Ile	Asn	Gly	Glu	
65					70				75						80	
Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Asn	Thr	Arg	His	Gln	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	
			85				90						95			
Pro	Gly	Ile	Thr	Leu	Pro	Asp	Asn	Leu	Val	Ala	Asn	Pro	Asp	Leu	Ile	20
			100				105					110				
Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Val	Asp	Ile	Ile	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	His	Gln	
		115					120				125					
Phe	Leu	Pro	Arg	Ile	Cys	Ser	Gln	Leu	Lys	Gly	His	Val	Asp	Ser	His	
	130					135					140					
Val	Arg	Ala	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Ala	Lys	Gly	
145					150				155						160	
Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	30
			165					170					175			
Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	His	
		180					185						190			
Trp	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Phe	Arg	Gly	
		195					200					205				
Glu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	His	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Arg	
	210					215					220					
Pro	Tyr	Phe	His	Val	Ser	Val	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Ile	40
225					230					235					240	

20

- 30

40

Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
 85 90 95
 Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
 100 105 110
 Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
 115 120 125
 Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
 130 135 140
 His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln
 165 170 175
 Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu
 180 185 190
 His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln
 195 200 205
 Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His
 210 215 220
 Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val
 245 250 255
 Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu
 260 265 270
 Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser
 275 280 285
 Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile
 290 295 300
 Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly
 325 330 335
 Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu
 340 345 350
 Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu
 355 360 365
 Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp
 370 375 380

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 614

(B) 配列の型: アミノ酸

10

20

30

40

50

(xi) 配列：配列番号 9：

[illegible]

40

Leu Lys Tyr Ser Met Gln Tyr Glu Tyr Cys Arg Thr Pro Leu Asp Phe
545 550 555 560

Leu Leu Arg Arg Thr Arg Phe Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Ala Leu
565 570 575

Asn Ala Val His Ala Thr Val Lys Val Met Gly Asp Glu Phe Asn Trp
580 585 590

Ser Glu Lys Lys Arg Gln Trp Glu Leu Glu Lys Thr Val Asn Phe Ile
595 600 605

Gln Gly Arg Phe Gly Val
610

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 399

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未知

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号10:

Met Asn Gln Arg Asn Ala Ser Met Thr Val Ile Gly Ala Gly Ser Tyr
1 5 10 15

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

Leu Trp Gly His Asp Pro Glu His Ile Ala Thr Leu Glu Arg Asp Arg
35 40 45

Cys Asn Ala Ala Phe Leu Pro Asp Val Pro Phe Pro Asp Thr Leu His
50 55 60

Leu Glu Ser Asp Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ala Ser Arg Asn Ile Leu
65 70 75 80

Val Val Val Pro Ser His Val Phe Gly Glu Val Leu Arg Gln Ile Lys
85 90 95

Pro Leu Met Arg Pro Asp Ala Arg Leu Val Trp Ala Thr Lys Gly Leu
100 105 110

Glu Ala Glu Thr Gly Arg Leu Leu Gln Asp Val Ala Arg Glu Ala Leu
115 120 125

Gly Asp Gln Ile Pro Leu Ala Val Ile Ser Gly Pro Thr Phe Ala Lys
130 135 140

Glu Leu Ala Ala Gly Leu Pro Thr Ala Ile Ser Leu Ala Ser Thr Asp
145 150 155 160

10

20

30

40

Gln Thr Phe Ala Asp Asp Leu Gln Gln Leu Leu His Cys Gly Lys Ser
 165 170 175

Phe Arg Val Tyr Ser Asn Pro Asp Phe Ile Gly Val Gln Leu Gly Gly
 180 185 190

Ala Val Lys Asn Val Ile Ala Ile Gly Ala Gly Met Ser Asp Gly Ile
 195 200 205

Gly Phe Gly Ala Asn Ala Arg Thr Ala Leu Ile Thr Arg Gly Leu Ala
 210 215 220

Glu Met Ser Arg Leu Gly Ala Ala Leu Gly Ala Asp Pro Ala Thr Phe
 225 230 235 240

Met Gly Met Ala Gly Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Cys Thr Asp Asn
 245 250 255

Gln Ser Arg Asn Arg Arg Phe Gly Met Met Leu Gly Gln Gly Met Asp
 260 265 270

Val Gln Ser Ala Gln Glu Lys Ile Gly Gln Val Val Glu Gly Tyr Arg
 275 280 285

Asn Thr Lys Glu Val Arg Glu Leu Ala His Arg Phe Gly Val Glu Met
 290 295 300

Pro Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Gln Val Leu Tyr Cys Gly Lys Asn Ala
 305 310 315 320

Arg Glu Ala Ala Leu Thr Leu Leu Gly Arg Ala Arg Lys Asp Glu Arg
 325 330 335

Ser Ser His

(2) 配列番号 11 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 501

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未知

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 11:

Met Glu Thr Lys Asp Leu Ile Val Ile Gly Gly Gly Ile Asn Gly Ala
 1 5 10 15

Gly Ile Ala Ala Asp Ala Ala Gly Arg Gly Leu Ser Val Leu Met Leu
 20 25 30

Glu Ala Gln Asp Leu Ala Cys Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ser Lys Leu
 35 40 45

Ile His Gly Gly Leu Arg Tyr Leu Glu His Tyr Glu Phe Arg Leu Val
 50 55 60

10

20

30

40

Ser Glu Ala Leu Ala Glu Arg Glu Val Leu Leu Lys Met Ala Pro His
 65 70 75 80
 Ile Ala Phe Pro Met Arg Phe Arg Leu Pro His Arg Pro His Leu Arg
 85 90 95
 Pro Ala Trp Met Ile Arg Ile Gly Leu Phe Met Tyr Asp His Leu Gly
 100 105 110
 Lys Arg Thr Ser Leu Pro Gly Ser Thr Gly Leu Arg Phe Gly Ala Asn
 115 120 125
 Ser Val Leu Lys Pro Glu Ile Lys Arg Gly Phe Glu Tyr Ser Asp Cys
 130 135 140
 Trp Val Asp Asp Ala Arg Leu Val Leu Ala Asn Ala Gln Met Val Val
 145 150 155 160
 Arg Lys Gly Gly Glu Val Leu Thr Arg Thr Arg Ala Thr Ser Ala Arg
 165 170 175
 Arg Glu Asn Gly Leu Trp Ile Val Glu Ala Glu Asp Ile Asp Thr Gly
 180 185 190
 Lys Lys Tyr Ser Trp Gln Ala Arg Gly Leu Val Asn Ala Thr Gly Pro
 195 200 205
 Trp Val Lys Gln Phe Phe Asp Asp Gly Met His Leu Pro Ser Pro Tyr
 210 215 220
 Gly Ile Arg Leu Ile Lys Gly Ser His Ile Val Val Pro Arg Val His
 225 230 235 240
 Thr Gln Lys Gln Ala Tyr Ile Leu Gln Asn Glu Asp Lys Arg Ile Val
 245 250 255
 Phe Val Ile Pro Trp Met Asp Glu Phe Ser Ile Ile Gly Thr Thr Asp
 260 265 270
 Val Glu Tyr Lys Gly Asp Pro Lys Ala Val Lys Ile Glu Glu Ser Glu
 275 280 285
 Ile Asn Tyr Leu Leu Asn Val Tyr Asn Thr His Phe Lys Lys Gln Leu
 290 295 300
 Ser Arg Asp Asp Ile Val Trp Thr Tyr Ser Gly Val Arg Pro Leu Cys
 305 310 315 320
 Asp Asp Glu Ser Asp Ser Pro Gln Ala Ile Thr Arg Asp Tyr Thr Leu
 325 330 335
 Asp Ile His Asp Glu Asn Gly Lys Ala Pro Leu Leu Ser Val Phe Gly
 340 345 350
 Gly Lys Leu Thr Thr Tyr Arg Lys Leu Ala Glu His Ala Leu Glu Lys
 355 360 365

10

20

30

40

Leu Thr Pro Tyr Tyr Gln Gly Ile Gly Pro Ala Trp Thr Lys Glu Ser
 370 375 380
 Val Leu Pro Gly Gly Ala Ile Glu Gly Asp Arg Asp Asp Tyr Ala Ala
 385 390 395 400
 Arg Leu Arg Arg Arg Tyr Pro Phe Leu Thr Glu Ser Leu Ala Arg His
 405 410 415
 Tyr Ala Arg Thr Tyr Gly Ser Asn Ser Glu Leu Leu Leu Gly Asn Ala
 420 425 430
 Gly Thr Val Ser Asp Leu Gly Glu Asp Phe Gly His Glu Phe Tyr Glu
 435 440 445
 Ala Glu Leu Lys Tyr Leu Val Asp His Glu Trp Val Arg Arg Ala Asp
 450 455 460
 Asp Ala Leu Trp Arg Arg Thr Lys Gln Gly Met Trp Leu Asn Ala Asp
 465 470 475 480
 Gln Gln Ser Arg Val Ser Gln Trp Leu Val Glu Tyr Thr Gln Gln Arg
 485 490 495
 Leu Ser Leu Ala Ser
 500

10

20

(2) 配列番号 1 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 5 4 2

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未知

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 1 2:

Met Lys Thr Arg Asp Ser Gln Ser Ser Asp Val Ile Ile Ile Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Gly Ala Gly Ile Ala Arg Asp Cys Ala Leu Arg Gly Leu
 20 25 30
 Arg Val Ile Leu Val Glu Arg His Asp Ile Ala Thr Gly Ala Thr Gly
 35 40 45
 Arg Asn His Gly Leu Leu His Ser Gly Ala Arg Tyr Ala Val Thr Asp
 50 55 60
 Ala Glu Ser Ala Arg Glu Cys Ile Ser Glu Asn Gln Ile Leu Lys Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala Arg His Cys Val Glu Pro Thr Asn Gly Leu Phe Ile Thr Leu
 85 90 95

30

40

Pro Glu Asp Asp Leu Ser Phe Gln Ala Thr Phe Ile Arg Ala Cys Glu
 100 105 110
 Glu Ala Gly Ile Ser Ala Glu Ala Ile Asp Pro Gln Gln Ala Arg Ile
 115 120 125
 Ile Glu Pro Ala Val Asn Pro Ala Leu Ile Gly Ala Val Lys Val Pro
 130 135 140
 Asp Gly Thr Val Asp Pro Phe Arg Leu Thr Ala Ala Asn Met Leu Asp
 145 150 155 160
 Ala Lys Glu His Gly Ala Val Ile Leu Thr Ala His Glu Val Thr Gly
 165 170 175
 Leu Ile Arg Glu Gly Ala Thr Val Cys Gly Val Arg Val Arg Asn His
 180 185 190
 Leu Thr Gly Glu Thr Gln Ala Leu His Ala Pro Val Val Val Asn Ala
 195 200 205
 Ala Gly Ile Trp Gly Gln His Ile Ala Glu Tyr Ala Asp Leu Arg Ile
 210 215 220
 Arg Met Phe Pro Ala Lys Gly Ser Leu Leu Ile Met Asp His Arg Ile
 225 230 235 240
 Asn Gln His Val Ile Asn Arg Cys Arg Lys Pro Ser Asp Ala Asp Ile
 245 250 255
 Leu Val Pro Gly Asp Thr Ile Ser Leu Ile Gly Thr Thr Ser Leu Arg
 260 265 270
 Ile Asp Tyr Asn Glu Ile Asp Asp Asn Arg Val Thr Ala Glu Glu Val
 275 280 285
 Asp Ile Leu Leu Arg Glu Gly Glu Lys Leu Ala Pro Val Met Ala Lys
 290 295 300
 Thr Arg Ile Leu Arg Ala Tyr Ser Gly Val Arg Pro Leu Val Ala Ser
 305 310 315 320
 Asp Asp Asp Pro Ser Gly Arg Asn Leu Ser Arg Gly Ile Val Leu Leu
 325 330 335
 Asp His Ala Glu Arg Asp Gly Leu Asp Gly Phe Ile Thr Ile Thr Gly
 340 345 350
 Gly Lys Leu Met Thr Tyr Arg Leu Met Ala Glu Trp Ala Thr Asp Ala
 355 360 365
 Val Cys Arg Lys Leu Gly Asn Thr Arg Pro Cys Thr Thr Ala Asp Leu
 370 375 380
 Ala Leu Pro Gly Ser Gln Glu Pro Ala Glu Val Thr Leu Arg Lys Val
 385 390 395 400

10

20

30

40

Ile Ser Leu Pro Ala Pro Leu Arg Gly Ser Ala Val Tyr Arg His Gly
 405 410 415
 Asp Arg Thr Pro Ala Trp Leu Ser Glu Gly Arg Leu His Arg Ser Leu
 420 425 430
 Val Cys Glu Cys Glu Ala Val Thr Ala Gly Glu Val Gln Tyr Ala Val
 435 440 445
 Glu Asn Leu Asn Val Asn Ser Leu Leu Asp Leu Arg Arg Arg Thr Arg
 450 455 460
 Val Gly Met Gly Thr Cys Gln Gly Glu Leu Cys Ala Cys Arg Ala Ala
 465 470 475 480
 Gly Leu Leu Gln Arg Phe Asn Val Thr Thr Ser Ala Gln Ser Ile Glu
 485 490 495
 Gln Leu Ser Thr Phe Leu Asn Glu Arg Trp Lys Gly Val Gln Pro Ile
 500 505 510
 Ala Trp Gly Asp Ala Leu Arg Glu Ser Glu Phe Thr Arg Trp Val Tyr
 515 520 525
 Gln Gly Leu Cys Gly Leu Glu Lys Glu Gln Lys Asp Ala Leu
 530 535 540

10

20

- (2) 配列番号 13 の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：250
- (B) 配列の型：アミノ酸
- (C) 鎖の数：未知
- (D) トポロジー：未知
- (ii) 配列の種類：タンパク質
- (xi) 配列：配列番号 13：

30

Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
 20 25 30
 Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
 35 40 45
 Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
 50 55 60
 Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
 85 90 95
 Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
 100 105 110
 Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His
 115 120 125
 Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys
 130 135 140
 Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
 165 170 175
 Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys
 180 185 190
 Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu
 195 200 205
 Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
 245 250

10

20

30

(2) 配列番号14の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 271

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 未知

(D) トポロジー: 未知

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号14:

40

Met Lys Arg Phe Asn Val Leu Lys Tyr Ile Arg Thr Thr Lys Ala Asn
 1 5 10 15
 Ile Gln Thr Ile Ala Met Pro Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys
 20 25 30
 Ile Asn Ala Ala Leu Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln
 35 40 45
 Pro Ala Ile Ala Ala Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr
 50 55 60
 Phe Asp Ala Glu His Val Ile His Ile Ser His Gly Trp Arg Thr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Ala Ile Ala Lys Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asp Glu Glu Tyr Val
 85 90 95
 Asn Lys Leu Glu Gly Glu Ile Pro Glu Lys Tyr Gly Glu His Ser Ile
 100 105 110
 Glu Val Pro Gly Ala Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro
 115 120 125
 Lys Glu Lys Trp Ala Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Lys
 130 135 140
 Lys Trp Phe Asp Ile Leu Lys Ile Lys Arg Pro Glu Tyr Phe Ile Thr
 145 150 155 160
 Ala Asn Asp Val Lys Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys
 165 170 175
 Gly Arg Asn Gly Leu Gly Phe Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys
 180 185 190
 Ser Lys Val Val Val Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly
 195 200 205
 Lys Ala Ala Gly Cys Lys Ile Val Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu
 210 215 220
 Asp Phe Leu Lys Glu Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Val Gly Glu Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu
 245 250 255
 Ile Phe Asp Asp Tyr Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
 260 265 270

10

20

30

40

(2) 配列番号 15 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：709

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：未知

(D) トポロジー：未知

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号 15：

Met Phe Pro Ser Leu Phe Arg Leu Val Val Phe Ser Lys Arg Tyr Ile
1 5 10 15
Phe Arg Ser Ser Gln Arg Leu Tyr Thr Ser Leu Lys Gln Glu Gln Ser
20 25 30
Arg Met Ser Lys Ile Met Glu Asp Leu Arg Ser Asp Tyr Val Pro Leu
35 40 45

Ile Ala Ser Ile Asp Val Gly Thr Thr Ser Ser Arg Cys Ile Leu Phe
 50 55 60
 Asn Arg Trp Gly Gln Asp Val Ser Lys His Gln Ile Glu Tyr Ser Thr
 65 70 75 80
 Ser Ala Ser Lys Gly Lys Ile Gly Val Ser Gly Leu Arg Arg Pro Ser
 85 90 95
 Thr Ala Pro Ala Arg Glu Thr Pro Asn Ala Gly Asp Ile Lys Thr Ser
 100 105 110
 Gly Lys Pro Ile Phe Ser Ala Glu Gly Tyr Ala Ile Gln Glu Thr Lys
 115 120 125
 Phe Leu Lys Ile Glu Glu Leu Asp Leu Asp Phe His Asn Glu Pro Thr
 130 135 140
 Leu Lys Phe Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu Cys His Pro Gln Lys Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Asn Val Val Gln Cys Leu Ala Ser Ser Leu Leu Ser Leu Gln
 165 170 175
 Thr Ile Asn Ser Glu Arg Val Ala Asn Gly Leu Pro Pro Tyr Lys Val
 180 185 190
 Ile Cys Met Gly Ile Ala Asn Met Arg Glu Thr Thr Ile Leu Trp Ser
 195 200 205
 Arg Arg Thr Gly Lys Pro Ile Val Asn Tyr Gly Ile Val Trp Asn Asp
 210 215 220
 Thr Arg Thr Ile Lys Ile Val Arg Asp Lys Trp Gln Asn Thr Ser Val
 225 230 235 240
 Asp Arg Gln Leu Gln Leu Arg Gln Lys Thr Gly Leu Pro Leu Leu Ser
 245 250 255
 Thr Tyr Phe Ser Cys Ser Lys Leu Arg Trp Phe Leu Asp Asn Glu Pro
 260 265 270
 Leu Cys Thr Lys Ala Tyr Glu Glu Asn Asp Leu Met Phe Gly Thr Val
 275 280 285
 Asp Thr Trp Leu Ile Tyr Gln Leu Thr Lys Gln Lys Ala Phe Val Ser
 290 295 300
 Asp Val Thr Asn Ala Ser Arg Thr Gly Phe Met Asn Leu Ser Thr Leu
 305 310 315 320
 Lys Tyr Asp Asn Glu Leu Leu Glu Phe Trp Gly Ile Asp Lys Asn Leu
 325 330 335
 Ile His Met Pro Glu Ile Val Ser Ser Ser Gln Tyr Tyr Gly Asp Phe
 340 345 350

10

20

30

40

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

10

20

30

40

Ser Pro Glu Ala His Pro Asn Leu Lys Ile Phe Arg Ser Glu Ser Asp
 660 665 670

Asp Ala Glu Arg Arg Lys His Trp Lys Tyr Trp Glu Val Ala Val Glu
 675 680 685

Arg Ser Lys Gly Trp Leu Lys Asp Ile Glu Gly Glu His Glu Gln Val
 690 695 700

Leu Glu Asn Phe Gln
 705

(2) 配列番号 16 の情報 :

10

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 51

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (ゲノム)

(xi) 配列 : 配列番号 16 :

GCGCGGATCC AGGAGTCTAG AATTATGGGA TTGACTACTA AACCTCTATC T 51

(2) 配列番号 17 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 配列の長さ : 36

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (ゲノム)

(xi) 配列 : 配列番号 17 :

GATACGCCCCG GGTTACCATT TCAACAGATC GTCCTT 36

(2) 配列番号 18 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 34

30

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (ゲノム)

(xi) 配列 : 配列番号 18 :

TTGATAATAT AACCATGGCT GCTGCTGCTG ATAG 34

(2) 配列番号 19 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 39

40

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (ゲノム)

(xi) 配列 : 配列番号 19 :

GTATGATATG TTATCTTGGG TCCAATAAAT CTAATCTTC 39

(2) 配列番号 20 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 24

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

50

- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA（ゲノム）
- (xi) 配列：配列番号 20：
CATGACTAGT AAGGAGGACA ATTC 24
- (2) 配列番号 21 の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：24
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状 10
- (ii) 配列の種類：DNA（ゲノム）
- (xi) 配列：配列番号 21：
CATGGAATTG TCCTCCTTAC TAGT 24
- (2) 配列番号 22 の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：19
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA（ゲノム） 20
- (xi) 配列：配列番号 22：
CTAGTAAGGA GGACAATTC 19
- (2) 配列番号 23 の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：19
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：DNA（ゲノム）
- (xi) 配列：配列番号 23：
CATGGAATTG TCCTCCTTA 19
- (2) 配列番号 24 の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：15
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：他の核酸プライマー
- (iii) ハイポセティカル：NO
- (iv) アンチセンス：NO 40
- (xi) 配列：配列番号 24：
GATCCAGGAA ACAGA 15
- (2) 配列番号 25 の情報：
- (i) 配列の特徴：
- (A) 配列の長さ：15
- (B) 配列の型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：他の核酸プライマー
- (iii) ハイポセティカル：NO 50

(iv) アンチセンス : NO

(xi) 配列 : 配列番号 25 :

CTAGTCTGTT TCCTG

15

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>3</u> , line s <u>21 and 22</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 US	
Date of deposit 26 September 1996	Accession Number 98187
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>3</u> , lines <u>21 and 22</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 US	
Date of deposit 06 November 1996	Accession Number 98248
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Empty box for Designated States	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
Empty box for separate furnishing of indications	

For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer
---	--

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	9/04 (2006.01)	C 1 2 N	9/04 C
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16 B
C 1 2 R	1/19 (2006.01)	C 1 2 P	7/20
C 1 2 R	1/22 (2006.01)	C 1 2 R	1:19
C 1 2 R	1/225 (2006.01)	C 1 2 P	7/20
C 1 2 R	1/38 (2006.01)	C 1 2 R	1:22
C 1 2 R	1/42 (2006.01)	C 1 2 P	7/20
C 1 2 R	1/465 (2006.01)	C 1 2 R	1:225
C 1 2 R	1/66 (2006.01)	C 1 2 P	7/20
C 1 2 R	1/78 (2006.01)	C 1 2 R	1:38
C 1 2 R	1/72 (2006.01)	C 1 2 P	7/20
C 1 2 R	1/785 (2006.01)	C 1 2 R	1:42
C 1 2 R	1/84 (2006.01)	C 1 2 P	7/20
C 1 2 R	1/85 (2006.01)	C 1 2 R	1:465
		C 1 2 P	7/20
		C 1 2 R	1:66
		C 1 2 P	7/20
		C 1 2 R	1:78
		C 1 2 P	7/20
		C 1 2 R	1:72
		C 1 2 P	7/20
		C 1 2 R	1:785
		C 1 2 P	7/20
		C 1 2 R	1:84
		C 1 2 P	7/20
		C 1 2 R	1:85

(74)代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男

(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007
弁理士 平山 孝二

(74)代理人 100137626
弁理士 田代 玄

(72)発明者 ブルトフォイス, ベン・エイ
オランダ・エヌエルー 2 3 0 0 エイジー ライデン・ポストブス 2 5 1・アインスタインベーク 1
0 1

(72)発明者 ゲイトンビー, アンソニー・アーサー
アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 2 ウイルミントン・ベイナードブルバード 2 3 0 9

(72)発明者 ヘイニイ, シヤロン・ロレッタ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 2 3 フィラデルフィア・ノースランドルフストリート 9 6
3

- (72)発明者 フス, アミイ・クアングーフア
アメリカ合衆国カリフォルニア州94065レッドウッドシティ・キールソンサークル528
- (72)発明者 ラロウ, リチャード・デイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94043マウンテンビュー・イージストリート197エイ

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 Mol. Microbiol., 1993年, vol.10, no.5, p.1101-1111
J. Bacteriol., 1994年, vol.176, no.22, p.7091-7095
J. Biol. Chem., 1996年 6月, vol.271, no.23, p.13875-13881
Mol. Gen. Genet., 1995年, vol.249, no.2, p.127-138

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 90
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed