

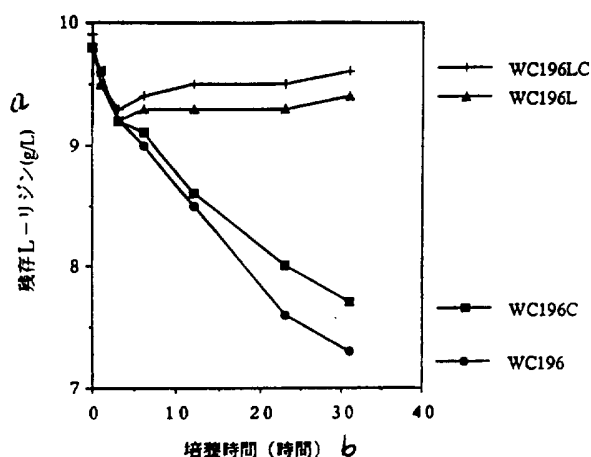


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, 9/88	A1	(11) 国際公開番号 WO96/17930 (43) 国際公開日 1996年6月13日(13.06.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/02481 (22) 国際出願日 1995年12月5日(05.12.95) (30) 優先権データ 特願平6/306386 1994年12月9日(09.12.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 菊池慶実(KIKUCHI, Yoshimi)[JP/JP] 鈴木智子(SUZUKI, Tomoko)[JP/JP] 児島宏之(KOJIMA, Hiroyuki)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, PL, RU, SK, US, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : NOVEL LYSINE DECARBOXYLASE GENE AND PROCESS FOR PRODUCING L-LYSINE

(54) 発明の名称 新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子及びL-リジンの製造法



a ... Residual L-lysine (g/L)
 b ... Incubation time (hr.)

(57) Abstract

L-lysine is efficiently produced by incubating a microorganism belonging to the genus *Escherichia* in which the activity of lysine decarboxylase participating in the decomposition of L-lysine has been declined or deleted, for example, a bacterium of the genus *Escherichia* in which the expression of a novel gene coding for lysine decarboxylase and/or a known gene *cadA* has been suppressed, and harvesting the L-lysine thus formed and accumulated in the culture medium.

(57) 要約

L-リジンの分解に関与するリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられているエシェリヒア属に属する微生物、例えばリジンデカルボキシラーゼをコードする新規遺伝子及び／または既知の遺伝子 *cadA* の発現を抑えたエシェリヒア属細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-リジンを生成蓄積せしめ、これを採取することにより、効率よくL-リジンを生産する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボワール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	US	米国
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ					VN	ヴェトナム

- 1 -

明細書

新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子及びL-リジンの製造法

技術分野

本発明は、L-リジンの分解に関与するエシェリヒア・コリの新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子、当該遺伝子及び／またはcadA遺伝子として知られている他のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現が抑えられているエシェリヒア属に属する微生物、及び該微生物を用いたL-リジンの製造法に関する。近年、L-リジンは、飼料添加物として需要が急増している。

背景技術

エシェリヒア・コリのL-リジン分解酵素として、L-リジンの脱炭酸によりカダベリンを生成する反応を触媒するリジンデカルボキシラーゼが知られており、cadAと呼ばれるその遺伝子の塩基配列及び該遺伝子がコードするアミノ酸配列は既に報告されている(Meng, S and Bennett, G.N., J. Bacteriol., 174, 2659 (1992))。また、エシェリヒア・コリのcadA以外の遺伝子によりコードされるリジンデカルボキシラーゼについては、エシェリヒア・コリの変異株において微弱な活性が検出されたという報告が2つある(Goldenberg, S.H., J. Bacteriol., 141, 1428 (1980); Wertheimer, S.J. and Leifer, Z., Biochem. Biophys. Res. Commun., 114, 882 (1983))。しかしながら、この活性についてはGoldenberg, S.H.が60℃、4分間の熱処理により酵素活性が30%ほど低下すると報告しているのに対し、Wertheimer, S.J.らはそのような現象は認められないと報告しており、第二のリジンデカルボキシラーゼの存在については確かでない。

一方、エシェリヒア・コリを用いたL-リジンの製造方法として、リジンアナログに耐性な変異株またはL-リジンの生合成に関与する遺伝情報を担うデオキシリボ核酸を組み込んだベクターを保有する組換え株を培養する方法が知られている(特開昭56-18596号公報)。しかしながら、リジンデカルボキシラーゼの遺伝子の発現が抑えられたエシェリヒア属微生物を用いたL-リジン生産

についての報告は全くない。

発明の開示

本発明の目的は、エシェリヒア・コリの新規なリジンデカルボキシラーゼ遺伝子を取得し、この遺伝子及び／または c a d A 遺伝子の発現が抑えられたエシェリヒア属に属する L-リジン生産菌を造成し、また、これらのエシェリヒア属微生物を培養することによる L-リジンの製造方法を提供することである。

本発明者らは、公知のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子である c a d A 遺伝子を破壊したエシェリヒア・コリ株を造成したところ、この菌株においてもリジンデカルボキシラーゼによる L-リジンの分解産物であるカダベリンがなお生成されることを見いだした。そこで本発明者らは、エシェリヒア・コリに新規なリジンデカルボキシラーゼ遺伝子が存在しており、エシェリヒア属微生物を用いて L-リジンを発酵生産する際に大きく影響を与えるものと推定し、当該遺伝子のクローニングを試みた結果、c a d A 遺伝子とは異なる新規なリジンデカルボキシラーゼ遺伝子の取得に成功し、また、エシェリヒア・コリの L-リジン生産菌においてこの遺伝子の発現を抑え、さらにまた c a d A 遺伝子の発現を抑えることにより L-リジンの分解活性が著しく低下ないし消失し、L-リジン生産能が顕著に向上することを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、エシェリヒア・コリ由来のリジンデカルボキシラーゼをコードする新規遺伝子（本遺伝子は「l d c」遺伝子と命名された。）を提供するものである。

また本発明は、L-リジン生産能を有し、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられているエシェリヒア属に属する微生物を提供するものである。

さらに本発明は、上記エシェリヒア属微生物を液体培地に培養し、培養液中に L-リジンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする L-リジンの製造法を提供するものである。

上記エシェリヒア属に属する微生物としては、l d c 遺伝子及び／または c a d A 遺伝子の発現が抑えられたことにより、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ

活性が低下又は消失させられている微生物が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むDNA断片の取得

本発明の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子 (l d c) を含むDNA断片の取得は、エシェリヒア・コリの入手可能な株、例えばK-12株またはその誘導株から以下のようにして行うことができる。

まず、エシェリヒア・コリ K-12由来のW3110株の染色体DNAよりポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 (以下、PCR法と記す) を用いて公知のリジンデカルボキシラーゼの遺伝子であるcadA遺伝子を得る。cadA遺伝子の塩基配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列を、各々配列番号5及び配列番号6に示す。このcadA遺伝子と類似の配列を有するDNA断片を、エシェリヒア・コリ W3110の染色体DNAライブラリーよりプラスミドベクターやファージベクターを用いる方法によりクローニングし、このDNA断片に新規なリジンデカルボキシラーゼ遺伝子が含まれていることを確認する。目的とする遺伝子が含まれていることの確認は、PCR法により調製したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。

かくして得られるDNA断片に含まれる遺伝子の塩基配列は、次のようにして決定される。まず、上記DNA断片をエシェリヒア・コリ菌体内で自律増殖可能なプラスミドベクターと連結して組換えDNAを作成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。得られた形質転換体を液体培地に培養し、増殖した菌体から組換えDNAを回収する。回収した組換えDNAに含まれるDNA断片の全塩基配列をダイデオキシ法 (Sanger, F. et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463 (1977)) により決定し、DNAの構造解析を行い、プロモーター、オペレーター、SD配列、開始コドン、終始コドン、オープン・リーディング・フレームなどの存在位置を決定する。

本発明の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子は、配列表配列番号3に示されるDNA断片の全塩基配列の1005～1007番目のATGから3141～3143番目のGGAに至る配列を有する。本遺伝子は、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする。この新規な

リジンデカルボキシラーゼと c a d A 遺伝子のコードするリジンデカルボキシラーゼとのホモロジーは、69.4%であった。

本発明の遺伝子は、配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するリジンデカルボキシラーゼをコードするものであればよく、その塩基配列は上記のものに限定されない。さらに、本発明の遺伝子によりコードされるリジンデカルボキシラーゼは、前記アミノ酸配列において、リジンデカルボキシラーゼ活性を実質的に損なわない1つまたは複数個のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を有していてもよい。このような欠失、挿入又は置換を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子は、エシェリヒア・コリの変種、自然突然変異株又は人為突然変異株、エシェリヒア・コリ以外のエシェリヒア属微生物から取得され得る。また、欠失、挿入又は置換を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする変異遺伝子は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子をインビトロ変異処理、あるいは部位特異的変異処理することによっても取得され得る。これらの突然変異処理は、後述するような当業者に周知の方法によって行うことができる。

ただし、ここにいう1つまたは複数個のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子とは、「l d c 遺伝子」に由来し、l d c 遺伝子と実質的に同一とみなすことができるものをいうのであって、由来の異なる遺伝子にまで拡張することを意図するものではない。「複数個」が如何なる範囲であるかを具体的に規定することはできないが、例えば配列番号3に示すアミノ酸配列と200アミノ酸残基以上異なるタンパク質をコードする c a d A 遺伝子は本発明の遺伝子と異なるものであり、配列番号3に示すアミノ酸配列と2、3個アミノ酸残基が異なっても同等のリジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が本発明の遺伝子に包含されることは、当業者に容易に理解されるであろう。

< 2 > リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現が抑制されたエシェリヒア属微生物の造成

本発明のエシェリヒア属微生物は、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられているエシェリヒア属に属する微生物である。エシェリヒ

ア属微生物としては、エシェリヒア・コリが挙げられる。細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性の低下又は消失は、例えば、上記の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子（l d c）と公知の c a d A 遺伝子のいずれか一方あるいは両方の発現を抑えることによって行われる。また、これらの遺伝子によりコードされるリジンデカルボキシラーゼ酵素の構造を改変して、比活性を低下又は消失させることによって、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性を低下又は消失させることができる。

l d c 遺伝子及び公知の c a d A 遺伝子の発現を抑えるための手段としては、例えば、これらの遺伝子のプロモーター配列中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって転写レベルで遺伝子の発現を抑える方法がある（M. Rosenberg and D. Court, Ann. Rev. Genetics 13 (1979) p.319、P. Youderian, S. Bouvier and M. Susskind, Cell 30 (1982) P. 843-853参照）。また、これらの遺伝子の発現は、S D 配列と開始コドンとの間の領域中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによって、翻訳レベルで抑えることができる（J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert and F. W. Studier, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75 (1978) P. 2743参照）。また、リジンデカルボキシラーゼ酵素の比活性を低下又は消失させるには、リジンデカルボキシラーゼ遺伝子のコーディング領域の中の塩基配列中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによってコーディング領域を改変または破壊する方法がある。

塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせる遺伝子としては、l d c 遺伝子及び c a d A 遺伝子に加え、コードするリジンデカルボキシラーゼ活性を実質的に損なわない1つまたは複数個のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を有する l d c 遺伝子または c a d A 遺伝子でもよい。

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

ci. U. S. A., 75, 270(1978)) が挙げられる。

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて1本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。その後1本鎖DNAと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとT4リガーゼを用いて完全な2本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子に変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リコンビナントPCR法(PCR Technology, Stockton press (1989))がある。

また、化学薬剤処理を用いる方法は、目的の遺伝子を含むDNA断片を直接次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等で処理することによりDNA断片中にランダムに塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ変異を導入する方法である。

以上のようにして取得した変異が導入されて改変または破壊された遺伝子を、エシェリヒア属微生物の染色体上の正常な遺伝子と置換することにより、細胞中のldc遺伝子及び／またはcadA遺伝子の発現を抑えることができる。遺伝子の置換の方法としては、相同性組換えを利用した方法(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985))がある。相同性組換えは、エシェリヒア属微生物が一般的に持つ能力であり、染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体を染色体上に組み込

む。この後さらに染色体上の相同性を有する配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により変異が導入された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ変異が導入されて改変または破壊された遺伝子が染色体上の正常な遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

遺伝子の置換を行うエシェリヒア属微生物は、L-リジン生産能を有する微生物である。L-リジン生産能を有するエシェリヒア属微生物、例えばエシェリヒア・コリ菌株は、L-リジン生産能を有しない株に変異処理を施し、S-(2-アミノエチル)-L-システイン（以下、AECと記す）等のリジンアナログに対する耐性を付与することにより取得することができる。変異処理の方法としては、エシェリヒア・コリの菌体にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンや亜硝酸等の化学薬剤による処理、あるいは紫外線、放射線照射等の処理を施す方法がある。このような菌株の具体例としては、エシェリヒア・コリ AJ13069 (FERM P-14690) が挙げられる。本菌株は、エシェリヒア・コリ K-12 由来のW3110株にAEC耐性を付与することによって育種されたものである。尚、エシェリヒア・コリ AJ13069は、平成6年12月6日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-14690として寄託され、平成7年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている。

また、L-リジン生産能を有するエシェリヒア・コリ菌株は、L-リジンの生合成に関与する遺伝情報を担うDNAを遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても育種することができる。導入される遺伝子は、アスパルトキナーゼ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ等、L-リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子であり、アスパルトキナーゼ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素のようにL-リジンによる

フィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。遺伝子を導入、増強するには、エシェリヒア・コリ細胞内で自律複製可能なベクターに遺伝子を連結して組換えDNAを作成し、それでエシェリヒア・コリを形質転換する方法があり、その他にトランスダクション、トランスポゾン (Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol. 1, 417, (1983))、Muファージ、(特開平2-109985号) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主染色体に組み込むこともできる。

遺伝子の機能が破壊されたエシェリヒア属微生物を取得するその他の方法としては、当該遺伝子を有するエシェリヒア属微生物の菌体にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンや亜硝酸等の化学薬剤による処理、あるいは紫外線、放射線照射等の処理を施すことにより遺伝的に変異させる方法もある。

後述の実施例においては、リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能が破壊されたエシェリヒア・コリ株の造成は、そのコーディング領域の一部を欠失させ、代わりに薬剤耐性遺伝子を挿入したリジンデカルボキシラーゼ遺伝子を、上記の相同性組換えを利用した方法により、エシェリヒア・コリの染色体上のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子と置換することにより行った。

なお、1つの菌株において本発明の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子とcadA遺伝子のいずれか一方のみの発現を抑えることもできるし、両方の発現を抑えることもできる。また、L-リジン生産能を有するエシェリヒア属微生物においてリジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現を抑えてもよいし、リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現を抑えたエシェリヒア属微生物に上記の方法によりL-リジン生産能を付与してもよい。

< 3 > リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現が抑制されたエシェリヒア属微生物を用いたL-リジンの生産

上記のようにして取得したリジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現が抑制されたエシェリヒア属微生物を培養することにより、培養液中に著量のL-リジンが生成蓄積される。L-リジンの蓄積量は、公知のcadA遺伝子の発現を抑えることだけでも増加するが、本発明の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現

を抑えることは、L-リジンの蓄積量の向上により有効であり、また、*cadA* 遺伝子と本発明の新規遺伝子の両方の発現を抑えた菌株を用いることにより、L-リジンの生産にとって最も好ましい結果が得られる。

L-リジン生産のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、でんぷん加水分解物などの糖類、グリセロール、ソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素源、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。これらの他に、有機微量栄養源として、ビタミンB₁、または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。

培養は、好氣的条件下で16～72時間程度実施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～7に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、あるいはアンモニアガス等を使用することができる。

培養終了後、発酵液からのL-リジンの採取は、通常のイオン交換樹脂法、沈澱法、その他の公知の方法を組み合わせることにより適宜実施できる。

図面の簡単な説明

図1は、新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むプラスミドpUC6F5HH5の構造を示す図である。

図2は、新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子を含む温度感受性プラスミドpTS6F5HH5の構造と、同遺伝子の遺伝子の一部がクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む断片で置換されたプラスミドpTS6F5HH5Cmの構築を示す図である。

図3は、正常なリジンデカルボキシラーゼ遺伝子保有株WC196、及びリジ

ンデカルボキシラーゼ遺伝子破壊株WC196C、WC196L及びWC196LC株におけるL-リジン分解活性の比較を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

(1) 新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子のクローニング

国立遺伝学研究所（日本国静岡県三島市谷田1111）より入手したエシェリヒア・コリ K-12のW3110株の菌体から、通常の方法に従って染色体DNAを抽出した。一方、Meng, S and Bennett, G.N., J. Bacteriol., 174, 2659 (1992)に記載されているcadA遺伝子の塩基配列（配列番号5参照）に基づいて、配列表配列番号1及び2に示すような合成DNAプライマー2本を通常の方法で合成した。これらはそれぞれcadA遺伝子の5'-末端上流部分及び3'-末端部分に相同な配列を有する。この染色体DNAとDNAプライマーを用いてエルリッチらの方法（PCR Technology, Stockton press (1989)）に従ってPCR法を行い、cadA遺伝子の大部分を含む2.1kbpのDNA断片を得た。この断片をランダムプライマーラベリングキット（宝酒造社製）および $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP（アマシャムジャパン社製）を用いてラベルしハイブリダイゼーション用のプローブを作製した。

次に、作製したプローブとエシェリヒア・コリノジーンマッピングメンブラン（宝酒造社製）を用いて通常の方法（Molecular Cloning (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)）によりハイブリダイゼーションを行った。エシェリヒア・コリノジーンマッピングメンブランには、小原らのライブラリー（エシェリヒア・コリ染色体DNAのラムダファージライブラリー：Kohara, Y, et al, Cell, 50, 495-508 (1987)参照）が吸着している。ハイブリダイゼーションの際に、プローブの洗浄の条件を弱くし（ $2\times\text{SSC}$ 、 55°C 、30分）、cadA遺伝子と類似の配列を持つラムダファージクローンをスクリーニングし

た。その結果、c a d A遺伝子領域を含むクローン（2 1 H 1 1、5 G 7）の強いシグナルの他に、E 2 B 8、6 F 5 H、1 0 F 9の3つのクローンに弱いシグナルを認めることができた。E 2 B 8、6 F 5 H、1 0 F 9の3つのラムダファージクローンの挿入配列はエシェリヒア・コリの染色体上で互いに重なりながら連続している。そこで、小原らのライブラリー（Kohara, Y, et al, Cell, 50, 495-508（1987））に属する6 F 5 HのラムダファージDNAを通常の方法により分離し、さらに、各種制限酵素で切断し、上記プローブを用いて先程と同様な方法によりサザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、H i n d I I Iで切断された約5 k b pのDNA断片中にc a d A遺伝子と類似の配列が存在していることが明らかとなった。

そこで、この6 F 5 HのラムダファージDNAをH i n d I I Iで切断して得られる約5 k b pの断片とプラスミドp U C 1 9（宝酒造社製）のH i n d I I I切断物をT 4 DNAリガーゼを用いて連結した。この反応混合物でエシェリヒア・コリ J M 1 0 9（宝酒造社製）を形質転換し、アンピシリンを5 0 m g / L添加した完全平板培地（ポリペプトン1 0 g、酵母エキス5 g、塩化ナトリウム5 gを水1 Lに含む）上で生育したアンピシリン耐性株より、6 F 5 HのラムダファージDNAをH i n d I I Iで切断して得られる約5 k b pの断片が挿入されたプラスミドを保有する菌株を取得した。その菌体からプラスミドを抽出し、プラスミドp U C 6 F 5 H H 5を取得した。プラスミドp U C 6 F 5 H H 5の構造を図1に示す。

なお、このプラスミドを保持するエシェリヒア・コリ J M 1 0 9 / p U C 6 F 5 H H 5は、A J 1 3 0 6 8と命名され、平成6年12月6日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M P - 1 4 6 8 9として寄託され、平成7年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号F E R M B P - 5 2 5 1が付与されている。

（2）新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の塩基配列の決定

取得したp U C 6 F 5 H H 5の制限酵素C l a I部位からH i n d I I I部位の領域の塩基配列をMolecular Cloning (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)に記載の方法に従って決定した。その結果、配列表配列番

号3に示す塩基配列を有することが明らかになった。このDNA配列中には配列表配列番号4に示すアミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレームが含まれている。

(3) L-リジン生産能を有するエシェリヒア・コリの取得

エシェリヒア・コリ W3110を完全培地（ポリペプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5gを水1Lに含む）で37℃、4時間培養して得た菌体を200μg/mlの濃度のN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン溶液中で37℃、30分変異処理し、洗浄後、AECを5g/L添加した最少平板培地（リン酸水素二ナトリウム7g、リン酸二水素カリウム3g、塩化アンモニウム1g、塩化ナトリウム0.5g、グルコース5g、硫酸マグネシウム・7水和物0.25g、寒天15gを水1Lに含む）に塗布した。37℃、48時間培養して出現したコロニーを分離することによりAEC耐性株を取得した。この中の一株であるWC196株はL-リジン生産能を有していた。なお、WC196株はAJ13069と命名され、平成6年12月6日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14690として寄託され、平成7年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている。

(4) 新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能を破壊したWC196株の造成

上記の6F5HのラムダファージDNAをHindIIIで切断して得られる約5kbpの断片と温度感受性のプラスミドpMAN031（Yasueda, H. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 211 (1991)）のHindIII切断物をT4DNAリガーゼを用いて連結した。この反応混合物でエシェリヒア・コリJM109を形質転換し、アンピシリンを50mg/L添加した完全平板培地の培地上で37℃、24時間培養し、生育したアンピシリン耐性株より6F5HのラムダファージDNAをHindIIIで切断して得られる約5kbpの断片が挿入されたプラスミドを保有する菌株を取得した。この菌体からプラスミドを抽出し、プラスミドpTS6F5HH5を取得した。プラスミドpTS6F5HH5をEcoRVで切断して約1kbpのDNA断片を除き、ついでpHSG39

9（宝酒造社製）をA c c Iで切断して得られる約1 k b pのクロラムフェニコール耐性遺伝子を持つ断片をT 4リガーゼを用いて挿入して、プラスミドp T S 6 F 5 H H 5 C mを構築した。以上の操作の結果、新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能が破壊されたDNA断片を持つプラスミドを構築することができた。プラスミドp T S 6 F 5 H H 5の構造及びプラスミドp T S 6 F 5 H H 5 C mを図2に示す。

次に、このプラスミドp T S 6 F 5 H H 5 C mの温度感受性の性質を利用した一般的な相同性組換えの手法（Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)）でWC 1 9 6株の染色体上の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子を新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能が破壊されたDNA断片に置換した株を造成した。すなわち、プラスミドp T S 6 F 5 H H 5 C mでWC 1 9 6株を形質転換し、最初3 0℃でアンピシリン耐性かつクロラムフェニコール耐性株を取得する。次にこの株より4 2℃でアンピシリン耐性かつクロラムフェニコール耐性株を取得し、さらにこの株より3 0℃でアンピシリン感受性かつクロラムフェニコール耐性株を取得することにより、上記のようなWC 1 9 6株の染色体上の新規なリジンデカルボキシラーゼ遺伝子を新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能が破壊されたDNA断片に置換した株を造成し、この株をWC 1 9 6 L株と命名した。

（5）c a d A遺伝子の欠損したWC 1 9 6株及びWC 1 9 6 L株の造成

公知のリジンデカルボキシラーゼの遺伝子であるc a d Aが破壊されたエシェリヒア・コリとして、既にエシェリヒア・コリ K-1 2由来のGNB 1 0 1 8 1株（Auger, E. A. et al, Mol. Microbiol., 3, 609 (1989)参照：本菌株は、E. coli Genetic Stock Center（米国コネチカット州）等から入手できる）等が知られている。この菌株ではc a d A遺伝子の領域が欠損していることが明らかにされている。そこで、このGNB 1 0 1 8 1株のc a d A遺伝子欠損の形質をP 1ファージを用いた一般的な方法（A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992)）によりWC 1 9 6株に形質導入してWC 1 9 6 C株を造成した。WC 1 9 6株のc a d A遺伝子が欠損していることはサザンブロットハイブリダイゼーションにより確認した。また、以上と同様

な方法により、WC196株よりcadA遺伝子が欠損したWC196LC株を造成した。

実施例2

(1) WC196株、WC196C株、WC196L株及びWC196LC株のL-リジン分解活性の確認

造成した上記4株をL-リジン生産用培地（グルコース40g、硫酸アンモニウム16g、リン酸二水素カリウム1g、酵母エキス2g、硫酸マンガン4～5水和物10mg、硫酸鉄・7水和物10mgを水1Lに含み、水酸化カリウムでpHを7.0に調整後、さらに30gの別殺菌した炭酸カルシウムを加える）を用いて37℃で17時間培養した。回収した菌体を生理食塩水で2回洗浄し、L-リジン分解検定用培地（リン酸水素二ナトリウム・12水和物17g、リン酸二水素カリウム3g、塩化ナトリウム0.5g、L-リジン塩酸塩10gを水1Lに含む）に懸濁して37℃で31時間培養した。

培養液中の残存L-リジン量の経時的な変化を図3に示す。なお、L-リジンの定量はバイオテックアナライザーAS-210（旭化成社製）を用いて行った。WC196株では顕著なL-リジンの分解が認められたが、公知のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子であるcadA遺伝子を欠損させたWC196C株では分解活性がやや低下しており、新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能を破壊したWC196L株及びWC196LC株ではL-リジンの分解が認められなかった。なお、培養3時間目くらいまでにいずれの菌株においても培養液中の残存L-リジンが減少するが、これは菌体内にL-リジンが取り込まれるために起こる現象であり、分解によるものではない。

(2) WC196株、WC196C株、WC196L株及びWC196LC株によるL-リジンの生産

上記のL-リジン生産用培地で上記4株を37℃で20時間培養し、培養液中に生成蓄積したL-リジン及びカダベリンの量を測定した。なお、L-リジンの定量は上記のようにバイオテックアナライザーAS-210を、カダベリンの定

量は高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。

結果を表 1 に示す。c a d A 遺伝子を破壊した W C 1 9 6 C 株では W C 1 9 6 株に比べて、また、新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能を破壊した W C 1 9 6 L 株では W C 1 9 6 株及び W C 1 9 6 C 株に比べて、L-リジンの蓄積が向上する一方、L-リジンの分解物であるカダベリンの蓄積が減少した。両方のリジンデカルボキシラーゼの遺伝子の機能を破壊した W C 1 9 6 L C 株ではさらに L-リジンの蓄積が向上し、L-リジンの分解物であるカダベリンの蓄積が検出されなかった。

表 1

菌株	L-リジン蓄積 (g/L)	カダベリン蓄積 (g/L)
W C 1 9 6	1. 4	0. 6
W C 1 9 6 C	1. 9	0. 4
W C 1 9 6 L	2. 3	0. 1
W C 1 9 6 L C	3. 3	検出されず

実施例 3

L-リジンの分解活性がなくなったエシェリヒア・コリ W C 1 9 6 L C を新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子を含む p U C 6 F 5 H H 5 で形質転換し、アンピシリン耐性株を取得した。W C 1 9 6 L C 株と W C 1 9 6 L C / p U C 6 F 5 H H 5 株を 5 g / L の L-リジンを添加した L-リジン生産用培地で 3 7 ° C で 1 6 時間培養し、生成するカダベリンの量を測定した。

結果を表 2 に示す。W C 1 9 6 L C 株は L-リジンをカダベリンに転換することはできなかったが、W C 1 9 6 L C / p U C 6 F 5 H H 5 株は L-リジンをカダベリンに転換する能力を持っていた。

表 2

菌株	カダベリン生成量 (g/L)
WC196LC WC196LC/pUC6F5HH5	検出されず 0.93

産業上の利用可能性

本発明の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子は、エシェリヒア・コリにおいてL-リジンの分解に関与する。L-リジン生産能を有し、上記遺伝子及び／またはcadA遺伝子の発現が抑えられているエシェリヒア属細菌を培養することにより安価かつ効率的にL-リジンを製造することができる。

配列表

(1) 一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称：新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子及びL-リジンの製造法
- (iii) 配列数：6
- (iv) 連絡先：
 - (A) 宛名：
 - (B) 番地：
 - (C) 市：
 - (D) 州：
 - (E) 国：
 - (F) ZIP：
- (v) コンピュータ読取り可能形式
 - (A) 媒体：フロッピーディスク
 - (B) コンピュータ：IBM PC 互換
 - (C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア：FastSEQ Version 1.5
- (vi) 現行出願データ
 - (A) 出願番号
 - (B) 出願日
 - (C) 分類
- (viii) 代理人／事務所情報
 - (A) 名前：
 - (B) 登録番号：
 - (C) 整理番号：
- (ix) 通信情報
 - (A) 電話番号：
 - (B) ファクシミリ番号：

(2) 配列番号 1 の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
 - (A) 配列の長さ：20 bases
 - (B) 配列の型：核酸
 - (C) 鎖の数：一本鎖

- 18 -

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

TGGATAACCA CACCGCGTCT 20

(2) 配列番号 2 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 bases

(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 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

GGAAGGATCA TATTGGCGTT 20

(2) 配列番号 3 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 3269 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

- 19 -

(A) 生物名 : エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)

(B) 株名 : W 3 1 1 0

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1005..3143

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

```

ATCGATTCTC TGA CTGCGGT TAGCCGTCAG GATGAGAAAC TGGATATTAA CATCGATGAA    60
GAAGTGCATC GTCTGCGTGA AAAAAGCGTA GAACTGACAC GTAAAATCTT CGCCGATCTC   120
GGTGCATGGC AGATTGCGCA ACTGGCACGC CATCCACAGC GTCCTTATAC CCTGGATTAC   180
GTTGCGCTGG CATTTGATGA ATTTGACGAA CTGGCTGGCG ACCGCGCGTA TGCAGACGAT   240
AAAGCTATCG TCGGTGGTAT CGCCCGTCTC GATGGTCGTC CGGTGATGAT CATTGGTCAT   300
CAAAAAGGTC GTGAAACCAA AGAAAAAATT CGCCGTA ACT TTGGTATGCC AGCGCCAGAA   360
GGTTACCGCA AAGCACTGCG TCTGATGCAA ATGGCTGAAC GCTTTAAGAT GCCTATCATC   420
ACCTTTATCG ACACCCCGGG GGCTTATCCT GCGGTGGGCG CAGAAGAGCG TGGTCAGTCT   480
GAAGCCATTG CACGCAACCT GCGTGAAATG TCTCGCCTCG GCGTACCGGT AGTTTGTACG   540
GTTATCGGTG AAGGTGGTTC TGGCGGTGCG CTGGCGATTG GCGTGGGCGA TAAAGTGAAT   600
ATGCTGCAAT ACAGCACCTA TTCCGTTATC TCGCCGGAAG GTTGTGCGTC CATTCTGTGG   660
AAGAGCGCCG ACAAAGCGCC GCTGGCGGCT GAAGCGATGG GTATCATTGC TCCGCGTCTG   720
AAAGAACTGA AACTGATCGA CTCCATCATC CCGGAACCAC TGGGTGGTGC TCACCGTAAC   780
CCGGAAGCGA TGGCGGCATC GTTGAAAGCG CAACTGCTGG CGGATCTGGC CGATCTCGAC   840
GTGTTAAGCA CTGAAGATTT AAAAATCGT CGTTATCAGC GCCTGATGAG CTACGGTTAC   900
GCGTAATTCG CAAAAGTTCT GAAAAAGGGT CACTTCGGTG GCCCTTTTTT ATCGCCACGG   960
TTTGAGCAGG CTATGATTAA GGAAGGATTT TCCAGGAGGA ACAC ATG AAC ATC ATT  1016

```

Met Asn Ile Ile

1

```

GCC ATT ATG GGA CCG CAT GGC GTC TTT TAT AAA GAT GAG CCC ATC AAA    1064
Ala Ile Met Gly Pro His Gly Val Phe Tyr Lys Asp Glu Pro Ile Lys

```

5

10

15

20

- 20 -

GAA CTG GAG TCG GCG CTG GTG GCG CAA GGC TTT CAG ATT ATC TGG CCA	1112
Glu Leu Glu Ser Ala Leu Val Ala Gln Gly Phe Gln Ile Ile Trp Pro	
25 30 35	
CAA AAC AGC GTT GAT TTG CTG AAA TTT ATC GAG CAT AAC CCT CGA ATT	1160
Gln Asn Ser Val Asp Leu Leu Lys Phe Ile Glu His Asn Pro Arg Ile	
40 45 50	
TGC GGC GTG ATT TTT GAC TGG GAT GAG TAC AGT CTC GAT TTA TGT AGC	1208
Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Glu Tyr Ser Leu Asp Leu Cys Ser	
55 60 65	
GAT ATC AAT CAG CTT AAT GAA TAT CTC CCG CTT TAT GCC TTC ATC AAC	1256
Asp Ile Asn Gln Leu Asn Glu Tyr Leu Pro Leu Tyr Ala Phe Ile Asn	
70 75 80	
ACC CAC TCG ACG ATG GAT GTC AGC GTG CAG GAT ATG CGG ATG GCG CTC	1304
Thr His Ser Thr Met Asp Val Ser Val Gln Asp Met Arg Met Ala Leu	
85 90 95 100	
TGG TTT TTT GAA TAT GCG CTG GGG CAG GCG GAA GAT ATC GCC ATT CGT	1352
Trp Phe Phe Glu Tyr Ala Leu Gly Gln Ala Glu Asp Ile Ala Ile Arg	
105 110 115	
ATG CGT CAG TAC ACC GAC GAA TAT CTT GAT AAC ATT ACA CCG CCG TTC	1400
Met Arg Gln Tyr Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Asn Ile Thr Pro Pro Phe	
120 125 130	
ACG AAA GCC TTG TTT ACC TAC GTC AAA GAG CGG AAG TAC ACC TTT TGT	1448
Thr Lys Ala Leu Phe Thr Tyr Val Lys Glu Arg Lys Tyr Thr Phe Cys	
135 140 145	
ACG CCG GGG CAT ATG GGC GGC ACC GCA TAT CAA AAA AGC CCG GTT GGC	1496
Thr Pro Gly His Met Gly Gly Thr Ala Tyr Gln Lys Ser Pro Val Gly	
150 155 160	
TGT CTG TTT TAT GAT TTT TTC GGC GGG AAT ACT CTT AAG GCT GAT GTC	1544
Cys Leu Phe Tyr Asp Phe Phe Gly Gly Asn Thr Leu Lys Ala Asp Val	
165 170 175 180	

- 21 -

TCT ATT TCG GTC ACC GAG CTT GGT TCG TTG CTC GAC CAC ACC GGG CCA	1592
Ser Ile Ser Val Thr Glu Leu Gly Ser Leu Leu Asp His Thr Gly Pro	
185 190 195	
CAC CTG GAA GCG GAA GAG TAC ATC GCG CGG ACT TTT GGC GCG GAA CAG	1640
His Leu Glu Ala Glu Glu Tyr Ile Ala Arg Thr Phe Gly Ala Glu Gln	
200 205 210	
AGT TAT ATC GTT ACC AAC GGA ACA TCG ACG TCG AAC AAA ATT GTG GGT	1688
Ser Tyr Ile Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn Lys Ile Val Gly	
215 220 225	
ATG TAC GCC GCG CCA TCC GGC AGT ACG CTG TTG ATC GAC CGC AAT TGT	1736
Met Tyr Ala Ala Pro Ser Gly Ser Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asn Cys	
230 235 240	
CAT AAA TCG CTG GCG CAT CTG TTG ATG ATG AAC GAT GTA GTG CCA GTC	1784
His Lys Ser Leu Ala His Leu Leu Met Met Asn Asp Val Val Pro Val	
245 250 255 260	
TGG CTG AAA CCG ACG CGT AAT GCG TTG GGG ATT CTT GGT GGG ATC CCG	1832
Trp Leu Lys Pro Thr Arg Asn Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Ile Pro	
265 270 275	
CGC CGT GAA TTT ACT CGC GAC AGC ATC GAA GAG AAA GTC GCT GCT ACC	1880
Arg Arg Glu Phe Thr Arg Asp Ser Ile Glu Glu Lys Val Ala Ala Thr	
280 285 290	
ACG CAA GCA CAA TGG CCG GTT CAT GCG GTG ATC ACC AAC TCC ACC TAT	1928
Thr Gln Ala Gln Trp Pro Val His Ala Val Ile Thr Asn Ser Thr Tyr	
295 300 305	
GAT GGC TTG CTC TAC AAC ACC GAC TGG ATC AAA CAG ACG CTG GAT GTC	1976
Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Trp Ile Lys Gln Thr Leu Asp Val	
310 315 320	
CCG TCG ATT CAC TTC GAT TCT GCC TGG GTG CCG TAC ACC CAT TTT CAT	2024
Pro Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr Thr His Phe His	
325 330 335 340	

- 22 -

CCG ATC TAC CAG GGT AAA AGT GGT ATG AGC GGC GAG CGT GTT GCG GGA	2072
Pro Ile Tyr Gln Gly Lys Ser Gly Met Ser Gly Glu Arg Val Ala Gly	
345 350 355	
AAA GTG ATC TTC GAA ACG CAA TCG ACC CAC AAA ATG CTG GCG GCG TTA	2120
Lys Val Ile Phe Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Met Leu Ala Ala Leu	
360 365 370	
TCG CAG GCT TCG CTG ATC CAC ATT AAA GGC GAG TAT GAC GAA GAG GCC	2168
Ser Gln Ala Ser Leu Ile His Ile Lys Gly Glu Tyr Asp Glu Glu Ala	
375 380 385	
TTT AAC GAA GCC TTT ATG ATG CAT ACC ACC ACC TCG CCC AGT TAT CCC	2216
Phe Asn Glu Ala Phe Met Met His Thr Thr Thr Ser Pro Ser Tyr Pro	
390 395 400	
ATT GTT GCT TCG GTT GAG ACG GCG GCG GCG ATG CTG CGT GGT AAT CCG	2264
Ile Val Ala Ser Val Glu Thr Ala Ala Ala Met Leu Arg Gly Asn Pro	
405 410 415 420	
GGC AAA CGG CTG ATT AAC CGT TCA GTA GAA CGA GCT CTG CAT TTT CGC	2312
Gly Lys Arg Leu Ile Asn Arg Ser Val Glu Arg Ala Leu His Phe Arg	
425 430 435	
AAA GAG GTC CAG CGG CTG CGG GAA GAG TCT GAC GGT TGG TTT TTC GAT	2360
Lys Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu Glu Ser Asp Gly Trp Phe Phe Asp	
440 445 450	
ATC TGG CAA CCG CCG CAG GTG GAT GAA GCC GAA TGC TGG CCC GTT GCG	2408
Ile Trp Gln Pro Pro Gln Val Asp Glu Ala Glu Cys Trp Pro Val Ala	
455 460 465	
CCT GGC GAA CAG TGG CAC GGC TTT AAC GAT GCG GAT GCC GAT CAT ATG	2456
Pro Gly Glu Gln Trp His Gly Phe Asn Asp Ala Asp Ala Asp His Met	
470 475 480	
TTT CTC GAT CCG GTT AAA GTC ACT ATT TTG ACA CCG GGG ATG GAC GAG	2504
Phe Leu Asp Pro Val Lys Val Thr Ile Leu Thr Pro Gly Met Asp Glu	
485 490 495 500	

- 23 -

CAG GGC AAT ATG AGC GAG GAG GGG ATC CCG GCG GCG CTG GTA GCA AAA	2552
Gln Gly Asn Met Ser Glu Glu Gly Ile Pro Ala Ala Leu Val Ala Lys	
505 510 515	
TTC CTC GAC GAA CGT GGG ATC GTA GTA GAG AAA ACC GGC CCT TAT AAC	2600
Phe Leu Asp Glu Arg Gly Ile Val Val Glu Lys Thr Gly Pro Tyr Asn	
520 525 530	
CTG CTG TTT CTC TTT AGT ATT GGC ATC GAT AAA ACC AAA GCA ATG GGA	2648
Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr Lys Ala Met Gly	
535 540 545	
TTA TTG CGT GGG TTG ACG GAA TTC AAA CGC TCT TAC GAT CTC AAC CTG	2696
Leu Leu Arg Gly Leu Thr Glu Phe Lys Arg Ser Tyr Asp Leu Asn Leu	
550 555 560	
CGG ATC AAA AAT ATG CTA CCC GAT CTC TAT GCA GAA GAT CCC GAT TTC	2744
Arg Ile Lys Asn Met Leu Pro Asp Leu Tyr Ala Glu Asp Pro Asp Phe	
565 570 575 580	
TAC CGC AAT ATG CGT ATT CAG GAT CTG GCA CAA GGG ATC CAT AAG CTG	2792
Tyr Arg Asn Met Arg Ile Gln Asp Leu Ala Gln Gly Ile His Lys Leu	
585 590 595	
ATT CGT AAA CAC GAT CTT CCC GGT TTG ATG TTG CGG GCA TTC GAT ACT	2840
Ile Arg Lys His Asp Leu Pro Gly Leu Met Leu Arg Ala Phe Asp Thr	
600 605 610	
TTG CCG GAG ATG ATC ATG ACG CCA CAT CAG GCA TGG CAA CGA CAA ATT	2888
Leu Pro Glu Met Ile Met Thr Pro His Gln Ala Trp Gln Arg Gln Ile	
615 620 625	
AAA GGC GAA GTA GAA ACC ATT GCG CTG GAA CAA CTG GTC GGT AGA GTA	2936
Lys Gly Glu Val Glu Thr Ile Ala Leu Glu Gln Leu Val Gly Arg Val	
630 635 640	
TCG GCA AAT ATG ATC CTG CCT TAT CCA CCG GGC GTA CCG CTG TTG ATG	2984
Ser Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val Pro Leu Leu Met	
645 650 655 660	

- 24 -

CCT GGA GAA ATG CTG ACC AAA GAG AGC CGC ACA GTA CTC GAT TTT CTA	3032
Pro Gly Glu Met Leu Thr Lys Glu Ser Arg Thr Val Leu Asp Phe Leu	
665 670 675	
CTG ATG CTT TGT TCC GTC GGG CAA CAT TAC CCC GGT TTT GAA ACG GAT	3080
Leu Met Leu Cys Ser Val Gly Gln His Tyr Pro Gly Phe Glu Thr Asp	
680 685 690	
ATT CAC GGC GCG AAA CAG GAC GAA GAC GGC GTT TAC CGC GTA CGA GTC	3128
Ile His Gly Ala Lys Gln Asp Glu Asp Gly Val Tyr Arg Val Arg Val	
695 700 705	
CTA AAA ATG GCG GGA TAACTTGCCA GAGCGGCTTC CGGGCGAGTA ACGTTCTGTT	3183
Leu Lys Met Ala Gly	
710	
AACAAATAAA GGAGACGTTA TGCTGGGTTT AAAACAGGTT CACCATATTG CGATTATTGC	3243
GACGGATTAT GCGGTGAGCA AAGCTT	3269

(2) 配列番号 4 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 713 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

Met Asn Ile Ile Ala Ile Met Gly Pro His Gly Val Phe Tyr Lys Asp
1 5 10 15
Glu Pro Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ala Leu Val Ala Gln Gly Phe Gln
20 25 30
Ile Ile Trp Pro Gln Asn Ser Val Asp Leu Leu Lys Phe Ile Glu His
35 40 45
Asn Pro Arg Ile Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Glu Tyr Ser Leu
50 55 60

- 25 -

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

- 26 -

Asn Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Trp Ile Lys Gln
 305 310 315 320
 Thr Leu Asp Val Pro Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr
 325 330 335
 Thr His Phe His Pro Ile Tyr Gln Gly Lys Ser Gly Met Ser Gly Glu
 340 345 350
 Arg Val Ala Gly Lys Val Ile Phe Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Met
 355 360 365
 Leu Ala Ala Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ile His Ile Lys Gly Glu Tyr
 370 375 380
 Asp Glu Glu Ala Phe Asn Glu Ala Phe Met Met His Thr Thr Thr Ser
 385 390 395 400
 Pro Ser Tyr Pro Ile Val Ala Ser Val Glu Thr Ala Ala Ala Met Leu
 405 410 415
 Arg Gly Asn Pro Gly Lys Arg Leu Ile Asn Arg Ser Val Glu Arg Ala
 420 425 430
 Leu His Phe Arg Lys Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu Glu Ser Asp Gly
 435 440 445
 Trp Phe Phe Asp Ile Trp Gln Pro Pro Gln Val Asp Glu Ala Glu Cys
 450 455 460
 Trp Pro Val Ala Pro Gly Glu Gln Trp His Gly Phe Asn Asp Ala Asp
 465 470 475 480
 Ala Asp His Met Phe Leu Asp Pro Val Lys Val Thr Ile Leu Thr Pro
 485 490 495
 Gly Met Asp Glu Gln Gly Asn Met Ser Glu Glu Gly Ile Pro Ala Ala
 500 505 510
 Leu Val Ala Lys Phe Leu Asp Glu Arg Gly Ile Val Val Glu Lys Thr
 515 520 525
 Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr
 530 535 540

- 27 -

Lys Ala Met Gly Leu Leu Arg Gly Leu Thr Glu Phe Lys Arg Ser Tyr
 545 550 555 560
 Asp Leu Asn Leu Arg Ile Lys Asn Met Leu Pro Asp Leu Tyr Ala Glu
 565 570 575
 Asp Pro Asp Phe Tyr Arg Asn Met Arg Ile Gln Asp Leu Ala Gln Gly
 580 585 590
 Ile His Lys Leu Ile Arg Lys His Asp Leu Pro Gly Leu Met Leu Arg
 595 600 605
 Ala Phe Asp Thr Leu Pro Glu Met Ile Met Thr Pro His Gln Ala Trp
 610 615 620
 Gln Arg Gln Ile Lys Gly Glu Val Glu Thr Ile Ala Leu Glu Gln Leu
 625 630 635 640
 Val Gly Arg Val Ser Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val
 645 650 655
 Pro Leu Leu Met Pro Gly Glu Met Leu Thr Lys Glu Ser Arg Thr Val
 660 665 670
 Leu Asp Phe Leu Leu Met Leu Cys Ser Val Gly Gln His Tyr Pro Gly
 675 680 685
 Phe Glu Thr Asp Ile His Gly Ala Lys Gln Asp Glu Asp Gly Val Tyr
 690 695 700
 Arg Val Arg Val Leu Lys Met Ala Gly
 705 710

(2) 配列番号 5 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 2145 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A)生物名：エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)

(B)株名 : C S 5 2 0

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..2145

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

ATG AAC GTT ATT GCA ATA TTG AAT CAC ATG GGG GTT TAT TTT AAA GAA	48
Met Asn Val Ile Ala Ile Leu Asn His Met Gly Val Tyr Phe Lys Glu	
1 5 10 15	
GAA CCC ATC CGT GAA CTT CAT CGC GCG CTT GAA CGT CTG AAC TTC CAG	96
Glu Pro Ile Arg Glu Leu His Arg Ala Leu Glu Arg Leu Asn Phe Gln	
20 25 30	
ATT GTT TAC CCG AAC GAC CGT GAC GAC TTA TTA AAA CTG ATC GAA AAC	144
Ile Val Tyr Pro Asn Asp Arg Asp Asp Leu Leu Lys Leu Ile Glu Asn	
35 40 45	
AAT GCG CGT CTG TGC GGC GTT ATT TTT GAC TGG GAT AAA TAT AAT CTC	192
Asn Ala Arg Leu Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Lys Tyr Asn Leu	
50 55 60	
GAG CTG TGC GAA GAA ATT AGC AAA ATG AAC GAG AAC CTG CCG TTG TAC	240
Glu Leu Cys Glu Glu Ile Ser Lys Met Asn Glu Asn Leu Pro Leu Tyr	
65 70 75 80	
GCG TTC GCT AAT ACG TAT TCC ACT CTC GAT GTA AGC CTG AAT GAC CTG	288
Ala Phe Ala Asn Thr Tyr Ser Thr Leu Asp Val Ser Leu Asn Asp Leu	
85 90 95	
CGT TTA CAG ATT AGC TTC TTT GAA TAT GCG CTG GGT GCT GCT GAA GAT	336
Arg Leu Gln Ile Ser Phe Phe Glu Tyr Ala Leu Gly Ala Ala Glu Asp	
100 105 110	

- 29 -

ATT GCT AAT AAG ATC AAG CAG ACC ACT GAC GAA TAT ATC AAC ACT ATT	384
Ile Ala Asn Lys Ile Lys Gln Thr Thr Asp Glu Tyr Ile Asn Thr Ile	
115 120 125	
CTG CCT CCG CTG ACT AAA GCA CTG TTT AAA TAT GTT CGT GAA GGT AAA	432
Leu Pro Pro Leu Thr Lys Ala Leu Phe Lys Tyr Val Arg Glu Gly Lys	
130 135 140	
TAT ACT TTC TGT ACT CCT GGT CAC ATG GGC GGT ACT GCA TTC CAG AAA	480
Tyr Thr Phe Cys Thr Pro Gly His Met Gly Gly Thr Ala Phe Gln Lys	
145 150 155 160	
AGC CCG GTA GGT AGC CTG TTC TAT GAT TTC TTT GGT CCG AAT ACC ATG	528
Ser Pro Val Gly Ser Leu Phe Tyr Asp Phe Phe Gly Pro Asn Thr Met	
165 170 175	
AAA TCT GAT ATT TCC ATT TCA GTA TCT GAA CTG GGT TCT CTG CTG GAT	576
Lys Ser Asp Ile Ser Ile Ser Val Ser Glu Leu Gly Ser Leu Leu Asp	
180 185 190	
CAC AGT GGT CCA CAC AAA GAA GCA GAA CAG TAT ATC GCT CGC GTC TTT	624
His Ser Gly Pro His Lys Glu Ala Glu Gln Tyr Ile Ala Arg Val Phe	
195 200 205	
AAC GCA GAC CGC AGC TAC ATG GTG ACC AAC GGT ACT TCC ACT GCG AAC	672
Asn Ala Asp Arg Ser Tyr Met Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ala Asn	
210 215 220	
AAA ATT GTT GGT ATG TAC TCT GCT CCA GCA GGC AGC ACC ATT CTG ATT	720
Lys Ile Val Gly Met Tyr Ser Ala Pro Ala Gly Ser Thr Ile Leu Ile	
225 230 235 240	
GAC CGT AAC TGC CAC AAA TCG CTG ACC CAC CTG ATG ATG ATG AGC GAT	768
Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Leu Thr His Leu Met Met Met Ser Asp	
245 250 255	
GTT ACG CCA ATC TAT TTC CGC CCG ACC CGT AAC GCT TAC GGT ATT CTT	816
Val Thr Pro Ile Tyr Phe Arg Pro Thr Arg Asn Ala Tyr Gly Ile Leu	
260 265 270	

- 30 -

GGT GGT ATC CCA CAG AGT GAA TTC CAG CAC GCT ACC ATT GCT AAG CGC	864
Gly Gly Ile Pro Gln Ser Glu Phe Gln His Ala Thr Ile Ala Lys Arg	
275 280 285	
GTG AAA GAA ACA CCA AAC GCA ACC TGG CCG GTA CAT GCT GTA ATT ACC	912
Val Lys Glu Thr Pro Asn Ala Thr Trp Pro Val His Ala Val Ile Thr	
290 295 300	
AAC TCT ACC TAT GAT GGT CTG CTG TAC AAC ACC GAC TTC ATC AAG AAA	960
Asn Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Phe Ile Lys Lys	
305 310 315 320	
ACA CTG GAT GTG AAA TCC ATC CAC TTT GAC TCC GCG TGG GTG CCT TAC	1008
Thr Leu Asp Val Lys Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr	
325 330 335	
ACC AAC TTC TCA CCG ATT TAC GAA GGT AAA TGC GGT ATG AGC GGT GGC	1056
Thr Asn Phe Ser Pro Ile Tyr Glu Gly Lys Cys Gly Met Ser Gly Gly	
340 345 350	
CGT GTA GAA GGG AAA GTG ATT TAC GAA ACC CAG TCC ACT CAC AAA CTG	1104
Arg Val Glu Gly Lys Val Ile Tyr Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Leu	
355 360 365	
CTG GCG GCG TTC TCT CAG GCT TCC ATG ATC CAC GTT AAA GGT GAC GTA	1152
Leu Ala Ala Phe Ser Gln Ala Ser Met Ile His Val Lys Gly Asp Val	
370 375 380	
AAC GAA GAA ACC TTT AAC GAA GCC TAC ATG ATG CAC ACC ACC ACT TCT	1200
Asn Glu Glu Thr Phe Asn Glu Ala Tyr Met Met His Thr Thr Thr Ser	
385 390 395 400	
CCG CAC TAC GGT ATC GTG GCG TCC ACT GAA ACC GCT GCG GCG ATG ATG	1248
Pro His Tyr Gly Ile Val Ala Ser Thr Glu Thr Ala Ala Ala Met Met	
405 410 415	
AAA GGC AAT GCA GGT AAG CGT CTG ATC AAC GGT TCT ATT GAA CGT GCG	1296
Lys Gly Asn Ala Gly Lys Arg Leu Ile Asn Gly Ser Ile Glu Arg Ala	
420 425 430	

- 31 -

ATC AAA TTC CGT AAA GAG ATC AAA CGT CTG AGA ACG GAA TCT GAT GGC	1344
Ile Lys Phe Arg Lys Glu Ile Lys Arg Leu Arg Thr Glu Ser Asp Gly	
435 440 445	
TGG TTC TTT GAT GTA TGG CAG CCG GAT CAT ATC GAT ACG ACT GAA TGC	1392
Trp Phe Phe Asp Val Trp Gln Pro Asp His Ile Asp Thr Thr Glu Cys	
450 455 460	
TGG CCG CTG CGT TCT GAC AGC ACC TGG CAC GGC TTC AAA AAC ATC GAT	1440
Trp Pro Leu Arg Ser Asp Ser Thr Trp His Gly Phe Lys Asn Ile Asp	
465 470 475 480	
AAC GAG CAC ATG TAT CTT GAC CCG ATC AAA GTC ACC CTG CTG ACT CCG	1488
Asn Glu His Met Tyr Leu Asp Pro Ile Lys Val Thr Leu Leu Thr Pro	
485 490 495	
GGG ATG GAA AAA GAC GGC ACC ATG AGC GAC TTT GGT ATT CCG GCC AGC	1536
Gly Met Glu Lys Asp Gly Thr Met Ser Asp Phe Gly Ile Pro Ala Ser	
500 505 510	
ATC GTG GCG AAA TAC CTC GAC GAA CAT GGC ATC GTT GTT GAG AAA ACC	1584
Ile Val Ala Lys Tyr Leu Asp Glu His Gly Ile Val Val Glu Lys Thr	
515 520 525	
GGT CCG TAT AAC CTG CTG TTC CTG TTC AGC ATC GGT ATC GAT AAG ACC	1632
Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr	
530 535 540	
AAA GCA CTG AGC CTG CTG CGT GCT CTG ACT GAC TTT AAA CGT GCG TTC	1680
Lys Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ala Leu Thr Asp Phe Lys Arg Ala Phe	
545 550 555 560	
GAC CTG AAC CTG CGT GTG AAA AAC ATG CTG CCG TCT CTG TAT CGT GAA	1728
Asp Leu Asn Leu Arg Val Lys Asn Met Leu Pro Ser Leu Tyr Arg Glu	
565 570 575	
GAT CCT GAA TTC TAT GAA AAC ATG CGT ATT CAG GAA CTG GCT CAG AAT	1776
Asp Pro Glu Phe Tyr Glu Asn Met Arg Ile Gln Glu Leu Ala Gln Asn	
580 585 590	

- 32 -

ATC CAC AAA CTG ATT GTT CAC CAC AAT CTG CCG GAT CTG ATG TAT CGC	1824
Ile His Lys Leu Ile Val His His Asn Leu Pro Asp Leu Met Tyr Arg	
595 600 605	
GCA TTT GAA GTG CTG CCG ACG ATG GTA ATG ACT CCG TAT GCT GCA TTC	1872
Ala Phe Glu Val Leu Pro Thr Met Val Met Thr Pro Tyr Ala Ala Phe	
610 615 620	
CAG AAA GAG CTG CAC GGT ATG ACC GAA GAA GTT TAC CTC GAC GAA ATG	1920
Gln Lys Glu Leu His Gly Met Thr Glu Glu Val Tyr Leu Asp Glu Met	
625 630 635 640	
GTA GGT CGT ATT AAC GCC AAT ATG ATC CTT CCG TAC CCG CCG GGA GTT	1968
Val Gly Arg Ile Asn Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val	
645 650 655	
CCT CTG GTA ATG CCG GGT GAA ATG ATC ACC GAA GAA AGC CGT CCG GTT	2016
Pro Leu Val Met Pro Gly Glu Met Ile Thr Glu Glu Ser Arg Pro Val	
660 665 670	
CTG GAG TTC CTG CAG ATG CTG TGT GAA ATC GGC GCT CAC TAT CCG GGC	2064
Leu Glu Phe Leu Gln Met Leu Cys Glu Ile Gly Ala His Tyr Pro Gly	
675 680 685	
TTT GAA ACC GAT ATT CAC GGT GCA TAC CGT CAG GCT GAT GGC CGC TAT	2112
Phe Glu Thr Asp Ile His Gly Ala Tyr Arg Gln Ala Asp Gly Arg Tyr	
690 695 700	
ACC GTT AAG GTA TTG AAA GAA GAA AGC AAA AAA	2145
Thr Val Lys Val Leu Lys Glu Glu Ser Lys Lys	
705 710 715	

(2) 配列番号 6 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 715 amino acids
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

- 33 -

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

```

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

```


- 35 -

Trp Pro Leu Arg Ser Asp Ser Thr Trp His Gly Phe Lys Asn Ile Asp
 465 470 475 480
 Asn Glu His Met Tyr Leu Asp Pro Ile Lys Val Thr Leu Leu Thr Pro
 485 490 495
 Gly Met Glu Lys Asp Gly Thr Met Ser Asp Phe Gly Ile Pro Ala Ser
 500 505 510
 Ile Val Ala Lys Tyr Leu Asp Glu His Gly Ile Val Val Glu Lys Thr
 515 520 525
 Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr
 530 535 540
 Lys Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ala Leu Thr Asp Phe Lys Arg Ala Phe
 545 550 555 560
 Asp Leu Asn Leu Arg Val Lys Asn Met Leu Pro Ser Leu Tyr Arg Glu
 565 570 575
 Asp Pro Glu Phe Tyr Glu Asn Met Arg Ile Gln Glu Leu Ala Gln Asn
 580 585 590
 Ile His Lys Leu Ile Val His His Asn Leu Pro Asp Leu Met Tyr Arg
 595 600 605
 Ala Phe Glu Val Leu Pro Thr Met Val Met Thr Pro Tyr Ala Ala Phe
 610 615 620
 Gln Lys Glu Leu His Gly Met Thr Glu Glu Val Tyr Leu Asp Glu Met
 625 630 635 640
 Val Gly Arg Ile Asn Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val
 645 650 655
 Pro Leu Val Met Pro Gly Glu Met Ile Thr Glu Glu Ser Arg Pro Val
 660 665 670
 Leu Glu Phe Leu Gln Met Leu Cys Glu Ile Gly Ala His Tyr Pro Gly
 675 680 685
 Phe Glu Thr Asp Ile His Gly Ala Tyr Arg Gln Ala Asp Gly Arg Tyr
 690 695 700

- 36 -

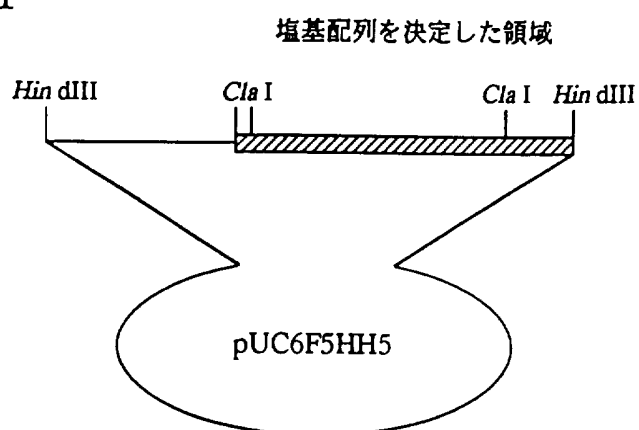
Thr	Val	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Lys	Lys
705					710					715

請求の範囲

1. 配列表配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子。
2. 遺伝子が配列表配列番号3に示される1005番目から3143番目に至る塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。
3. 前記アミノ酸配列において、リジンデカルボキシラーゼ活性を実質的に損なわない1つまたは複数個のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を有する請求項1記載の遺伝子。
4. L-リジン生産能を有し、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられているエシェリヒア属に属する微生物。
5. 前記微生物がエシェリヒア・コリである請求項4記載の微生物。
6. 請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子及び／またはcadA遺伝子の発現が抑えられたことにより、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられている請求項4記載の微生物。
7. 請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子及び／またはcadA遺伝子が破壊されることにより、該遺伝子の発現が抑えられている請求項6記載の微生物。
8. 塩基配列中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位により請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子及び／またはcadA遺伝子が破壊された請求項6記載の微生物。
9. L-リジン生産能を有し、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられているエシェリヒア属に属する微生物を液体培地に培養し、培養液中にL-リジンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-リジンの製造法。
10. 前記微生物が、請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子及び／またはcadA遺伝子の発現が抑えられたことにより、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失させられている請求項9記載の方法。

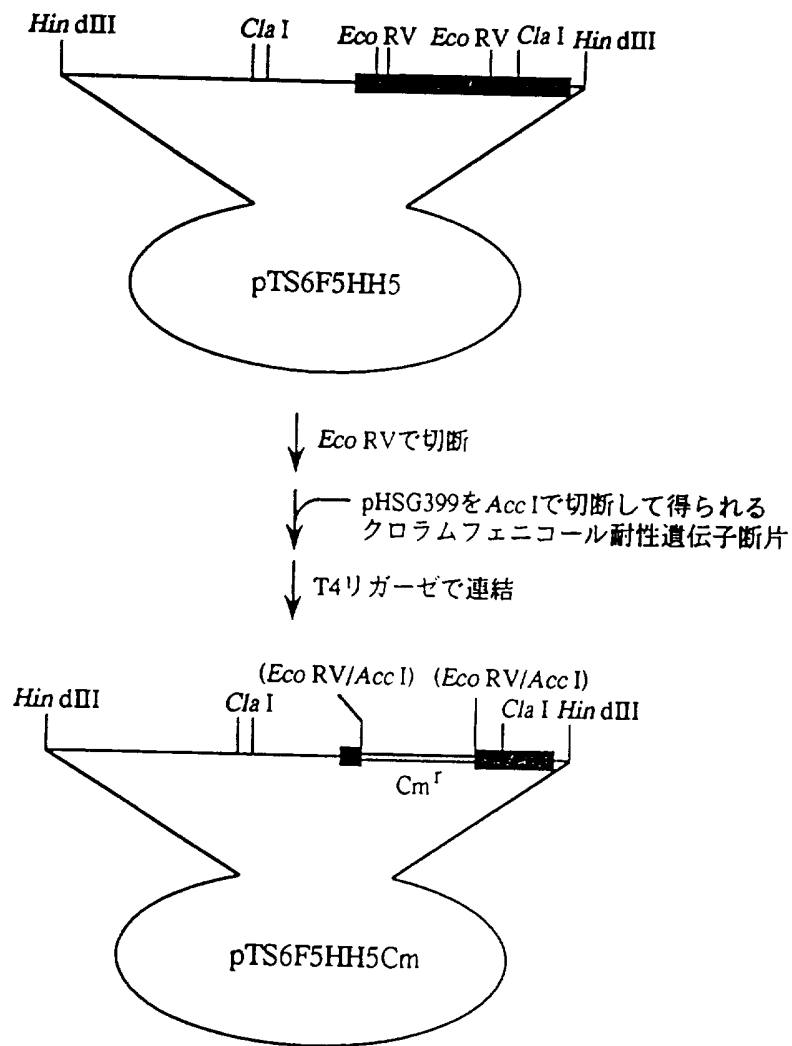
1 / 3

図 1



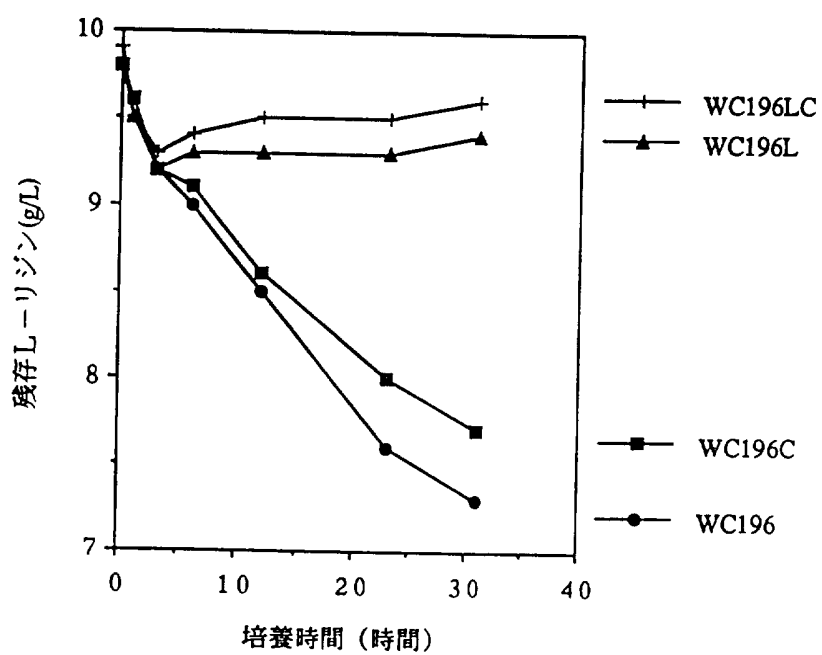
2 / 3

図 2

新規なりジンデカルボキシラーゼの
コーディング領域

3 / 3

図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N9/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N9/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STIM K. P. Nucleotide sequence of the ADI gene which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of Escherichia-coli J. Bacteriol., 1993, Vol. 175, No. 5, p. 1221-1234	1 - 3
A	MENG. S-Y, Nucleotide sequence of the Eseherichia-coli, CAD operon a system for Neutralization of low extracellular PH, J. Bacteriol., 1992, Vol. 174, No. 8, p. 2659-2669	1 - 10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 8, 1996 (08. 02. 96)

Date of mailing of the international search report

March 5, 1996 (05. 03. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl.⁸ C12N15/00, C12N9/88		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl.⁸ C12N15/00, C12N9/88		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS PREVIEWS, CAS		
C. 関連すると認められる文献		
参考文献の カテゴリー*	参考文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	STIM K. P. Nucleotide sequence of the ADI gene which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of Escherichia-coli J. Bacteriol., 1993, Vol. 175, No. 5 p. 1221-1234	1-3
A	MENG, S-Y, Nucleotide sequence of the Escherichia-coli, CAD operon a system	1-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 参考文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08.02.96	国際調査報告の発送日 05.03.96	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	for Neutralization of low extracellular PH, J. Bacteriol., 1992, Vol. 174 No. 8 p. 2659-2669	