



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101080490 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 15

(21) 申请号 200580042983. 4

C12P 23/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 12. 12

A61K 38/45 (2006. 01)

(30) 优先权数据

04029529. 7 2004. 12. 14 EP

(56) 对比文件

WO 02/099095 A2, 2002. 12. 12, 全文.

WO 00/01649 A1, 2000. 01. 13, 全文.

CN 1234445 A, 1999. 11. 10, 全文.

Humbelin M 等人. Genetics

of isoprenoid biosynthesis

in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*.

Gene 297. 2002, 297129-139.

Houten S M 等人. Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529. 2000, 152919-32.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 06. 14

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/EP2005/013282 2005. 12. 12

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/063752 EN 2006. 06. 22

(73) 专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

地址 荷兰海尔伦

审查员 许欣嘉

(72) 发明人 白仁远 马卡斯·维斯

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006. 01)

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12Q 1/48 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 20 页

序列表 19 页 附图 3 页

(54) 发明名称

改进的甲羟戊酸激酶

(57) 摘要

本发明涉及经过修饰的甲羟戊酸激酶以及编码它们的多核苷酸, 所述甲羟戊酸激酶对于反馈抑制具有更小的敏感性。本发明还涉及包含这些多核苷酸的载体, 以及含有此类载体的宿主细胞。本发明提供了用于生产这种经过修饰的酶的方法, 以及使用经过修饰的酶生产类异戊二烯化合物的方法。

CN 101080490 B

1. 一种经过修饰的甲羟戊酸激酶,其展示出的对反馈抑制的敏感性较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶要低,其中

较之所述相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,所述经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列被对应于 SEQ ID NO :1 所示的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列而言选自下述组的突变或突变组合突变:

P55L、C117S;

F59S;

N66K、I152M;

K83E、S249P;

H111N、K375N;

L106P、S218P ;或

I142N、L158S、L231I、T367S。

2. 如权利要求 1 所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶,其中所述未经修饰的甲羟戊酸激酶来自 *Saccharomyces cerevisiae*。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶,其中所述反馈抑制是由法呢基二磷酸酯和双香叶基二磷酸酯造成的反馈抑制。

4. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶,其中所述经过修饰的甲羟戊酸激酶,较之所述相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,展示出的反馈抗性为至少 10%。

5. 如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶,其中所述经过修饰的甲羟戊酸激酶,较之所述相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,包含两处取代。

6. 权利要求 5 所述的甲羟戊酸激酶,其中所述两处取代是在对应于 SEQ ID NO :1 所示序列的氨基酸位置 66 和 152 处的氨基酸位置的两处取代。

7. 如权利要求 6 所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶,其中在对应于 SEQ ID NO :1 所示序列的第 66 位的氨基酸位置的取代由赖氨酸对天冬酰胺的替换构成,在对应于 SEQ ID NO :1 所示序列的第 152 位的氨基酸位置的取代由甲硫氨酸对异亮氨酸的替换构成。

8. 如权利要求 1 至 7 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶,其中所述未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列是 SEQ ID NO :1。

9. 一种多核苷酸,其核苷酸序列编码如权利要求 1 至 8 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶。

10. 如权利要求 9 所述的多核苷酸,其中编码经过修饰的甲羟戊酸激酶的所述核苷酸序列是核苷酸序列 SEQ ID NO :5。

11. 一种载体或质粒,其中包含如权利要求 9 或 10 所述的多核苷酸。

12. 一种宿主细胞,其中包含如权利要求 9 至 11 中任意一项所述的多核苷酸。

13. 如权利要求 12 所述的宿主细胞,其选自 *Escherichia*、*Paracoccus*、*Rhodobacter* 和 *Saccharomyces* 构成的组。

14. 一种用于生产如权利要求 1 至 8 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶的方法,所述方法包括:

(a) 在合适的培养基中,在允许所述经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下,培养如权

利要求 12 或 13 所述的宿主细胞 (b) 从所述细胞或从所述培养基中回收所述经过修饰的甲羟戊酸激酶。

15. 一种用于制备具有降低的对反馈抑制的敏感性的甲羟戊酸激酶的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 提供一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码第一种甲羟戊酸激酶, 该激酶展示出对反馈抑制的敏感性;

(b) 将一处或多处突变引入到所述多核苷酸序列中, 使得经过突变的多核苷酸序列编码第二种甲羟戊酸激酶, 所述第二种甲羟戊酸激酶是根据权利要求 1 至 8 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶;

(c) 将经过突变的多核苷酸插入到载体或质粒中; (d) 将步骤 (b) 或 (c) 的多核苷酸引入到合适的宿主细胞中; 以及

(e) 在允许具有降低的对反馈抑制的敏感性的、所述经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下培养所述宿主细胞。

16. 一种生产类异戊二烯化合物的方法, 所述方法包括:

(a) 在合适的培养基中, 在允许所述经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下, 培养如权利要求 12 或 13 所述的宿主细胞 (b) 从所述培养基中分离出所述类异戊二烯化合物。

17. 如权利要求 1 至 8 中任意一项所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶或如权利要求 9 或 10 所述的多核苷酸在用于探测生物流体中甲羟戊酸盐 / 酯浓度的用途。

改进的甲羟戊酸激酶

[0001] 本发明提供了经过修饰的甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase), 其对于反馈抑制具有更小的敏感性。该经过修饰的酶和编码该酶的多核苷酸可被用于生产类异戊二烯 (isoprenoid) 化合物, 用于治疗具有甲羟戊酸激酶活性降低的特征的疾病, 以及用于诊断用途。

[0002] 甲羟戊酸激酶 (MvK) 是甲羟戊酸盐 / 酯途径中必需的酶, 所述途径导致了大量细胞内类异戊二烯的产生。类异戊二烯途径的产物异戊烯二磷酸酯 (IPP), 以及同质异构化合物二甲基烯丙基二磷酸酯 (DAMPP) 是所有生物中类异戊二烯的基本构建物质。类异戊二烯包括超过 23000 种天然存在的初级和次级代谢物分子。该类天然产物的化学多样性反映了它们在生物系统中多种多样的生理作用。类异戊二烯包括, 例如细菌中的植烷三萜、泛醌和甲基萘醌, 植物中的类胡萝卜素、质体醌、单 / 一个半 / 双 / 三萜以及叶绿素的异戊二烯基 (prenyl) 侧链, 和哺乳动物中的血红素 A、醌、多萜醇、固醇 / 类固醇和类维生素 A。此外, 类异戊二烯还涉及异戊烯 tRNA、蛋白质异戊烯化以及胆固醇修饰, 例如对刺猬类的细胞信号蛋白质进行的。

[0003] 在调控的方面, 人们普遍认为 HMG-CoA 还原酶是甲羟戊酸盐 / 酯途径中的速度决定酶 (例如, Goldstein and Brown, Nature 343, 425-430, 1990; Weinberger, Trends Endocrinol. Metab. 7, 1-6, 1996; Hampton et al., TrendBiochem. Sci. 21, 140-145, 1996; Houten et al., J. Biol. Chem. 278, 5736-5743, 2003)。与该观点一致的是, 向培养基中添加甲羟戊酸盐 / 酯已显示出能激活 *Phaffia rhodozyma* (Calo et al., Biotechnol. Lett. 17, 575-578, 1995) 和 *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi et al., J. Ferment. Bioeng. 71, 335-339, 1991) 中的类胡萝卜素生产。但是, 近年来更多的证据显示, 甲羟戊酸激酶会受到反馈抑制, 例如下游产物, 香叶基二磷酸酯 (geranyldiphosphate)、法呢基二磷酸酯 (farnesyldiphosphate)、双香叶基二磷酸酯 (geranylgeranyldiphosphate) 所造成的反馈抑制。这种反馈抑制还可在对甲羟戊酸盐 / 酯途径的调控和速度限制中发挥作用, 因此, 通常对类异戊二烯的生物合成的调控和速度限制发挥作用。

[0004] 在人类中, 甲羟戊酸激酶的重要性是通过如下事实来展示的: 它的缺乏是下述人类遗传疾病的生物化学和分子诱因, 所述疾病包括甲羟戊酸尿症、超免疫球蛋白 D 症以及周期性发热综合征 (Houten et al., 2000; Nwokoro et al., Mol. Genet. metab. 74, 105-119, 2001)。上述疾病的病原生理学尚属未知, 但最终发现其与甲羟戊酸激酶在体内的作用以及与急相反应和发热有关的类异戊二烯生物合成有关。甲羟戊酸激酶缺乏看上去还与例如 Zellweger 综合征和肢近端型点状软骨发育不良 (rhizomelic chondrodysplasia punctata) 有关, 这是过氧化物酶生物合成紊乱的疾病, 其中, 一组过氧化物酶 (包括甲羟戊酸激酶), 不能被转运到过氧化物酶体中 (Kelley and Herman, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2, 299-341, 2001)。最后, 甲羟戊酸激酶被认为在细胞内增殖、细胞周期调控和 / 或细胞内转化中发挥作用 (见 Graef et al., virology 208, 696-703, 1995; Hinson et al., J. Biol. Chem. 272, 26756-26760, 1997)。

[0005] 目前研究的所有甲羟戊酸激酶都会受所述途径下游产物 (例如, 法呢基焦磷酸酯

或双香叶基焦磷酸酯)的反馈抑制。

[0006] 因此,本发明的一个目的是提供经过修饰的甲羟戊酸激酶,其对反馈抑制具有更小的敏感性或者对反馈抑制具有抗性,或者相对于未经修饰的甲羟戊酸激酶,对反馈抑制的敏感性降低,即,具有改进的催化性质。对反馈具有抗性的甲羟戊酸激酶可能具有工业潜力,例如(1)在用生物技术对所有类型的类异戊二烯化合物(例如,类胡萝卜素、辅酶 Q10、维生素 D、固醇等)进行的生产中,(2)作为具有诊断用处的酶,用于,例如,用酶测量生物流体中的甲羟戊酸盐/酯浓度,或(3)作为治疗用酶,用于降低甲羟戊酸尿症病患的甲羟戊酸盐/酯浓度。对反馈具有抗性的甲羟戊酸激酶特别适于对类异戊二烯进行生物技术途径的生产,因为它们能使得甲羟戊酸盐/酯途经具有更大的通量,因此使得类异戊二烯产量更高。

[0007] 特别地,本发明涉及经过修饰的甲羟戊酸激酶,其较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,展示出降低的对反馈抑制的敏感性,其中

[0008] (i) 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列含有至少一处突变,以及

[0009] (ii) 所述至少一处突变位于选自对应于 SEQ ID NO :1 所示的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的 55、59、66、83、106、111、117、142、152、158、218、231、249、367 和 375 位的氨基酸位置构成的组的一处或多处氨基酸位置。

[0010] 就本发明的目的而言,任何能够催化甲羟戊酸盐/酯(甲羟戊酸)向 5-磷酸甲羟戊酸盐/酯(5-磷酸甲羟戊酸)的磷酸化反应或催化甲羟戊酸盐/酯类似物(例如,Wilde and Eggerer, *Eur. J. Biochem.* 221, 463-473, 1994 所述的)向相应的磷酸化化合物的磷酸化反应,并且展示出对反馈抑制的敏感性的酶都可作为甲羟戊酸激酶使用。

[0011] 术语“野生型酶”或“野生型甲羟戊酸激酶”因此表示展示出对反馈抑制的敏感性的任何甲羟戊酸激酶,其可作为起始点用于设计(更多的)根据本发明的反馈抗性突变体。此类野生型酶可以是,例如,从自然界获得的甲羟戊酸激酶/甲羟戊酸激酶序列,或者合成的甲羟戊酸激酶的变体,其可根据本发明的任何教导被制成具有(更多)反馈抗性的。此类甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的例子包括可在公众可获得的数据库,例如 Swiss-Prot 中发现的那些。优选的是与图 1 或表 3 所示的任何氨基酸序列(包括例如 SEQ ID NOs :1 和 6,或 SEQ ID NO :8)同源或相同的此类野生型酶。“同源”指与图 1 所示的氨基酸序列(包括例如 SEQ ID NOs :1 和 6,或 SEQ ID NO :8)中的一种或多种至少约 60%相同,优选至少约 70%相同,更优选至少约 80%相同,进一步更优选至少约 90%相同,最优选至少约 95%相同。术语“野生型甲羟戊酸激酶”和“未经修饰的甲羟戊酸激酶”在本文中可互换使用。

[0012] 如果需要的话,可加入合适的磷酸供体,以提供对甲羟戊酸盐/酯(或甲羟戊酸盐/酯类似物)的磷酸化。不同的化合物都可作为用于甲羟戊酸激酶的磷酸供体,例如,ATP、TTP、ITP、GTP、UTP 或 CTP(见 Gibson et al., *Enzyme* 41, 47-55, 1989)。最优选的磷酸供体是 ATP(5' - 三磷酸腺苷)。

[0013] 本领域已知的术语“%相同”表示多肽或多核苷酸序列间的相关程度,这可以通过对上述序列排列起来达成的匹配进行测定得到的。用已知的方法可对“相同性”很容易地进行测定,例如用程序 GAP(GCGWisconsin Package, 10.2 版, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA92121-3752, USA)来进行,其中使用如下参数:缺口产生罚

分 8, 缺口延伸罚分 2 (缺省参数); 用程序“PILEUP” (GCG Wisconsin Package, 10.2 版, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA) 来进行, 其中使用例如下述参数: 缺口产生罚分 12, 缺口延伸罚分 4 以及 blosum62. cmp 矩阵 (缺省参数); 或者用程序 ClustalW (1.7 版, EMBL, Heidelberg, Germany), 其中使用 BLOSUM 交换矩阵。此类序列比对由本领域技术人员按常规进行 (例如, Cho et al., J. Biol. Chem. 276, 12573-12578, 2001)。

[0014] “至少一处突变”表示, 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶可含有一处或多处突变, 即, 一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五等 (或更多) 处突变, 包括在上文提到的位置处的至少一处突变。

[0015] 就本发明的目的而言, “突变体”、“突变体酶”或“突变体甲羟戊酸激酶”将表示下述变异体中的任何一种: 所述变异体是从给定的野生型酶 / 甲羟戊酸激酶获得的, 并且, 较之分别相应的野生型酶, 具有 (更多) 对反馈的抗性, 或具有对反馈抑制的降低的敏感性。突变体可以通过本领域已知的任何方法获得, 例如, 通过定点诱变、饱和诱变、随机诱变 / 直接进化、对整个细胞或生物的化学或 UV 诱变、设计合成基因、和 / 或体外 (无细胞) 翻译 (见, 例如, Jermutus et al., Curr. Opin. Biotechnol. 9, 534-548, 1998; Betton, curr. Prot. Pept. Sci. 4, 73-80, 2003; Martin et al., Biotechniques 31, 948-, 2001)。如何获得突变体是没有影响的。

[0016] 本文中使用的“反馈抑制”包括类异戊二烯生物合成中甲羟戊酸盐 / 酯的下游代谢产物对甲羟戊酸激酶的酶活造成的任何抑制。类异戊二烯生物合成中甲羟戊酸盐 / 酯的下游代谢产物包括但不限于: 5-磷酸甲羟戊酸盐 / 酯、异戊烯二磷酸 (IPP)、3, 3-二甲基烯丙基二磷酸酯 (DAMPP)、香叶基二磷酸酯 (GPP)、法呢基二磷酸酯 (FPP)、双香叶基二磷酸酯 (GGPP)、法呢醇、磷酸多萜醇和植基焦磷酸酯 (Dorsey and Proter, J. Biol. chem. 243, 4667-4670, 1968; Flint, Biochem. J. 120, 145-150, 1970; Gray and Kekwick, Biochim. Biophys. Acta 279, 290-296, 1972; Hinson et al., J. Lipid Res. 38, 2216-2223, 1997)。对甲羟戊酸激酶的反馈抑制可基于对甲羟戊酸激酶进行的变构调节, 所述变构调节通过该酶与类异戊二烯生物合成中甲羟戊酸盐 / 酯下游的代谢产物的结合来进行。

[0017] 优选地, 所述反馈抑制是由法呢基二磷酸酯 (FPP) 或双香叶基二磷酸酯 (GGPP) 造成的反馈抑制。对反馈抑制的敏感性指, 例如, 对甲羟戊酸盐 / 酯途径的下游产物的生理或工业相关浓度的抑制的敏感性。

[0018] 根据本发明, 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶, 经过修饰的甲羟戊酸盐 / 酯展示出降低的对反馈抑制的敏感性。优选地, 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶对于反馈抑制的敏感性较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶 (关于测量和定量反馈抗性, 见下文) 减少了至少大约 5%, 更优选至少大约 10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%。因此, 换句话说, 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶可以展示出至少大约 5%, 优选至少大约 10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 的反馈抗性。

[0019] “反馈抗性”将表示, 对“反馈抑制” (如上文定义) 的抗性的任何增加。可通过本领域技术人员已知的不同方法对反馈抗性进行分析。在此对此类分析的一种合适的例子进行简短描述: 在活性试验中测量甲羟戊酸激酶活性, 这在甲羟戊酸盐 / 酯 (或甲羟戊酸盐

/ 酯类似物) 和 ATP(或另外的磷酸供体) 的非饱和浓度下进行, 即, 甲羟戊酸盐 / 酯 (或甲羟戊酸盐 / 酯类似物) 和 ATP(或另外的磷酸供体) 的浓度大约是使得反应速率对上述底物浓度的改变敏感的浓度, 例如, 在对上述底物进行的研究中, 浓度大约为酶的各自的 K_m 值。或者, 可在相同条件下, 存在及不存在相应浓度的反馈抑制剂 (即, 反馈抑制剂的浓度能提供对野生型甲羟戊酸激酶的显著抑制) 的情况下, 对野生型甲羟戊酸激酶和该酶的变异体 / 突变体的活性进行测量。如果反馈抑制剂造成的抑制的程度 (例如, % 抑制) 在突变体中较野生型的酶低, 那么该突变体在本专利申请文件的上下文中就是反馈抗性的。一旦鉴定出了反馈抗性的变异体 / 突变体, 可以用与上文所述相同的方法来鉴定进一步改进的突变体, 即, 具有更多反馈抗性的突变体。按照如下方法来计算反馈抗性 (%): 如果 (a) 和 (b) 分别是不存在或存在反馈抑制剂 (例如 FPP) 的情况下测得的野生型酶的甲羟戊酸激酶活性, 如果 (c) 和 (d) 是分别是不存在或存在相同的反馈抑制剂的情况下测得的突变体酶的甲羟戊酸激酶活性, 那么 % 反馈抗性就是:

[0020] % 抗性 = $100((d/c)-(b/a))/(1-(b/a))$

[0021] 优选地, 反馈抗性测定于本申请中实施例 1 中所述的实验条件下。大约 3-30mU/ml (相应于大约 40-400ng/ml *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶), 优选为大约 10-20mU/ml 的甲羟戊酸激酶活性, 以及可选地, 1 μ M FPP 可存在于试验混合物中, 反应可在 25°C 下进行。

[0022] 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列, 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列含有至少一处突变。所述至少一处突变可以是添加、缺失和 / 或取代。优选地, 所述至少一处突变是氨基酸取代, 其中, 未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列中存在的给定氨基酸, 在本发明的经过修饰的氨基酸序列中被不同的氨基酸所取代。较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列, 经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列可以含有至少一处氨基酸取代。在其它实施方式中, 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列, 经过修饰的甲羟戊酸激酶含有至少两处、至少三处、至少四处或至少五处氨基酸取代。在本发明的另外的实施方式中, 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列, 经过修饰的甲羟戊酸激酶含有一至十五处、一至十二处、一至十处、一至七处、一至五处、一至四处、二至十五处、二至十二处、二至十处、二至七处、二至五处、二至四处、三至十五处、三至十二处、三至十处、三至七处、三至五处或三至四处氨基酸取代。

[0023] 根据本发明, 所述至少一处突变在选自对应于 SEQ ID NO:1 所示的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的 55、59、66、83、106、111、117、142、152、158、218、231、249、367 和 375 位的氨基酸位置构成的一组的一处或多处氨基酸位置发生。在 SEQ ID NO:1 的这些氨基酸位置上的突变的任何组合, 即, 在对应于上述氨基酸位置中的至少两处、至少三处、至少四处、至少五处、至少六处、至少七处、至少八处、至少九处、至少十处、至少十一处、至少十二处、至少十三处、至少十四处或者至少全部十五处的位置的突变, 可被选用为所述至少一处突变的目标, 以产生上文定义的经过修饰的甲羟戊酸激酶。优选地, 本发明提供了来自 *S. cerevisiae* 的经过修饰的甲羟戊酸激酶, 其中所述经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列包含至少一处突变, 所述突变包括在 SEQ IDNO:1 所示的 55、59、66、83、106、111、117、142、152、158、218、231、249、367 和 / 或 375 位上的一处或多处突变, 其中 SEQ ID NO:1 代表野生型氨基酸序列。

[0024] 鉴于本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶在上文定义的一处或多处氨基酸位置含有至少一处突变,其可含有在上面列出的位置之外的氨基酸位置上的其它突变。

[0025] 在一个方面,本发明涉及经过修饰的甲羟戊酸激酶,其较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶展示出对减少的反馈抑制的敏感性,其中

[0026] (i) 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列含有至少一处突变,以及

[0027] (ii) 所述至少一处突变位于选自对应于 SEQ ID NO :1 所示的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的 55、59、66、83、106、111、117、142、152、158、218、231、249、367 和 375 位的氨基酸位置构成的一组的一处或多处氨基酸位置。

[0028] SEQ ID NO :1 示出的这些位置的任何组合,即,对应于上述位置的两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或全部十五处位置可被选用为突变的目标以产生所述经过修饰的甲羟戊酸激酶。

[0029] 在一种实施方式中,所述至少一处突变位于由 SEQ ID NO :1 所示的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的 55、59、66、117 和 152 位的氨基酸位置构成的一组的一处或多处氨基酸位置。

[0030] 较之未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶可仅含一处突变,例如单处氨基酸取代。优选地,单处突变可位于选自对应于 SEQ ID NO :1 的氨基酸位置 55、59、66、117 和 152 的位置构成的一组的位置。更优选地,单处突变可以是氨基酸取代,例如 P55L、F59S、N66K、C117S 或 I152M。最优选地,取代是 F59S,即,在对应于 SEQ ID NO :1 的第 59 位的位置上,用丝氨酸取代 / 替换苯丙氨酸。

[0031] 较之未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶可含有至少两处突变,例如两处氨基酸取代。优选地,所述至少两处突变(例如,氨基酸取代)之一位于下述氨基酸位置,其对应于 SEQ ID NO :1 中选自第 55、66、83、106、111、117、152、218、249 和 / 或 375 位的位置。在两处突变(例如氨基酸取代)的情况下,优选地,两处突变位于对应于 SEQ ID NO :1 的位置组合 55/117、66/152、83/249、111/375 或 106/218 的位置。更优选地,两处突变由一处或两处氨基酸取代构成,进一步更优选地,由两处氨基酸取代构成。最优选的是两处氨基酸取代 / 替换的组合,其对应于选自 P55L/C117S、N66K/I152M、K83E/S249P、H111N/K375N 或 L106P/S218P 的 SEQ ID NO :1 位置组合。

[0032] 在一种特别优选的实施方式中,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有两处氨基酸突变,其对应于 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的 N66K/I152M 组合。更优选地,两处氨基酸是 SEQ ID NO :1 所示的未经修饰的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列中的 N66K 和 I152M。

[0033] 较之未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶可含有至少四处突变,例如四处氨基酸取代。优选地,所述至少四处突变(例如,氨基酸取代)之一位于下述氨基酸位置,其对应于 SEQ ID NO :1 中选自第 142、158、231 和 367 位的位置。在四处突变(例如氨基酸取代)的情况下,优选地,四处突变位于对应于 SEQ ID NO :1 的位置组合 142/158/231/367 的位置。更优选地,四处突变由一处、两处、三处或四处氨基酸取代构成,进一步更优选地,由四处氨基酸取代构成。最优选的是四处氨基酸取代的组合,其对应于 SEQ ID NO :1 的 142/158/231/367 位置,其是 I142N/L158S/L231I/T367S。

[0034] 最优选的是表 1 公开的突变的组合（见下文）。实施例中鉴定出的氨基酸位置可被转移至不同来源的甲羟戊酸激酶。

[0035] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶可通过向相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶引入突变来获得。

[0036] 未经修饰的甲羟戊酸激酶可以是真核来源的或原核来源的，例如动物（包括人）、植物、藻类、真菌（包括酵母）和细菌。优选地，未经修饰的甲羟戊酸激酶选自真菌（包括酵母）或细菌，更优选地，选自 *Aspergillus*、*Saccharomyces*、*Paracoccus*、*Rhodobacter* 和 *Phaffia* 构成的组。进一步更优选的是 *Aspergillus niger*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Paracoccus zeaxanthinifaciens*、*Rhodobacter sphaeroides*（例如 *R. sphaeroides* ATCC 35053）或 *Phaffia rhodozyma*，其中 *Saccharomyces cerevisiae* 是最优选的。

[0037] 在本发明的一个方面，未经修饰的甲羟戊酸激酶被 FPP 反馈抑制。FPP 对未经修饰的甲羟戊酸激酶的反馈抑制可以例如至少大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%，这是通过技术人员已知的方法来测定，例如 Popják (*Meth. Enzymol.* 15, 393-, 1969)、Gibson et al. (*Enzyme* 41, 47-55, 1989)、Hinson et al. (*J. Lipid Res.* 38, 2216-2223, 1997)、Schulte et al. (*Anal. Biochem.* 269, 245-254, 1999) 或 Cho et al. (*J. Biol. Chem.* 276, 12573-12578, 2001) 所述的。一种具体的试验是实施例 1 中所述的，其中使用不同的 FPP 浓度。

[0038] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶可包含外源氨基酸，优选是在其 N- 或 C- 末端处。“外源氨基酸”指在天然（自然界中存在的）甲羟戊酸激酶中不存在的氨基酸，优选是天然甲羟戊酸激酶中不存在的至少大约 3 个、至少大约 5 个或至少大约 7 个相邻氨基酸的片断。优选的外源氨基酸的片断包括但不限于“标签”，其能促进对重组产生的经过修饰的甲羟戊酸激酶的纯化。此类标签的例子包括但不限于 His₆ 标签、FLAG 标签、myc 标签等。

[0039] 在另一种实施方式中，较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列，经过修饰的甲羟戊酸激酶可以含有一处或多处，例如两处缺失。优选地，所述缺失影响相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的 N- 或 C- 末端的氨基酸，而不会显著减少其功能特性，例如酶的比活性。

[0040] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶通常是自然界不存在的甲羟戊酸激酶。优选地，经过修饰的甲羟戊酸激酶的比活性为相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的比活性的至少大约 10%，更优选为至少 20%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 或者甚至更多，例如大约 150%、200% 以及更多。

[0041] 用于测量比活性的方法是本领域技术人员已知的。比活性例如可通过测量 NADH 的消耗来测定。用于此类测量的合适的条件可以是实施例 1 中列出的那些，只除了：典型地，使用饱和底物浓度，或者在高底物浓度，特定实验条件下提供最大活性的底物浓度下的酶抑制的情况下。

[0042] 本发明还涉及包含下述核苷酸序列的多核苷酸，所述核苷酸序列编码根据本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶。任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸，例如，未经修饰的 RNA 或 DNA 或经过修饰的 RNA 或 DNA 可用作多核苷酸。多核苷酸包括但不限于单链或双链 DNA、作为单链或双链区域混合物的 DNA、单链或双链 RNA、作为单链或双链区域混合物的 RNA、包含 DNA 和 RNA 的杂交分子（其可以是单链的，或者更为典型地，是双链的或单链或双

链区域的混合物)。本文中使用的多核苷酸还可包括包含一种或多种不常用碱基(例如肌苷)或一种或多种经过修饰的碱基(例如经过三苯甲基化的碱基)的 DNA 或 RNA。

[0043] 本发明的多核苷酸可通过对编码未经修饰的甲羟戊酸激酶的多核苷酸加以修饰来获得,例如,从本领域已知的编码甲羟戊酸激酶的基因组或 cDNA 序列开始来构建[序列信息见相关的序列数据库,例如 Genbank(Intelligenetics, California, USA)、European Bioinformatics Institute(Hinoston Hall, Cambridge, GB)、NBRF(Georgetown University, Medical Centre, Washington DC, USA) 和 Vecbase(University of Wisconsin, Biotechnology Centre, Madison, Wisconsin, USA)],通过本领域已知的诱变方法,例如,通过例如定点诱变或基于 PCR 的方法向编码未经修饰得甲羟戊酸激酶的核苷酸序列中引入插入、缺失和/或取代(见,例如 Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。

[0044] 聚合酶链式反应(PCR)方法的原理如例如 White et al., Trends Genet. 5, 185-189, 1989 所述,其改进方法在例如 Innis et al. [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. (1990)] 中有所描述。

[0045] 经过修饰的甲羟戊酸激酶的产生可通过定点诱变来进行,这是 Hutchison 和 Edgell(J. Virol. 8, 181-189, 1971) 最初提出的方法,其包括:将带有目标核苷酸取代、缺失或添加的合成寡核苷酸退火到其中将被引入突变的单链 DNA 序列的目标区域(综述参见 Smith, Annu. Rev. Genet. 19, 423-462, 1985;改进方法参见 Stanssen et al., Nucl. Acids Res. 17, 4441-4445, 1989 的第 2-6 篇参考文献)。可用本领域已知的方法从不同的菌株/生物中分离出作为起始物质的 DNA,所述方法例如见 Sambrook et al. (Molecular Cloning)。但是,应当理解,将按照本发明构建/突变的编码甲羟戊酸激酶的 DNA 也可以在已知 DNA 序列的基础上来制备,例如,通过用本领域已知的方法构建合成基因来制备(见例如 EP 747 483 和 Lehmann et al., Prot. Eng. 13, 49-57, 2000 所述)。

[0046] 编码根据本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的多核苷酸的非限制性的例子如 SEQ ID NO:5 所示。

[0047] 本发明的多肽和多核苷酸优选以经过分离的形式提供,优选地,被纯化至均质。

[0048] 术语“经过分离的”指从其原始环境移出(例如,如果天然存在的话,天然环境)。例如,活的微生物中存在的天然存在的多核苷酸或多肽不是经过分离的,但是,与天然系统中一些或全部共存物质分离开的同样的多核苷酸或多肽就是经过分离的。此类多核苷酸可以是载体的一部分和/或此类多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,并且仍然是经过分离的,因为此类载体或组合物并非其天然环境的一部分。

[0049] 本文中使用的经过分离的多核苷酸或核酸可以是下述 DNA 或 RNA,它们与在获得它们的生物体的天然存在的基因组中紧密相连(5'末端一条和 3'末端一条)的两条编码序列并非紧密相连。因此,在一种实施方式中,核酸包括与编码序列紧密相连的 5'非编码(例如启动子)区域的一部分或全部。术语“经过分离的多核苷酸”因此包括,例如,被包括进载体、被包括进自主复制质粒或病毒、或包括进原核或真核生物的基因组 DNA 的重组 DNA,或作为单独的分子(例如,PCR 或限制性内切酶处理产生的基因组 DNA 片段或 cDNA)不依赖于其它序列存在的重组 DNA。还包括下述重组 DNA,其是编码额外多肽的杂交基因的一部分,所述多肽充分去除了细胞内物质、病毒物质或培养基(当由重组 DNA 技术生产时)或化

学前体或其它化学物质（当通过化学合成时）。此外，“经过分离的核酸片段”是天然不作为片段存在并且在自然界找不到的核酸片段。技术人员已知的传统核酸纯化方法可用于获得经过分离的多核苷酸。

[0050] 经过分离的多肽可以是充分去除了其它多肽的多肽。经过分离的多肽可以例如超过 80% 纯，优选超过 90% 纯，更优选超过 95% 纯，最优选超过 99% 纯。纯度可按照本领域已知的方法来测定，例如通过 SDS-PAGE 及随后的蛋白质染色来测定。可以通过密度测定对蛋白质条带进行定量。其它用于测定纯度的方法也在普通技术人员的技术水平范围内。

[0051] 在另一种实施方式中，本发明涉及包含根据本发明的多核苷酸的载体或质粒。优选地，该载体或质粒包含至少一种标记基因。该载体和质粒还包含与本发明的多核苷酸可操作地连接的调控元件。本文中使用的术语“可操作地连接”指核酸序列与单条核酸片段相连，使得其中一种的功能受另一种影响。例如，当启动子能影响到编码序列的表达的情况下，即编码序列受启动子的转录控制的情况下，该启动子就是与编码序列可操作地连接的。编码序列可与调控序列以正义或反义方向可操作地连接。术语“表达”指 DNA 序列向 mRNA 的转录和 / 或 mRNA 向氨基酸序列的翻译。术语“过量表达”指：经过修饰的生物（例如，通过转化和转染修饰过的）中基因产物的产量高于相应的未经修饰的生物中的生产水平。

[0052] 编码本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列向载体中的整合以便在合适的宿主细胞中过量表达被编码的多肽可以通过本领域已知的方法来进行，这在例如 Sambrook et al. (s. a.) 中有所描述。DNA 序列自身或包含本发明的 DNA 序列的载体和 / 或质粒可用于转化本发明的合适的宿主系统，以获得被编码多肽的（过量）表达。用于本发明的合适的宿主系统可选自真核或原核细胞，例如，动物（包括人）、植物、细菌或真菌（包括酵母）的细胞。此类宿主细胞的例子包括但不限于，选自链球菌、葡萄球菌、肠道球菌、藻青菌、酵母（例如 *Saccharomyces*）、担子菌、裸子植物、被子植物或细胞系（例如 *Drosophila* S2、*Spodoptera* Sf9、CHO、COS、HeLa、3T3、BHK、HK293 [人类肾脏 293 细胞系???] 和 CV-1）构成的组的细胞。

[0053] 用于在植物中表达的方法是由例如 Pen et al. 在 *Bio/Technology* 11, 811-814, 1994 中或在 EP 449 375 中所述，优选地，在例如 EP 449 376 所述的种子中。一些合适的启动子和终止子包括来自胭脂氨酸合酶 (nos)、章鱼碱合酶 (ocs) 和烟草花叶病毒 (CaMV) 基因的那些。可以使用的一类有效的植物启动子是高水平植物启动子。与本发明的遗传序列可操作地连接的此类启动子，应当能够提高本发明基因产物的表达。可用于本发明的高水平的植物启动子包括核酮糖 -1,5- 二磷酸羧化酶的小亚基，例如来自大豆的 (Berry-Lowe et al., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 483-498, 1982)，以及叶绿素 a/b 结合蛋白的启动子。

[0054] 本发明范围内的真菌宿主细胞可例如选自 *Aspergilli* (例如 *Aspergillus niger* 或 *Aspergillus oryzae*)、*Trichoderma* (例如 *Trichoderma reesei*)、*Saccharomyces* (例如 *Saccharomyces cerevisiae*)、*Pichia* (例如 *Pichiapastoris*) 或 *Hansenula* (例如 *Hansenula polymorpha*, 优选地 *H. polymorpha* DSM 5215)。本发明范围内的细菌宿主细胞可以例如选自 *Paracoccus* (例如 *Paracoccus zeaxanthinifaciens*)、*Rhodobacter* (例如 *R. sphaeroides*)、*Escherichia* (例如 *E. coli*)、*Bacillus* (例如 *Bacillus subtilis*)、*Streptomyces* (例如 *Streptomyces lividans*) (见, 例如 Anne and van Mellaert in *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 121-128, 1993)。可以使用的优选的 *E. coli* 菌株选自例如 *E. coli*

K12 菌株,例如 M15(Villarejo et al. 在 J.Bacteriol.120,466-474,1974 中所述的 DZ 291)、HB101(ATCC No.33694)或 E.coli SG13009(Gottesman et al., J.Bacteriol.148, 265-273,1981)。本领域技术人员知道上述微生物可从任何保藏机构获得,例如列于“Industrial Property”(vol.1,pages 29-40,1991)刊物或 European Patent Office 官方刊物(vol.4,pages 155/156,2003)中的。

[0055] 取决于宿主系统,可使用不同载体,所述载体包含根据本发明的多核苷酸。可用于在真菌中表达的载体的非限制性例子是本领域已知的,对其描述例如见 EP 420 358,或者 Cullen et al. (Bio/Technology 5,369-376,1087)、Ward(在 Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi, Marcel Dekker, New York,1991)、Upshall et al. (Bio/Technology 5,1301-1304,1987)、Gwynne et al. (Bio/Technology 5,71-79,1987)或 Punt et al. (J.Biotechnol.17,19-34,1991),对酵母而言,见 Sreekrishna et al. (J.Basic microbiol.28,265-278,1988;Biochemistry 28, 4117-4125,1989)、Hitzemann et al. (Natur 293,717-722,1981)或 EP183070、EP183071、EP 248227、EP263311。可用于在 E.coli 中表达的载体的非限制性例子由例如 Sambrook et al. [s.a] 或 Fiers et al. 在 Proc.8th Int.Biotechnol. Symp. [Soc.Franc.de Microbiol., Paris(Durand et al., eds.), pp.680-697,1988]、Bujard et al. (在 Meth. Enzymol., eds.Wu and Grossmann, Academic Press, Inc., vol.155,416-433,1987)或 Stüber et al. (在 Immunological Methods,eds.lefkovits and Pernis,Academic Press, In.,Vol.IV,121-152,1990)提到过。可用于在杆菌中表达的载体是本领域内已知的,其被描述于,例如 EP 207459 或 EP405370, yansura and Henner 在 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,439-443(1984)或 Henner, Le Grice and Nagarajan 在 Meth.Enzymol.185,199-228, 1990 中。可被用于在 H.polymorpha 中表达的载体是本领域内已知的,其被描述于,例如 Gellissen et al., Biotechnology 9,291-295,1991 中。

[0056] 此类载体可以已经带有调控元件,例如启动子,或者,本发明的 DNA 序列可被改造为含有此类元件。可用的合适的启动子元件是本领域内已知的,例如是:用于 Trichoderma reesei 的 cbh1-(Haarki et al., Biotechnology 7,596-600,1989)或 pki1-启动子(Schindler et al., Gene 130,271-275,1993),用于 Aspergillus oryzae 的 amy-启动子(Christensen et al., Abstr.19th Lunteren lecturers on Molecular Genetics F23(1987);Christensen et al., Biotechnology 6,1419-1422,1988;Tada et al., Mol. Gen. Genet. 229,301-306,1991),用于 Aspergillus niger 的 glaA-(Cullen et al., Bio/Technology5,369-376,1987;Gwynne et al., Bio/Technology 5,713-719,1987;Ward 在 Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi, Marcel Dekker, New York,83-106,1991)、alcA-(Gwynne et al., Bio/Technology 5, 718-719,1987)、suc1-(Boddy et al., Curr.Genet.24,60-66,1993)、aphA-(macRae et al., Gene 71,339-348,1988;macRae et al., Gene 132,193-198,1993)、tpiA-(McKnight et al., Cell 46,143-147,1986;Upshall et al., Bio/Technology 5,1301-1304,1987)、gpdA-(Punt et al., Gene 69,49-57,1988;Punt et al., J.Biotechnol.17,19-37,1991)和 pkiA-启动子(de Graaff et al.,Curr.Genet.22,21-27,1992)。可用于在酵母中表达的合适的启动子元件是本领域内已知的,例如,用于在 Saccharomyces cerevisiae 中表达

的 *pho5*-启动子 (Vogel et al., *Mol. Cell. Biol.* 9, 2050-2057, 1989; Rudolf and Hinnen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1340-1344, 1987) 或 *gap*-启动子, 以及, 例如, 用于 *Pichia pastoris* 的 *aox1*-启动子 (Koutz et al., *Yeast* 5, 167-177, 1989; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.* 28, 265-278, 1988), 或用于 *H. polymorpha* 的 *FMD* 启动子 (Hollenberg et al., EPA No. 0299108) 或 *MOX* 启动子 (Ledeboer et al., *Nucleic Acids Res.* 13, 3063-3082, 1985)。

[0057] 合适的启动子包括天然和合成启动子, 例如 Giacomini et al. 所述的合成启动子 (*Gene* 144, 17-24, 1994)。对于通过合适的质粒或通过编码甲羟戊酸激酶的 DNA 序列到染色体 DNA 中的整合, 在细菌中表达所要求保护的 (突变体) 甲羟戊酸激酶的合适的教导在很多地方都能发现, 例如, 美国专利 No. 6322995。

[0058] 本发明还涉及生产本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的方法, 所述方法包括:

[0059] (a) 在允许本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下, 培养本发明的宿主细胞, 以及

[0060] (b) 从细胞或从培养基中回收经过修饰的甲羟戊酸激酶。

[0061] 可从经过遗传改造的宿主细胞来制备本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶。

[0062] 为对本发明的多肽进行重组生产, 可对宿主细胞进行遗传改造, 以引入本发明的多核苷酸或载体或质粒。可用很多种标准实验手册中所述的方法, 来将多核苷酸或载体引入宿主细胞, 例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、微注射、阳离子脂质介导转染、电穿孔、转导、弹道 (ballistic) 引入和感染 (例如见 Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) 和 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。

[0063] 任何适合于在宿主中维持、遗传和表达多核苷酸和 / 或表达多肽的系统或载体可被用于表达 / 生产本发明的甲羟戊酸激酶, 这包括前文所述的那些以及其它一些。

[0064] 在真核重组表达系统中, 为将翻译出的蛋白质分泌到内质网内腔、胞质间隙或细胞外环境, 可将合适的分泌信号包括进被表达的多肽。上述信号可以是与多肽是内源的, 或者它们可以是异源信号。

[0065] 通过公知方法, 可从重组细胞培养物中对本发明的多肽进行回收及纯化, 所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱以及羟磷灰石色谱。在一种实施方式中, 用高效液相色谱来进行纯化。当多肽在分离和 / 或纯化期间被变性的情况下, 用于蛋白质重新折叠的公知技术可被用于重新产生具有活性的构象。蛋白质纯化的方法被描述于, 例如 Deutscher, *Protein Purification*, Academic Press, New York, 1990 和 Scopes, *Protein Purification*, Springer Verlag, heidelberg, 1994 中。

[0066] 可以使用一系列的培养方法来生产本发明的蛋白质。例如, 对从重组微生物宿主中过量表达的特定基因产物的大规模生产, 可以通过例如分批、补料分批、连续或半连续的培养方法来生产。多种培养方法的细节见 Thomas D. Brock 在 *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., 或 Deshpande, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36, 227-234, 1992 中所述。

[0067] 发酵培养基可以含有合适的含碳底物,其包括但不限于,单糖,例如葡萄糖和果糖,寡糖,例如乳糖或蔗糖,多糖,例如淀粉或纤维素,或者它们的混合物,以及来自可更新给料的未经纯化的混合物。预期中,用于本发明的碳源可以包含多种不同的含碳底物,其仅取决于对生物的选择。

[0068] 本发明还涉及制备对反馈抑制的敏感性降低的、经过修饰的甲羟戊酸激酶的方法,所述方法包括如下步骤:

[0069] (a) 提供一种多核苷酸,所述多核苷酸编码第一种甲羟戊酸激酶,该激酶展示出对反馈抑制的敏感性;

[0070] (b) 将一种或多种突变引入到所述多核苷酸序列中,使得经过突变的多核苷酸序列编码第二种甲羟戊酸激酶,较之第一种甲羟戊酸激酶,其含有至少一处氨基酸突变,其中,所述至少一处氨基酸突变位于选自自由对应于 SEQ ID NO:1 所示的 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的 55、59、66、83、106、111、117、142、152、158、218、231、249、367 和 375 位的氨基酸位置构成的组的一处或多处氨基酸位置;

[0071] (c) 可选地,将经过突变的多核苷酸插入到载体或质粒中;

[0072] (d) 将步骤 (b) 或 (c) 的多核苷酸引入到合适的宿主细胞中;以及

[0073] (e) 在允许所述对反馈抑制的敏感性降低的、经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下培养所述宿主细胞。

[0074] 该方法的优选的实施方式与经过修饰的甲羟戊酸激酶、编码它们的多核苷酸、载体和质粒、宿主细胞以及本文中描述的方法的优选实施方式相对应。第一种和第二种甲羟戊酸激酶分别对应于未经修饰的和经过修饰的甲羟戊酸激酶(见上文)。

[0075] 本发明还涉及生产类异戊二烯化合物的方法,所述方法包括:

[0076] (a) 在合适的培养基中,允许经过修饰的甲羟戊酸激酶在宿主细胞中表达的条件下,培养本发明的宿主细胞;以及

[0077] (b) 可选地,从培养基中分离出类异戊二烯化合物。

[0078] 优选地,本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶用于增加类异戊二烯的生产。

[0079] 上述方法可被用于对任何类型的类异戊二烯化合物或类异戊二烯进行生物技术方式的生产。可从甲羟戊酸盐/酯获得的任何或全部代谢产物以及异戊烯基大分子都可用作本专利申请文件上下文中的“类异戊二烯”。这些类异戊二烯是通过自然或非自然途径(即,自然界中不发生,但可以通过生物技术方法来进行),优选通过生物化学途径产生的。此类类异戊二烯的非限制性例子包括:植烷三萜、醌、类胡萝卜素、单/一个半/双/三萜、叶绿素的异戊二烯基侧链、血红素A、长醇、固醇/类固醇、类维生素A和橡胶或橡胶衍生物,优选地,天然橡胶(=顺-1,4-聚异戊二烯;Mooibroek & Cornish, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 355-365, 2000)。

[0080] 本发明范围内的醌可选自例如,泛醌(=辅酶Q)、甲基萘醌、质体醌和葱醌,优选地,辅酶Q6、辅酶Q7、辅酶Q8、辅酶Q9、辅酶Q10或辅酶Q11,最优选地为辅酶Q10(Clarke, *Protoplasma* 213, 134-147, 2000; Han et al., *Plant Cell Tissue Organ Culture* 67, 201-220, 2001; Kawamukai, *J. Biosci. Bioeng.* 94, 511-517, 2002)。本发明范围内的类胡萝卜素可选自,例如,八氢番茄红素、番茄红素、 α -/ β -/ γ -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质、 β -隐黄质、金盏花黄质、海胆酮、角黄素、虾青素及其衍生物

(Misawa & Shimada, *J. Biotechnol.* 59, 169-181, 1998; Miura et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1226-1229, 1998; Hirschberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 186-191, 1999; Margalith, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 431-438, 1999; Schmidt-Dannert, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 255-261, 2000; Sandmann, *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 4-12, 2001; Lee & Schmidt-Dannert, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 1-11, 2002)。本发明范围内的固醇可选自, 例如, 麦角固醇、胆固醇、氢化可的松 (Ménard Szczebara et al., *Nature Biotechnol.* 21, 143-149, 2003)、维生素 D、25-羟基-维生素 D₃、膳食植物固醇 (Ling & Jones, *Life Sci.* 57, 195-206, 1995) 和天然表面活性剂 (Holmberg, *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 6, 148-159, 2001) 及其衍生物。

[0081] 用于生产上文定义的一类异戊二烯或类异戊二烯化合物的合适的宿主细胞是所有类型的可用于遗传修饰的生物, 其例如, 细菌、真菌 (包括酵母)、藻类、植物或动物 (包括人) 细胞。这些细胞可以与上文关于用于表达本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶所定义的定义的相同。遗传和代谢工程的方法是本领域技术人员已知的 (例如 Verpoorte et al., *Biotechnol. Lett.* 21, 467-479, 1999; Verpoorte et al., *Transgenic Res.* 9, 323-343, 2000; Barkovich & Liao, *Metab. Eng.* 3, 27-39, 2001)。类似地, 针对类异戊二烯和类异戊二烯化合物的 (可能) 合适的纯化方法是本领域中公知的。

[0082] 用于对根据本发明的类异戊二烯进行生物技术生产的方法 / 工艺可通过例如上述的全细胞发酵方法, 透性化 (permeabilized) 宿主细胞, 粗制的细胞提取物, 通过任何合适方法 (例如, 离心或过滤) 从细胞残余物中分离的细胞提取物, 或者甚至是用经过分离的酶进行的重构反应途径来进行。上述方法的组合也在本发明的范围内。在无细胞生物合成的情况下 (例如重构反应途径), 无论经过分离的酶是怎么制备的 (例如分离自宿主细胞的, 或体外转录 / 表达的或通过本领域其它已知方法来制备的) 都没有影响。

[0083] 使用上文所述的经过修饰的 Mvk 对类异戊二烯 (例如辅酶 Q₁₀) 的生产, 较之未经修饰的 Mvk 对同样的类异戊二烯的生产可能提高例如至少大约 1%、2%、5%、10%、15%、20%、30% 或更多。测量给定的样品中类异戊二烯化合物的浓度的一种方法被描述于实施例 5 中。

[0084] 本发明的另一方面是本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶或本发明的多核苷酸在制备治疗与甲羟戊酸激酶活性降低相关的疾病的药物中的用途。此类疾病包括但不限于, 甲羟戊酸尿症、超免疫球蛋白 D 症以及周期性发热综合征。将本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶作为治疗用酶施用是优选的。施用的合适方式包括口服、肠道外、腹膜内和 / 或皮下施用。本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶或其盐可被配制为药物组合物 (例如, 小粒、酶晶体、药片、药丸、胶囊、注射剂、溶液等), 所述组合物包含至少一种单独存在的此类酶, 或者其与药学上可接受的载体、赋形剂和 / 或稀释剂的混合物。药物组合物可按照传统方法来配制。对于任何特定病人可使用特定剂量水平, 这取决于一系列的因素, 包括所用的特定化合物的活性、年龄、体重、健康状况、性别、膳食、施用时间、施用途径、排泄速率、药物组合以及治疗所针对的特定疾病的严重程度。

[0085] 本发明的多核苷酸可被用于基因治疗方案。

[0086] 本发明的另一个方面是本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶或本发明的多核苷酸在测定生物流体中甲羟戊酸盐 / 酯浓度中的用途。生物流体的非限制性的例子包括血液、

血清、血浆、脑脊液、尿液、泪液、汗液以及细胞内、细胞间和 / 或细胞外的其它任何流体。

[0087] 本发明的一种目的是提供包含编码上文所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶的核酸序列的多核苷酸、包含此类多核苷酸的载体（优选是表达载体）、经过此类多核苷酸或载体转化的宿主细胞、用于制备本发明甲羟戊酸激酶的方法（其中如前文所述的宿主细胞被培养于合适的培养条件下，通过本领域已知的方法将甲羟戊酸激酶从此类宿主细胞或培养基中分离出来）以及用于对类异戊二烯进行生物技术方式的生产的方法，所述方法基于宿主细胞来进行，所述宿主细胞已经过了此类多核苷酸或载体的转化和 / 或已将此类多核苷酸稳定整合进其染色体中。

[0088] 本发明的另一个目的是提供 (i) 编码甲羟戊酸激酶的 DNA 序列，所述激酶带有本发明的特定突变中的至少一种，所述 DNA 序列能在标准条件下与本发明的经过特定修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列中的任何一种杂交，或 (ii) 编码甲羟戊酸激酶的 DNA 序列，所述激酶带有本发明的特定突变中的至少一种，但是由于遗传密码子的简并性，所述 DNA 序列在标准条件下不能与本发明的经过特定修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列中的任何一种杂交，但其编码的氨基酸序列与能与本发明的经过特定修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列中的任何一种杂交的 DNA 序列所编码的完全相同，或 (iii) 上述 DNA 序列的片段，所述片段保留有其来源多肽的活性特征。

[0089] 用于杂交的“标准条件”在上下文中表示：本领域的技术人员通常用来探测特异性杂交信号的条件，其被描述于，例如 Sambrook et al., “Molecular Cloning”, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, New York 中；或者：优选地，本领域技术人员所熟悉的所谓严谨杂交条件和非严谨清洗条件，或更优选地，所谓的严谨杂交条件和严谨清洗条件，其被描述于 Sambrook et al. (s. a.) 中。严谨杂交条件的一个特别的例子是：在包含 50% 甲酰胺、5x SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH 7.6)、5x Denhardt's 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20 μ g/ml 变性剪切鲑鱼精 DNA 的溶液中于 42°C 培养过夜（例如 15 小时），接着是在 0.1x SSC 中于大约 65°C 对杂交支持物进行清洗 3 \times 10min。

[0090] 本发明的另一个目的是提供可从所谓的聚合酶链式反应方法 (PCR) 获得的 DNA 序列，其中，PCR 引物是基于具体描述的本发明的 DNA 序列来设计的。应当理解，所获得的 DNA 序列编码的甲羟戊酸激酶与作为引物设计基础的、显示出可相比较的活性特征的激酶具有至少相同的突变。

[0091] 本文中描述的本发明的多种实施方式可以交叉组合。

[0092] 图 1：图 1：用程序 ClustalW (版本 1.82, EMBL, Heidelberg, Germany) 对来自多种来源的甲羟戊酸激酶序列计算出的多条序列比对结果（展示了相应氨基酸 / 核苷酸序列的各自的编号以及序列 ID 号）：小鼠 (Swiss-Prot 编号 Q9R008/Genbank 编号 AF137598)、大鼠 (Swiss-Prot 编号 P17256/Genbank 编号 M29472)、人 (H_sapiens; Swiss-Prot 编号 Q03426/Genbank 编号 M88468)、Phaffia rhodozyma (P_rhodozyma; SEQ ID NOs :8/9)、Schizosaccharomyces pombe (S_pombe; Swiss-Prot 编号 Q09780/Genbank 编号 AB000541)、Saccharomyces cerevisiae (酵母; Swiss-prot 编号 P07277/Genbank 编号 NP013935; SEQ ID NOs :1/2)、Aeropyrum pernix (A_pernix; Swiss-Prot 编号 Q9Y946/Genbank 编号 AP000064)、Pyrococcus abyssi (P_abyssi; Swiss-Prot

编号 Q9V187/Genbank 编号 AJ248284)、Pyrococcus horikoshii(P_horikoshii; Swiss-Prot 编号 059291/Genbank 编号 AB009515)、Pyrococcus furiosus(P_furiosus; Swiss-Prot 编号 Q8U0F3/Genbank 编号 AE010263)、Methanobacteriumthermoautotrophicum(M_thermoautotrophicum;Swiss-Prot 编号 Q50559/Genbank 编号 U47134)、Archaeoglobus fulgidus(Ajfulgidus;Swiss-Prot 编号 027995/Genbank 编号 AE000946)、Methanococcus jannaschii(M_jannaschii;Swiss-Prot 编号 Q58487/Genbank 编号 U67551) 和 Paracoccuszeaxanthinifaciens(P_zeaxanthinifaciens;SEQ ID NOs :6/7)。Saccharomycescerevisiae 甲羟戊酸激酶氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 用作对提到的其它序列 (例如上面列出的那些) 的位置进行氨基酸编号的参照物 (还见表 3)。对应于 SEQ ID NO :1 的 55、59、66、83、106、111、117、142、152、158、218、231、249、367 和 375 位的氨基酸被突出显示。

[0093] 下述非限制性实施例将进一步阐述本发明。

[0094] 实施例 1 对甲羟戊酸激酶活性以及反馈抑制剂造成的抑制的测量

[0095] 为制备作为底物的甲羟戊酸盐 / 酯, 将 130mg DL- 甲羟戊酸内酯 (FLUKA Chemie AG, Buchs, Switzerland) 溶于 5.5ml 的 0.2M KOH 中, 并在 50°C 培养 15 分钟。然后通过室温 (RT) 下加入 0.1M HCl 将溶液的 pH 调为 7.0。除非另有指明, 试验混合物由 100mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7.0)、1mM ATP、2mM $MgCl_2$ 、1mM 甲羟戊酸盐 / 酯、0.5mM 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)、0.32mM NADH、20U/ml 丙酮酸激酶和 27U/ml 乳酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 构成。通过加入 1 μ M FPP 来检验抑制。

[0096] 使用 Qiagen 的 QIAexpress 系统 / 试剂用 Ni-TNA 色谱来对加上 His₆ 标签的甲羟戊酸激酶和加上 His₆ 标签的甲羟戊酸激酶突变体酶进行纯化。加入纯化的 (加上 His₆ 标签的) 甲羟戊酸激酶后, 酶反应由 NADH 的消耗所反映, 然后在 340nm 处进行光度测量。一个单位 (1U) 的甲羟戊酸激酶活性每分钟能催化 1 μ mol 甲羟戊酸盐 / 酯的磷酸化。

[0097] 实施例 2 Saccharomyces cerevisiae 甲羟戊酸激酶的反馈抗性突变体的产生

[0098] 通过 PCR 扩增出来自 Saccharomyces cerevisiae 的甲羟戊酸激酶的 cDNA (SEQ ID NO :2), 其中使用引物 Mvk-SphI (其含有 SphI 限制性位点 (SEQ ID NO :10) 伴随 His₆ 序列以及甲羟戊酸激酶 5' - 末端序列的一小部分, 不含 ATG 起始密码子) 以及引物 Mvk-HindIII (其含有甲羟戊酸激酶的 3' - 末端序列, 其中包括终止密码子和 HindIII 限制性位点 (SEQ ID NO :11))。使用 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 的 Turbo-Pfu 聚合酶, 按照厂商的方案进行 PCR 反应: 94.5°C, 30 秒, 一个循环; 94.5°C, 30 秒, 55°C, 30 秒, 70°C, 3 分钟, 进行 25 个循环。通过琼脂糖凝胶电泳纯化之后, 用 SphI 和 HindIII 对 PCR 产物进行消化, 将其连接到用同样的酶消化过的 pQE-80L (Qiagen, Hilden, Germany) 中, 得到 pQE-80L-His₆-Mvk。质粒 pQE-80L 含有受 lac 操纵子元件调控的 T5 启动子, 其会受到也由 pQE-80L 编码的 lac 遏制子的顺式抑制。然后按照厂商说明书, 将该质粒转化进 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 的 E. coli DH5 α 中。在 E. coli 的指数生长期间, OD_{600nm} 为 0.6 时加入 100 μ M IPTG, 在 250rpm 振荡下, 于 30°C 对加上 His₆ 标签的甲羟戊酸激酶进行 4 小时的诱导。

[0099] 通过所谓的“两步 PCR”获得对加上 His₆ 标签的甲羟戊酸激酶的定点诱变, 其中使用 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 的 Turbo-Pfu DNA 聚合酶。第一次 PCR (条件见上文所

述)用 SEQ ID NOs :12-26 示出的引物之一(它们含有被突变的密码子)作为第一条引物,用引物 pQE-5'(SEQID NO :27)来作为第二条引物来进行,引物 pQE-5'与 pQE-80L 的多克隆位点(MCS)5'-末端的一小段序列相对应。模板是 pQE-80L-His₆-Mvk。通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行纯化,将其与引物 pQE-3'(SEQ IDNO :28)一起用作为第二次 PCR 反应的引物,引物 pQE-3'包含 MCS 3'-末端的一小段序列,野生型 pQE-80L-His₆-Mvk 被用作为模板。通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物(1.4kb)进行纯化,用 SphI 和 HindIII 进行消化,用其将 His₆-Mvk 亚克隆进 pQE-80L。最后,通过琼脂糖凝胶电泳对经过消化的片段进行纯化,并将其连接到用同样的限制性酶线性化过的 pQE-80L,得到经过突变的 pQE-80L-His₆-Mvk。

[0100] 实施例 3 Saccharomyces cerevisiae 甲羟戊酸激酶突变体的反馈抗性

[0101] 精确按照实施例 1 所述来制备甲羟戊酸盐/酯及对其进行活性测量。1 μM FPP 用于抑制试验,该试验用 Saccharomyces cerevisiae 甲羟戊酸激酶的野生型酶及其突变体来进行。

[0102] 按照如下公式来计算反馈抗性(%):

$$[0103] \quad \% \text{抗性} = 100((d/c) - (b/a)) / (1 - (b/a))$$

[0104] 其中,(a)和(b)分别是不存在或存在 FPP 的情况下测得的野生型酶的甲羟戊酸激酶活性,(c)和(d)是分别是不存在或存在 FPP 的情况下测得的突变体酶的甲羟戊酸激酶活性。结果示于表 1 中,其中,WT 代表含有 His₆-标签的未经突变的甲羟戊酸激酶(SEQ ID NO :3):

[0105] 表 1. 对 Saccharomyces cerevisiae 甲羟戊酸激酶的诱变对该酶的比活性以及反馈抗性的影响

[0106]

突变体	比活性(野生型的%)	反馈抗性(%)
WT	100	0
P55L、C117S	60	58
F59S	31	56
N66K、I152M	148	67
K83E、S249P	78	37
H111N、K375N	87	65
L106P、S218P	42	24
I142N、L158S、L231I、T367S	61	58

[0107] 实施例 4 在前文中被鉴定为对酶的反馈抑制抗性有影响的氨基酸残基/位置,对 Saccharomyces cerevisiae 甲羟戊酸激酶进行饱和诱变

[0108] 用与实施例 2 所述相同的方法来进行饱和诱变,不同之处在于:以使得要经历饱和和诱变的密码子由随机化序列构成的方式来合成诱变引物。

[0109] 实施例 5 用对反馈抑制具有抗性的甲羟戊酸激酶,增加对辅酶 Q10 的生产

[0110] 为检验突变 N66K/I152M 对辅酶 Q10 的生产进行影响的体内效果,将编码 S. cerevisiae 甲羟戊酸激酶突变体 N66K/I152M 的 DNA(SEQ IDNO :5)引入 Paracoccus zeaxanthinifaciens,与携带有编码野生型 S. cerevisiae 甲羟戊酸激酶的 DNA(SEQ ID NO :2)的 P. zeaxanthinifaciens 中的 CoQ10 生产相比较。

[0111] 质粒构建

[0112] 按照实施例 2 所述,将质粒 pQE-80L-His₆-Mvk(见实施例 3)引入 E. coli。在 LB 培养基 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 中,于 37°C 对 E. coli 菌株进行培养。为在重组的 E. coli 菌株中维持质粒,向培养基中加入氨苄青霉素 (100 μg/ml) 和 / 或卡纳霉素 (25-50 μg/ml, 取决于实验)。对固体培养基而言,还要加入琼脂 (1.5% 的终浓度)。在 200rpm 的旋转式摇床上对液体培养物进行培养。

[0113] 构建质粒 pBBR-K-mev-op-R114 以含有甲羟戊酸操纵子,其中包括插入到质粒 pBBR1MCS-2 的 SacI 和 NsiI 位点之间的来自 P. zeaxanthinifaciens R114 的其启动子区域 (Kovach et al., Gene 166, 175-176, 1995)。被克隆的甲羟戊酸操纵子对应于 GenBank/EMBL 编号为 AJ431696 的序列的第 2469 至 9001 位核苷酸的序列。在 SacI 位点和甲羟戊酸操纵子序列之间有一段短的连接序列,其来自质粒 pCR[®] 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 对应于从 SacI 位点到 PCR 片段插入位点之间的序列。

[0114] 将处于 pBBR-K-mev-op-R114 的 EcoII 和 SpeI 位点之间的 crtE 启动子区域控制之下的、来自 P. zeaxanthinifaciens 菌株 ATCC 21588 的 ddsA 基因引入,得到 pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-ddsA_{wt} (对于构建 pBBR-K-PcrtE, 见 WO 0/0990952 的实施例 6)。菌株 ATCC 21588 的 ddsA 基因 (ddsA_{wt}) 的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :29, 对应的氨基酸序列示为 SEQ ID NO :30。

[0115] 构建根据 pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-ddsA_{wt} 的质粒,其中,来自 P. zeaxanthinifaciens 菌株 R114 的甲羟戊酸操纵子 (包括其启动子区域) (见上文) 被编码野生型 S. cerevisiae 甲羟戊酸激酶的 DNA (SEQ ID NO :2) 替换,得到 pBBR-K-mev-op-(S. cerevisiae mvk)-PcrtE-ddsA_{wt}, 或被编码 S. cerevisiae 甲羟戊酸激酶 N66K/I152K 的 DNA (SEQ ID NO :5) 替换,得到 pBBR-K-mev-op-(S. cerevisiae mvk-N66K/I152M)-PcrtE-ddsA_{wt}。

[0116] 构建重组的 P. zeaxanthinifaciens 菌株

[0117] P. zeaxanthinifaciens 菌株被培养于 28°C。用于 P. zeaxanthinifaciens 菌株的培养基组分如下所示。除非另有指明,生长于瓶中的 P. zeaxanthinifaciens 菌株的全部液体培养物都被震荡培养于 200rpm 的旋转式摇床上。对固体培养基加入琼脂 (2% 的终浓度)。通过高压灭菌对培养基进行灭菌时加入葡萄糖 (作为浓缩贮液), 灭菌后以获得理想的终浓度。F- 培养基含有 (每升蒸馏水): 10g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, 30g NaCl, 10g D- 葡萄糖 · H₂O, 5g MgSO₄ · 7H₂O。在通过过滤或高压灭菌进行灭菌之前, 将 pH 调至 7.0。培养基 362F/2 含有 (每升蒸馏水): 33g D- 葡萄糖 · H₂O, 10g 酵母提取物, 10g 蛋白胨, 5g NaCl, 2.5g MgSO₄ · 7H₂O。在通过过滤或高压灭菌进行灭菌之前, 将 pH 调至 7.4。灭菌之后, 加入微量元素溶液、NKP 溶液和 CaFe 溶液, 每种均为 2.5ml (每升终溶液)。通过过滤对后三种溶液进行灭菌。微量元素溶液含有 (每升蒸馏水): 80g (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6H₂O, 6g ZnSO₄ · 7H₂O, 2g MnSO₄ · H₂O, 0.2g NiSO₄ · 6H₂O, 6g EDTA。NKP 溶液含有 (每升蒸馏水): 250g K₂HPO₄, 300g (NH₄)₂PO₄。CaFe 溶液含有 (每升蒸馏水): 75g CaCl₂ · 2H₂O, 5g FeCl₃ · 6H₂O, 3.75ml 浓缩的 HC,。

[0118] 按照如下方法来制备 P. zeaxanthinifaciens 菌株 R114 的电感受态细胞, 并进行电穿孔: 用 1.5ml P. zeaxanthinifaciens 菌株 R114 的稳定状态培养物对 100ml F 培养基进

行接种,在 28℃,200rpm 下培养,直到 660nm 下的光密度达到大约 0.5。通过在 4℃、7000xg 下离心 15 分钟来收获细胞,在 pH 为 7 的 100ml 冰冷的 HEPES 缓冲液中洗两次。最终的沉淀被重新悬浮于 0.1ml 冰冷的 HEPES 缓冲液 (pH 7) 中,细胞立即被用于电穿孔或者加入终浓度为 15% 的甘油,以 50 μ l 为一份,将细胞贮藏于 -80℃。向不含盐的溶液中加入 1 至 5 μ l 的质粒 DNA,在冰冷的 1mm 小管中,18kV/cm 和 1290hms 下进行电穿孔。典型地,脉冲长度在 4 至 5 毫秒之间。加入 1ml 的 F 培养基,在 28℃ 对细胞进行 1 小时的培养。将稀释液涂布到含有 25-50 μ g/ml 卡纳霉素的 F-琼脂平板上,在 28℃ 进行培养。通过 PCR 分析,证实可能的转化子含有想要的质粒。

[0119] 用于评价辅酶 Q10 生产情况的培养条件

[0120] 在对 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-ddsA_{w_t}、R114/pBBR-K-mev-op-(*S. cerevisiae* mvk)-PcrtE-ddsA_{w_t} 和 R114/pBBR-K-mev-op-(*S. cerevisiae* mvk-N66K/I152M)-PcrtE-ddsA_{w_t} 进行的补料分批培养中来检测辅酶 Q10 的生产情况。所有培养物最初都来自冷冻的细胞悬浮液 (作为 25% 甘油贮液贮藏于 -80℃)。在每瓶含有 200ml 362F/2 培养基的 2 升带挡板摇瓶中来制备用于补料分批发酵的预培养物,每种 2 瓶。对每只摇瓶,用 2 毫升解冻的细胞悬浮液作为接种体。预培养物的起始 pH 为 7.2。在 250rpm 震荡下,于 28℃ 对预培养物进行 28 小时的培养,这段时间后,660nm 处的光密度 (OD₆₆₀) 在 14 至 22 个吸收单位之间,具体取决于所用的菌株。主培养物被培养于 Biostat ED 生物反应器 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) 中,其中含有具有如下组分的培养基 (每升蒸馏水): 25g D-葡萄糖·H₂O, 17g 酵母提取物 (Tastone 900), 4.0g NaCl, 6.25g MgSO₄·7H₂O, 0.5g (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, 0.038g ZnSO₄·7H₂O, 0.013g MnSO₄·H₂O, ; 0.001g NiSO₄·6H₂O, 0.47g CaCl₂·2H₂O, 0.062g FeCl₃·6H₂O, 0.01g 烟酸, ; 0.5g NH₄Cl, 0.1ml 消泡剂, 3.5ml KP 溶液。KP 溶液的组分为 (每升蒸馏水): 250g K₂HPO₄; 200g NaH₂PO₄·2H₂O; 100g (NH₄)₂HPO₄。向用于携带有质粒的菌株的培养基中加入卡纳霉素 (终浓度为 50mg/l)。用于所有方法中的补料溶液具有如下组分 (每升蒸馏水): 550g D-葡萄糖·H₂O, 18.25ml KP 溶液。生物反应器中的初始体积 (接种之后) 为 8.0L。按照需要,用灭菌水对预培养物进行稀释,使得向生物反应器中加入 400ml 能获得 0.5 的初始 OD₆₆₀ 值。发酵条件被自动控制为如下条件: 28℃, pH 7.2 (通过加入 28% 的 NH₄OH 来控制 pH), 溶解氧被控制为最小 40% 的相对值 (与搅拌级联), 搅拌的最小值为 300rpm, 通气速率为 1v. vm (相对于终体积而言)。不添加补料溶液的情况下,在上述条件下进行 20 小时的培养 (分批阶段)。此段时间后,搅拌速度降低、基础消耗终止、pH 骤然升高和 CO₂ 的产生下降是最初的葡萄糖被耗尽的标志,开始进行补料。标准补料方式被定义为如下部分 (从补料起始点开始): 17 小时内,从 50g/h 斜线上升至 80g/h, 在 80g/h 保持 7 小时,然后在 11 小时内斜线下降至 55g/h, 在发酵的剩余时间内保持在 55g/h (总发酵时间 = 70 小时)。主培养物的终体积为大约 10 升。

[0121] 分析方法

[0122] 将 400 微升全培养液转移到一次性的 15ml 聚丙烯离心管中。加入 4 毫升经稳定的抽提溶液 (0.5g/l 3,5-二叔丁基-4-羟基甲苯, 处于 1 : 1 (v/v) DMSO/THF) 中,在实验室摇床 (IKA, 德国) 中,对样品进行 20 分钟的混合,以促进抽提。最后,对样品进行离心,将上清液转移到琥珀色玻璃管中,以进行反相高效液相色谱 (HPLC) 分析。该方法被发展为能

用于对泛醌及其相应对苯二酚同时进行测定。该方法能将下述类胡萝卜素：玉米黄质、八氢番茄红素、 β -隐黄质、 β -胡萝卜素和番茄红素与辅酶 Q10 清楚地分开。用装备有温控自动上样仪和二极阵列探测器的 Agilent1100HPLC 系统来进行色谱分析。该方法的参数如下所示：

- [0123] 柱 YMC 类胡萝卜素 C30 柱
 [0124] 3 微米, 钢, 150mm 长 \times 3.0mm I. D.
 [0125] (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Germany, Part
 [0126] No. CT99S031503QT)
 [0127] 保护柱 Security Guard C18 (ODS, 十八烷)
 [0128] 4mm 长 \times 3.0mm I. D.
 [0129] (Phenomenex, Torrance, CA, USA, Part No. AJ0-
 [0130] 4287)
 [0131] 典型柱压 开始时 60bar
 [0132] 流速 0.5ml/min
 [0133] 移动相 乙腈 (A) : 甲醇 (B) : TBME (C) 的混合物
 [0134] 梯度曲线 时间 (min) % A % B % C
 [0135] 0 60 15 25
 [0136] 13 60 15 25
 [0137] 20 0 0 100
 [0138] 22 60 15 25
 [0139] 25 60 15 25
 [0140] 后时间 (post time) 4 分钟
 [0141] 注射体积 10 μ l
 [0142] 柱温 15 $^{\circ}$ C
 [0143] 探测 按照表 2 将三种波长用于探测特定的化合物
 [0144] 表 2. HPLC 驻留时间和所用的波长
 [0145]

化合物	波长 (nm)	驻留时间 (分钟)
玉米黄质 (Z- 异构体)	450	4.2, 6.4
E- 玉米黄质	450	5.2
八氢番茄红素	280	7.7
β - 隐黄质	450	8.6
泛醌 10	210	11.4
辅酶 Q10	210	12.8
β - 胡萝卜素	450	14.5
番茄红素	450	22.0

- [0146] 计算 : 计算是基于峰的面积来进行的。
 [0147] 关于辅酶 Q10 生产情况的结果
 [0148] 在上述补料分批培养条件下, *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114/

pBBR-K-mev-op-(*S. cerevisiae* mvk-N66K/I152M)-PcrtE-ddsA_{wt} 生产的辅酶 Q10 的终浓度比针对携带有质粒 pBBR-K-mev-op-(*S. cerevisiae* mvk)-PcrtE-ddsA_{wt} 的菌株 114 所观察到的要高至少 5%。

[0149] 实施例 6 对与 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶同源的甲羟戊酸激酶的相应残基的鉴定

[0150] 按照图 1 所示,计算出对不同甲羟戊酸激酶的多条氨基酸序列比对结果。名为“Mvk_yeast”的序列对应于 SEQ ID NO :1,名为“Mvk-P-zeaxanthinifaciens”的序列对应于 SEQ ID NO :6。

[0151] 鉴定出了对应于 *Saccharomyces cerevisiae* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 特定氨基酸位置的下述残基 (关于进一步参考 Mvk 的来源,即生物名称,包括各条序列的编号,见图 1 的说明) :

[0152] 表 3. 对应于 *S. cerevisiae* 甲羟戊酸激酶 (酵母 ;SEQ ID NO :1) 55, 59, 66, 83, 106, 111, 117, 142, 152, 158, 218, 231, 249, 367, 375 位的来自不同生物 (见图 1) 的氨基酸残基。

[0153]

Mvk 的来源	氨基酸位置															
	P55	F59	N66	K83	L106	H111	C117	I142	I152	L158	S218	L231	S249	T367	K375	
酵母																
小鼠	P54	I58	G65	-	P98	E105	A111	P139	Y149	A155	-	L224	S242	E349	K357	
大鼠	P54	I58	A65	-	P98	E105	A111	P139	Y149	A155	-	L224	S242	E349	K357	
H-sapiens	P54	I58	A65	-	P98	E105	A111	P139	Y149	A155	-	L224	N242	E349	K357	
P_rhodozyma	T61	F65	D72	-	G106	E113	A119	M146	L156	L162	-	I236	D254	S362	M370	
S_pombe	S53	T57	Q64	-	E98	I103	C109	L134	I144	T150	T211	L221	S239	K343	K351	
A_pernix	R44	K45	S52	-	-	-	-	P104	S114	L120	-	R176	R194	V295	V303	
P_abyssi	E51	I55	V62	-	A96	-	-	V112	V122	G128	-	H181	S199	-	V307	
P_horikoshii	E51	I55	V62	-	S96	-	-	V112	V122	G128	-	P181	S199	-	V307	
P_furiosus	E49	I53	V60	-	A94	-	-	V111	V121	G127	-	H180	P198	-	V306	
M_thermoautotr.	P49	I53	-	-	-	-	-	A91	L101	G107	-	Q161	E179	-	V282	
A_fulgidus	-	I44	-	-	R72	-	-	I87	V97	A103	-	E156	S170	-	-	
M_jannaschii	N49	K53	N60	-	L87	-	-	I105	I115	K121	-	E181	K199	-	-	
P_zeaxanthinifac.	A57	G61	K68	-	A102	L109	P115	I143	I153	V159	-	P210	R228	A340	H348	

序列表

<110> 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

<120> 改进的甲羟戊酸激酶

<130>Case 24457

<160>30

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>443

<212>PRT

<213>Saccharomyces cerevisiae

<400>1

```

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

```


Ala Tyr Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ser Asn Asp Leu Glu Lys Leu Ser
165 170 175

Glu Asn Asp Lys His Ile Val Asn Gln Trp Ala Phe Ile Gly Glu Lys
180 185 190

Cys Ile His Gly Thr Pro Ser Gly Ile Asp Asn Ala Val Ala Thr Tyr
195 200 205

Gly Asn Ala Leu Leu Phe Glu Lys Asp Ser His Asn Gly Thr Ile Asn
210 215 220

Thr Asn Asn Phe Lys Phe Leu Asp Asp Phe Pro Ala Ile Pro Met Ile
225 230 235 240

Leu Thr Tyr Thr Arg Ile Pro Arg Ser Thr Lys Asp Leu Val Ala Arg
245 250 255

Val Arg Val Leu Val Thr Glu Lys Phe Pro Glu Val Met Lys Pro Ile
260 265 270

Leu Asp Ala Met Gly Glu Cys Ala Leu Gln Gly Leu Glu Ile Met Thr
275 280 285

Lys Leu Ser Lys Cys Lys Gly Thr Asp Asp Glu Ala Val Glu Thr Asn
290 295 300

Asn Glu Leu Tyr Glu Gln Leu Leu Glu Leu Ile Arg Ile Asn His Gly
305 310 315 320

Leu Leu Val Ser Ile Gly Val Ser His Pro Gly Leu Glu Leu Ile Lys
325 330 335

Asn Leu Ser Asp Asp Leu Arg Ile Gly Ser Thr Lys Leu Thr Gly Ala
340 345 350

Gly Gly Gly Gly Cys Ser Leu Thr Leu Leu Arg Arg Asp Ile Thr Gln
355 360 365

Glu Gln Ile Asp Ser Phe Lys Lys Lys Leu Gln Asp Asp Phe Ser Tyr
370 375 380

Glu Thr Phe Glu Thr Asp Leu Gly Gly Thr Gly Cys Cys Leu Leu Ser
385 390 395 400

Ala Lys Asn Leu Asn Lys Asp Leu Lys Ile Lys Ser Leu Val Phe Gln
405 410 415

Leu Phe Glu Asn Lys Thr Thr Thr Lys Gln Gln Ile Asp Asp Leu Leu
420 425 430

Leu Pro Gly Asn Thr Asn Leu Pro Trp Thr Ser
435 440

<210>2

<211>1332

<212>DNA

<213>*Saccharomyces cerevisiae*

<400>2

atgtcattac cgttcttaac ttctgcaccg ggaaagggtta ttatTTTTGG tgaacactct	60
gctgtgtaca acaagcctgc cgtecgctgct agtgtgtctg cgTTGAGAAC ctacctgcta	120
ataagcgagt catctgcacc agatactatt gaattggact tcccggacat tagctttaat	180
cataagtggT ccatcaatga tttcaatgcc atcaccgagg atcaagtaaa ctccccaaaa	240
ttggccaagg ctcaacaagc caccgatggc ttgtctcagg aactcgttag tcttttggat	300
ccgttgTtag ctcaactatc cgaatccttc cactacatg cagcgttttg tttcctgtat	360
atgtttgTtt gcctatgccc ccatgccaag aatattaagt tttctttaaa gtctacttta	420
cccatcggtg ctgggttggg ctcaagegcc tctatttctg tatcactggc cttagctatg	480
gcctacttgg gggggTtaat aggatctaat gacttggaaa agctgtcaga aaacgataag	540
catatagtga atcaatgggc cttcataggt gaaaagtgta ttcacggTac cccttcagga	600
atagataacg ctgtggccac ttatggtaat gccctgctat ttgaaaaaga ctacataat	660
ggaacaataa acacaaacaa ttttaagtTc ttagatgatt tcccagccat tccaatgatc	720
ctaacctata ctagaattcc aaggTctaca aaagatcttg ttgctcgcgt tcgtgtgttg	780
gtcaccgaga aatttctga agttatgaag ccaattctag atgccatggg tgaatgtgcc	840
ctacaaggct tagagatcat gactaagtta agtaaatgta aaggcaccga tgacgaggct	900
gtagaaacta ataatgaact gtatgaacaa ctattggaat tgataagaat aatcatgga	960
ctgcttgtct caateggtgt ttctcactct ggattagaac ttattaaaaa tctgagcgat	1020
gatttgagaa ttggctccac aaaacttacc ggtgctggTg gcggcggttg ctctttgact	1080
ttgttacgaa gagacattac tcaagagcaa attgacagct tcaaaaagaa attgcaagat	1140
gattttagtt acgagacatt tgaacagac ttgggtggga ctggctgctg tttgttaagc	1200
gcaaaaaatt tgaataaaga tcttaaaatc aaatccctag tattccaatt atttghaaat	1260
aaaactacca caaagcaaca aattgacgat ctattattgc caggaaacac gaatttacca	1320
tggacttcat aa	1332

<210>3

<211>456

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>*Saccharomyces cerevisiae*

<400>3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ala Cys Ser Leu

1	5	10	15
Pro Phe Leu Thr Ser Ala Pro Gly Lys Val Ile Ile Phe Gly Glu His			
	20	25	30
Ser Ala Val Tyr Asn Lys Pro Ala Val Ala Ala Ser Val Ser Ala Leu			
	35	40	45
Arg Thr Tyr Leu Leu Ile Ser Glu Ser Ser Ala Pro Asp Thr Ile Glu			
	50	55	60
Leu Asp Phe Pro Asp Ile Ser Phe Asn His Lys Trp Ser Ile Asn Asp			
65	70	75	80
Phe Asn Ala Ile Thr Glu Asp Gln Val Asn Ser Gln Lys Leu Ala Lys			
	85	90	95
Ala Gln Gln Ala Thr Asp Gly Leu Ser Gln Glu Leu Val Ser Leu Leu			
	100	105	110
Asp Pro Leu Leu Ala Gln Leu Ser Glu Ser Phe His Tyr His Ala Ala			
	115	120	125
Phe Cys Phe Leu Tyr Met Phe Val Cys Leu Cys Pro His Ala Lys Asn			
	130	135	140
Ile Lys Phe Ser Leu Lys Ser Thr Leu Pro Ile Gly Ala Gly Leu Gly			
145	150	155	160
Ser Ser Ala Ser Ile Ser Val Ser Leu Ala Leu Ala Met Ala Tyr Leu			
	165	170	175
Gly Gly Leu Ile Gly Ser Asn Asp Leu Glu Lys Leu Ser Glu Asn Asp			
	180	185	190
Lys His Ile Val Asn Gln Trp Ala Phe Ile Gly Glu Lys Cys Ile His			
	195	200	205
Gly Thr Pro Ser Gly Ile Asp Asn Ala Val Ala Thr Tyr Gly Asn Ala			
	210	215	220
Leu Leu Phe Glu Lys Asp Ser His Asn Gly Thr Ile Asn Thr Asn Asn			
225	230	235	240
Phe Lys Phe Leu Asp Asp Phe Pro Ala Ile Pro Met Ile Leu Thr Tyr			
	245	250	255
Thr Arg Ile Pro Arg Ser Thr Lys Asp Leu Val Ala Arg Val Arg Val			
	260	265	270
Leu Val Thr Glu Lys Phe Pro Glu Val Met Lys Pro Ile Leu Asp Ala			
	275	280	285
Met Gly Glu Cys Ala Leu Gln Gly Leu Glu Ile Met Thr Lys Leu Ser			
	290	295	300
Lys Cys Lys Gly Thr Asp Asp Glu Ala Val Glu Thr Asn Asn Glu Leu			
305	310	315	320

Tyr Glu Gln Leu Leu Glu Leu Ile Arg Ile Asn His Gly Leu Leu Val
 325 330 335
 Ser Ile Gly Val Ser His Pro Gly Leu Glu Leu Ile Lys Asn Leu Ser
 340 345 350
 Asp Asp Leu Arg Ile Gly Ser Thr Lys Leu Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Cys Ser Leu Thr Leu Leu Arg Arg Asp Ile Thr Gln Glu Gln Ile
 370 375 380
 Asp Ser Phe Lys Lys Lys Leu Gln Asp Asp Phe Ser Tyr Glu Thr Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Asp Leu Gly Gly Thr Gly Cys Cys Leu Leu Ser Ala Lys Asn
 405 410 415
 Leu Asn Lys Asp Leu Lys Ile Lys Ser Leu Val Phe Gln Leu Phe Glu
 420 425 430
 Asn Lys Thr Thr Thr Lys Gln Gln Ile Asp Asp Leu Leu Leu Pro Gly
 435 440 445
 Asn Thr Asn Leu Pro Trp Thr Ser
 450 455

<210>4

<211>1371

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>Saccharomyces cerevigiae

<400>4

atgagaggat cgcatacaca tcaccatcac ggatccgcat gctcattacc gttcttaact 60
 tctgcaccgg gaaaggttat tatttttggg gaacactctg ctgtgtacaa caagcctgcc 120
 gtcgctgcta gtgtgtctgc gttgagaacc tacctgctaa taagcgagtc atctgcacca 180
 gatactattg aattggactt cccggacatt agctttaatc ataagtggtc catcaatgat 240
 ttcaatgcca tcaccgagga tcaagtaaac tcccaaaaat tggccaagge tcaacaagcc 300
 accgatggct tgtctcagga actcgttagt cttttggatc cgttgttagc tcaactatcc 360
 gaatccttcc actaccgtgc agcgttttgt ttctgtata tgtttgtttg cctatgcccc 420
 catgccaaga atattaagtt ttctttaaag tctactttac ccatcgggtgc tgggttgggc 480
 tcaagegcct ctattttctgt atcactggcc ttagctatgg cctacttggg ggggttaata 540
 ggatctaata acttggaaaa gctgtcagaa aacgataagc atatagttaa tcaatgggccc 600
 ttcataggtg aaaagtgtat tcacgggtacc ccttcaggaa tagataacgc tgtggcact 660

tatggtaatg ccctgctatt tgaaaaagac tcacataatg gaacaataaa cacaacaat	720
tttaagttct tagatgattt cccagccatt ccaatgatcc taacctatac tagaattcca	780
aggcttacia aagatcttgt tgctcgcggt cgtgtgttgg tcaccgagaa atttctgaa	840
gttatgaagc caattctaga tgccatgggt gaatgtgccc tacaaggctt agagatcatg	900
actaagttaa gtaaagttaa aggcaccgat gacgaggctg tagaaactaa taatgaactg	960
tatgaacaac tattggaatt gataagaata aatcatggac tgcttgtctc aatcgggtgt	1020
tctcatcctg gattagaact tattaaaaat ctgagcgatg atttgagaat tggctccaca	1080
aaacttaccg gtgctgggtg cgccggttgc tctttgactt tgttacgaag agacattact	1140
caagagcaaa ttgacagctt caaaaagaaa ttgcaagatg attttagtta cgagacattt	1200
gaaacagact tgggtgggac tggctgctgt ttgttaagcg caaaaaattt gaataaagat	1260
cttaaatca aatccctagt attccaatta ttgaaaata aaactaccac aaagcaacaa	1320
attgacgatc tattattgcc aggaaacacg aatttaccat ggacttcata a	1371

<210>5

<211>1371

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>Saccharomyces cerevisiae N66K, I152M

<400>5

atgagaggat cgcatacca tcaccatcac ggatccgcat gctcattacc gttcttaact	60
tctgcaccgg gaaaggttat tatttttgggt gaacactctg ctgtgtacia caagcctgcc	120
gtcgtgcta gtgtgtctgc gttgagaacc tacctgctaa taagcgagtc atctgcacca	180
gatactattg aattggactt cccggacatt agctttaatc ataagtggtc catcaaagat	240
ttcaatgcca tcaccgagga tcaagtaaac tccccaaaat tggccaaggc tacaagaacc	300
accgatggct tgtctcagga actcgttagt cttttggatc cgttgttagc tcaactatcc	360
gaatccttcc actaccatgc agcgttttgt ttctgtata tgtttgtttg cctatgcccc	420
catgccaaga atattaagtt ttctttaaag tctactttac ccatcgggtc tgggttgggc	480
tcaagegcct ctatgtctgt atcactggcc ttagctatgg cctacttggg ggggttaata	540
ggatctaatt acttggaaaa gctgtcagaa aacgataagc atatagttaa tcaatgggcc	600
ttcataggtg aaaagtgtat tcacgggtacc ctttcaggaa tagataacgc tgtggccact	660
tatggtaatg ccctgctatt tgaaaaagac tcacataatg gaacaataaa cacaacaat	720
tttaagttct tagatgattt cccagccatt ccaatgatcc taacctatac tagaattcca	780
aggcttacia aagatcttgt tgctcgcggt cgtgtgttgg tcaccgagaa atttctgaa	840
gttatgaagc caattctaga tgccatgggt gaatgtgccc tacaaggctt agagatcatg	900
actaagttaa gtaaagttaa aggcaccgat gacgaggctg tagaaactaa taatgaactg	960
tatgaacaac tattggaatt gataagaata aatcatggac tgcttgtctc aatcgggtgt	1020

tctcatcctg gattagaact tattaanaaat ctgagcgatg atttgagaat tggctccaca 1080
 aaacttaccg gtgctggtgg cggcggttgc tctttgactt tgttacgaag agacattact 1140
 caagagcaaa ttgacagctt caaaaagaaa ttgcaagatg atttttagtta cgagacattt 1200
 gaaacagact tgggtgggac tggctgctgt ttgttaagcg caaaaaattt gaataaagat 1260
 cttaaaatca aatccctagt attccaatta tttgaaaata aaactaccac aaagcaacaa 1320
 attgacgatc tattattgce aggaaacacg aatttaccat ggacttcata a 1371

<210>6

<211>378

<212>PRT

<213>Paracoccus zeaxanthinifaciens

<400>6

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

195	200	205
Gly Pro Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asp Leu Pro Glu Asp His Asp Leu		
210	215	220
Val Ala Gly Arg Gly Trp Tyr Trp Val Leu His Gly Arg Pro Val Ser		
225	230	235
Gly Thr Gly Glu Cys Val Ser Ala Val Ala Ala Ala His Gly Arg Asp		
245	250	255
Ala Ala Leu Trp Asp Ala Phe Ala Val Cys Thr Arg Ala Leu Glu Ala		
260	265	270
Ala Lau Leu Ser Gly Gly Ser Pro Asp Ala Ala Ile Thr Glu Asn Gln		
275	280	285
Arg Leu Leu Glu Arg Ile Gly Val Val Pro Ala Ala Thr Gln Ala Leu		
290	295	300
Val Ala Gln Ile Glu Glu Ala Gly Gly Ala Ala Lys Ile Cys Gly Ala		
305	310	315
Gly Ser Val Arg Gly Asp His Gly Gly Ala Val Leu Val Arg Ile Asp		
325	330	335
Asp Ala Gln Ala Met Ala Ser Val Met Ala Arg His Pro Asp Leu Asp		
340	345	350
Trp Ala Pro Leu Arg Met Ser Arg Thr Gly Ala Ala Pro Gly Pro Ala		
355	360	365
Pro Arg Ala Gln Pro Leu Pro Gly Gln Gly		
370	375	

<210>7

<211>1137

<212>DNA

<213>Paracoccus zeaxanthinifaciens

<400>7

atgtcgaccg gcaggcctga agcaggcgcc catgccccgg gcaagctgat cctgtccggg	60
gaacattccg tgctctatgg tgcgcccgcg cttgccatgg ccatcgcccc ctataccgag	120
gtgtggttca cgccgcttgg cattggcgag gggatacgca cgacattcgc caatctctcg	180
ggcggggcga cctattcgct gaagctgctg tgggggttca agtcgcggtt ggaccgcccg	240
ttcgagcagt tctgaacgg cgacctaaag gtgcacaagg tcctgaccca tcccagcat	300
ctggcggtct atgcgctggc gtcgcttctg cacgacaagc cgccggggac cgccgcatg	360
ccgggcatcg gcgcatgca ccacctgccg cgaccgggtg agctgggcag ccggacggag	420
ctgcccateg gcgcgggcat ggggtcgtct gcggccatcg tcgcgccac cacggtcctg	480
ttcgagacgc tgctggaccg gcccaagacg cccgaacagc gcttcgaccg cgtccgcttc	540

tgcgagcggg tgaagcacgg caaggccggg cccatcgacg cggccagcgt cgtgcgcggc 600
 gggcttgtcc gcgtgggceg gaacggggccg ggttcgatca gcagcttcga tttgcccagag 660
 gatcacgacc ttgtcgcggg acgcggctgg tactgggtac tgcacgggcg ccccgtcagc 720
 gggaccggcg aatgcgtcag cgcggtcgcg gcggcgcatg gtcgcatg gcgcgtgtgg 780
 gacgccttcg cagtctgcac ccgcgcgctg gaggccgcgc tgctgtctgg gggcagcccc 840
 gacgccgcca tcaccgagaa ccagcgcctg ctggaacgca tcggcgtcgt gccggcagcg 900
 acgcaggccc tcgtggccca gatcgaggag gcgggtggcg cggccaagat ctgcggcgca 960
 ggttccgtgc gggcgatca cggcggggcg gtcctcgtgc ggattgacga cgcgcaggcg 1020
 atggcttcgg tcatggcgcg ccatcccagc ctcgactggg cccccctgcg catgtcgcgc 1080
 acggggggcg cacccggccc cgcgcgcgct gcgcaaccgc tgccggggca gggctga 1137

<210>8

<211>432

<212>PRT

<213>Phaffia rhodozyma ATCC 96594

<400>8

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

	165	170	175
Gly Arg Glu Ser Thr Ile Pro Thr Ala Asp Thr Glu Val Ile Asp Lys			
	180	185	190
Trp Ala Phe Leu Ala Glu Lys Val Ile His Gly Asn Pro Ser Gly Ile			
	195	200	205
Asp Asn Ala Val Ser Thr Arg Gly Gly Ala Val Ala Phe Lys Arg Lys			
	210	215	220
Ile Glu Gly Lys Gln Glu Gly Gly Met Glu Ala Ile Lys Ser Phe Thr			
225	230	235	240
Ser Ile Arg Phe Leu Ile Thr Asp Ser Arg Ile Gly Arg Asp Thr Arg			
	245	250	255
Ser Leu Val Ala Gly Val Asn Ala Arg Leu Ile Gln Glu Pro Glu Val			
	260	265	270
Ile Val Pro Leu Leu Glu Ala Ile Gln Gln Ile Ala Asp Glu Ala Ile			
	275	280	285
Arg Cys Leu Lys Asp Ser Glu Met Glu Arg Ala Val Met Ile Asp Arg			
	290	295	300
Leu Gln Asn Leu Val Ser Glu Asn His Ala His Leu Ala Ala Leu Gly			
305	310	315	320
Val Ser His Pro Ser Leu Glu Glu Ile Ile Arg Ile Gly Ala Asp Lys			
	325	330	335
Pro Phe Glu Leu Arg Thr Lys Leu Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys			
	340	345	350
Ala Val Thr Leu Val Pro Asp Asp Phe Ser Thr Glu Thr Leu Gln Ala			
	355	360	365
Leu Met Glu Thr Leu Val Gln Ser Ser Phe Ala Pro Tyr Ile Ala Arg			
	370	375	380
Val Gly Gly Ser Gly Val Gly Phe Leu Ser Ser Thr Lys Ala Asp Pro			
385	390	395	400
Glu Asp Gly Glu Asn Arg Leu Lys Asp Gly Leu Val Gly Thr Glu Ile			
	405	410	415
Asp Glu Leu Asp Arg Trp Ala Leu Lys Thr Gly Arg Trp Ser Phe Ala			
	420	425	430

<210>9

<211>4135

<212>DNA

<213>Phaffia rhodozyma ATCC 96594

<400>9

actgactcgg ctaccggaaa atatcttttc aggacgcctt gatcgttttg gacaacacca	60
tgatgtcacc atatcttcag cggccgttgg agctaggagt agacattgta tacgactctg	120
gaacaaagta tttgagtgga caccacgate tcatggctgg tgtgattact actcgtactg	180
aggagattgg gaaggttcgt gcttgcttgc tttgaatgtc gtgcctaaag ccattgccat	240
aagacagagt ctgatctatg tcgtttgcct acaacagaga atggcctggt tcccaaatgc	300
tatgggaaat gcattgtctc cgttcgacte gttccttctt ctccgaggac tcaaaacact	360
tcctctccga ctggacaagc agcaggcctc atctcacctg atcgccctcg acttacacac	420
cctcggcttt cttgttcaact accccggtct gccttctgac cctgggtacg aacttcataa	480
ctctcaggcg agtgggtgcag gtgccgctcat gagctttgag accggagata tcgcgttgag	540
tgaggccatc gtgggcggaa cccgagtttg gggaatcagt gtcagtttcg gagccgtgaa	600
cagtttgatc agcatgcctt gtctaagtag gttagtctt atgccttctt ttcgcgcctt	660
ctaaaatttc tggctgacta attgggtcgg tctttccggt cttgcatttc agtcacgcat	720
ctattcctgc tcacctega gccgagcgag gtctccccga acatctgatt cgactgtgtg	780
tcggtattga ggacctcac gatttgcttg atgatttggg gccctctctt gtgaacgctg	840
gcgcaatccg atcagtctct acctcagatt catcccgacc gctcactcct cctgcctctg	900
attctgcctc ggacattcac tccaactggg ccgtcgaccg agccagacag ttcgagcgtg	960
ttaggccttc taactegaca gccggcgctc aaggacagct tgccgaactc aatgtagacg	1020
atgcagccag acttgccggc gatgagagcc aaaaagaaga aattcttgtc agtgcaccgg	1080
gaaaggtcat tctgttcggc gaacatgctg taggccatgg tgttgtgagt gagaaatgaa	1140
agctttatgc tctcattgca tcttaacttt tctctgcctt ttttgttctc ttcattcccgt	1200
cttgattgta gggatgcccc cttttgcccc tttccccttc ttgcatctgt ctatatttcc	1260
ttatacattt cgctcttaag agcgtctagt tgtaccttat aacaaccttt ggttttagca	1320
tcctttgatt attcatttct ctcatccttc ggtcagaggc tttcggccat ctttacgtct	1380
gattagattg taatagcaag aactatcttg ctaagccttt tctcttcctc ttctcctat	1440
ataaatcgaa ttcacttttc gacatgttta ttttggggaa atcatcaagg ggtggggggc	1500
caatcccgac actaattttc tgctcacgtc aaaactcagc gttcagaatc agtcactgac	1560
cctgatacgt gtctctatgt gtgtgggtgt acgtgcgaat tgtgactcga cgttctacgc	1620
ttaaaaacag accgggatcg ctgcttccgt tgatcttcga tgctacgctc ttctctcacc	1680
cactgctacg acaacaacat catcgctggt atcgcttaca aacattacca tctcccctaac	1740
ggacctgaac tttacgcagt cttggcctgt tgattctctt ccttgggtcac ttgcgcctga	1800
ctggactgag gcgtctatc cagaatctct ctgcccgaca ttgctcgccg aaatcgaaag	1860
gatcgctggt caaggtggaa acggaggaga aagggagaag gtggcaacca tggcattctt	1920
gtatttgttg gtgctattga gcaaagggaa gccaaaggtag gttttttctg tctcttctt	1980
ttgcctataa agactcttaa ctgacggaga aagtgttggg tttcttcctt cgggggttca	2040
atcaattaaa gtgagccgtt cgagttgacg gctcgatctg cgcttccgat gggagctggt	2100
ctgggttcat ccgccgtct atcgacctct cttgccctag tctttcttct ccacttttct	2160
cacctcagtc caacgacgac tggcagagaa tcaacaatcc cgacggccga cacagaagta	2220
attgacaaat gggcgcttct agctgaaaaa gtcatccatg gaaatccgag tgggattgat	2280

aacgcggtca	gtacgagagg	aggcgctggt	gctttcaaaa	gaaagattga	gggaaaacag	2340
gaaggtggaa	tggaagegat	caagaggtac	gcagacacgg	tgcttcatat	gccatactcc	2400
agtctgattg	acctatgatg	aacgtetttc	tacatttcga	atatagcttc	acatccattc	2460
gattcctcat	cacagattct	cgtatcgga	gggatacaag	atctctcggt	gcaggagtga	2520
atgctcgact	gattcaggag	ccagaggtga	tcgtcccttt	gttggaagcg	attcagcaga	2580
ttgccgatga	ggctattcga	tgcttgaaag	attcagagat	ggaacgtgct	gtcatgatcg	2640
atcgacttca	agttagttct	tgttcctttc	aagactcttt	gtgacattgt	gtcttatcca	2700
tttcatcttc	ttttttcttc	cttctctctgc	agaacttggg	ctccgagaac	cacgcacacc	2760
tagcagcact	tggcgtgtcc	cacccatccc	tcgaagagat	tatccggatc	ggtgctgata	2820
agcctttcga	gcttcgaaca	aagttgacag	gcgccgggtg	aggtggttgc	gctgtaacce	2880
tggtgcccga	tggtaaagtc	tctccttttc	tcttccgtcc	aagcgacaca	tctgaccgat	2940
gcgcacctcg	tacttttggg	caaccagact	tctcgactga	aacccttcaa	gctcttatgg	3000
agacgctcgt	tcaatcatcg	ttcgccccct	atattgcccc	agtgggtggg	tcaggcgtcg	3060
gattcctttc	atcaactaag	gccgatccgg	aagatgggga	gaacagactt	aaagatgggc	3120
tggtgggaac	ggagattgat	gagctagaca	gatgggcttt	gaaaacgggt	cgttggctct	3180
ttgcttgaac	gaaagatagg	aaacgggtgat	tagggtagac	atcctttgct	gtcattttta	3240
caaaacactt	tcttatgtct	tcattgactca	acgtatgccc	tcattctctat	ccatagacag	3300
cacggtacct	ctcaggtttc	aatacgtaa	cgttcatcga	caaaacatgc	ggcacacgaa	3360
aacgagtggg	tataagggag	aagagagata	ttagagcgaa	aaagagaaga	gtgagagagg	3420
aaaaaaataa	ccgagaacaa	cttattccgg	tttgtagaa	tcgaagatcg	agaaatatga	3480
agtacatagt	ataaagtaaa	gaagagaggt	ttacctcaga	ggtgtgtacg	aaggtgagga	3540
caggtaaag	gaataattga	ctatcgaaaa	aagagaactc	aacagaagca	ctgggataaa	3600
gcctagaatg	taagtctcat	cggtccgcga	tgaaagagaa	attgaaggaa	gaaaaagccc	3660
ccagtaaaca	atccaaccaa	cctcttggac	gattgcgaaa	cacacacacg	cacgcggaca	3720
tatttcgtac	acaaggacgg	gacattcttt	ttttatatcc	gggtggggag	agagagggtt	3780
atagaggatg	aatagcaagg	ttgatgtttt	gtaaaagggt	gcagaaaaag	gaaagtgaga	3840
gtaggaacat	gcattaaaaa	cctgcccaca	gcgatttata	tcgttcttct	gttttcaact	3900
ctttccgggc	gctttcttag	accgcggtgg	tgaagggtta	ctcctgccaa	ctagaagaag	3960
caacatgagt	caaggattag	atcatcacgt	gtctcatttg	acgggttgaa	agatatattt	4020
agataactaac	tgcttcccac	gccgactgaa	aagatgaatt	gaatcatgtc	gagtggcaac	4080
gaacgaaaga	acaaatagta	agaatgaatt	actagaaaaag	acagaatgac	tagaa	4135

<210>10

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>10
tttgc atgct cattaccgtt cttaacttc 29

<210>11
<211>34
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>PCR 引物

<400>11
ttttaagcct ttatgaagtc catggtaa at tcgt 34

<210>12
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>PCR 引物

<400>12
gaattggact tcctggacat tagcttta 28

<210>13
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>PCR 引物

<400>13
cggacattag ctctaatcat aagtggtc 28

<210>14
<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>14

taagtgtcc atcaaagatt tcaatg 26

<210>15

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>15

caaaaattgg ccgaggctca acaagcc 27

<210>16

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>16

gttagctcaa ccatccgaat ccttc 25

<210>17

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>17

cgaatccttc cagtaccatg cag 23

<210>18

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>18

cagcgttttc tttcctgtat atgttt 26

<210>19

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>19

ctactttacc caacggtgct gggttg 26

<210>20

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>20

caagegcctc tatgtctgta tcactg 26

<210>21

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>21

gtatcactgg cctcagctat ggcctac 27

<210>22

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>22

gaaaaagacc cacataatgg aaca 24

<210>23

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>23

caattttaag ttcatagatg atttccc 27

<210>24

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>24

gaattccaag gcctacaaaa gatc 24

<210>25

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>25

agagacattt ctcaagagca aattg 25

<210>26

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>26

gacagcttca acaagaaattgcaag 25

<210>27

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>27

cggataacaa tttcacacag 20

<210>28

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>28

ctgaggtcat tactagatct 20

<210>29

<211>1002

<212>DNA

<213>Paracoccus zeaxanthinifaciens ATCC 21588

<400>29

atgaacgtgc aggaagacgt ccgcaaacca ctggaccggc tggccgaggc gctggcaccc	60
gagatggagg ccgtgaacgc gctgatccgc gaacgcatgg ccagcaggca tgcgccgcgc	120
atccccgagg tgaccgcca cctgatcgag gccggcggca agcgcctgcg cccgatgctg	180
accctggccg cggcgaagct gcttggetat ggccggcccct atcacgtgca tctggccgcg	240
acggtcgaat tcatccacac cgcgaccctg ctgcatgacg acgtggtcga cgaaagccgc	300
cagcgcgcgc ggcgtccgac ggccaacctg ctgtgggaca acaagtccag cgtgctggtc	360
ggcgattacc tgttcgcgcg cagcttcag ctgatggtcg aaccggcag catgcgcacg	420
ctcgagatcc tgtegaacgc cgccgccacc atcgccgagg gcgaggtgct gcagctgacc	480
gcggcgcagg atctggccac gaacgaggac atctatctgc aggtcgtgcg cggcaagacg	540
gcagcgtgt tctcggcgcg gaccgaggtg ggccggcgtca tcgcccggcgt ccccgatgcg	600
caggtccgcg cgctgttcca ttacggcgac gcgcttgcca tcgccttcca gatcgtggac	660
gacctgctgg attacggcgg caccgcccag gcgatcggca agaataccgg cgacgatttc	720
cgccaacgca agctgacgct gccggtgatc aaggccgtgg cccgcgccac ccccgaggaa	780
cgcgcttctt ggtegcgcac catcgagaag ggcgaccaga aggacggcga ccttgaacac	840
gcgctggaac tgctggcccg ccacggcgcg atggccgatg cccgccgcga cgcgctggac	900
tggcgggcca gggcccgcgc ctccctgcag atcctgcccg agcatccgat ccgcgacatg	960
ctgtcggacc tggccgattt cgtggtegaa cgcacgcct ga	1002

<210>30

<211>333

<212>PRT

<213>Paracoccus zeaxanthinifaciens ATCC 21588

<400>30

Met	Asn	Val	Gln	Glu	Asp	Val	Arg	Lys	Pro	Leu	Asp	Arg	Leu	Ala	Glu
1				5					10					15	
Ala	Leu	Ala	Pro	Glu	Met	Glu	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Ile	Arg	Glu	Arg
			20						25					30	

Met Ala Ser Arg His Ala Pro Arg Ile Pro Glu Val Thr Ala His Leu
 35 40 45
 Ile Glu Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Met Leu Thr Leu Ala Ala
 50 55 60
 Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Tyr His Val His Leu Ala Ala
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Phe Ile His Thr Ala Thr Leu Leu His Asp Asp Val Val
 85 90 95
 Asp Glu Ser Arg Gln Arg Arg Gly Arg Pro Thr Ala Asn Leu Leu Trp
 100 105 110
 Asp Asn Lys Ser Ser Val Leu Val Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Arg Ser
 115 120 125
 Phe Gln Leu Met Val Glu Pro Gly Ser Met Arg Thr Leu Glu Ile Leu
 130 135 140
 Ser Asn Ala Ala Ala Thr Ile Ala Glu Gly Glu Val Leu Gln Leu Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Gln Asp Leu Ala Thr Asn Glu Asp Ile Tyr Leu Gln Val Val
 165 170 175
 Arg Gly Lys Thr Ala Ala Leu Phe Ser Ala Ala Thr Glu Val Gly Gly
 180 185 190
 Val Ile Ala Gly Val Pro Asp Ala Gln Val Arg Ala Leu Phe Asp Tyr
 195 200 205
 Gly Asp Ala Leu Gly Ile Ala Phe Gln Ile Val Asp Asp Leu Leu Asp
 210 215 220
 Tyr Gly Gly Thr Ala Glu Ala Ile Gly Lys Asn Thr Gly Asp Asp Phe
 225 230 235 240
 Arg Glu Arg Lys Leu Thr Leu Pro Val Ile Lys Ala Val Ala Arg Ala
 245 250 255
 Thr Pro Glu Glu Arg Ala Phe Trp Ser Arg Thr Ile Glu Lys Gly Asp
 260 265 270
 Gln Lys Asp Gly Asp Leu Glu His Ala Leu Glu Leu Leu Ala Arg His
 275 280 285
 Gly Ala Met Ala Asp Ala Arg Arg Asp Ala Leu Asp Trp Ala Ala Arg
 290 295 300
 Ala Arg Ala Ser Leu Gln Ile Leu Pro Glu His Pro Ile Arg Asp Met
 305 310 315 320
 Leu Ser Asp Leu Ala Asp Phe Val Val Glu Arg Ile Ala
 325 330

Mvk_mouse	--MLSEALVVSAPGKVIILHGEHAVVHGKVALAAALN-LRTFLLLRP----	43
Mvk_rat	--MLSEVLLVSAPGKVIILHGEHAVVHGKVALAVALN-LRTFVLVLRP----	43
Mvk_H_sapiens	--MLSEVLLVSAPGKVIILHGEHAVVHGKVALAVSLN-LRTFVLVLRP----	43
Mvk_P_rhodozyma	---KEEILVVSAPGKVIILFGEHAVVGHVGTGAASVD-LRCYALLSPTATT	45
Mvk_S_pombe	---MSKSLIVSSPGKTIILFGEHAVVYGATALAAAVS-LRSYCKLQT----	42
Mvk_A_ernix	---MRAARASAPGKVIIVGEHFVVRGSLAIVAAIG-----	33
Mvk_P_abyssi	---MPRLVLASAPAKIILFGEHSVVYKPAIASAID-LRTYVRAEF----	42
Mvk_P_horikoshii	---MVKYVLASAPAKVILFGEHSVVYKPAIASAIE-LRTYVRAQF----	42
Mvk_P_furiosus	-----MKVIASAPAKVILFGEHSVVYKPAIAAID-LRTFVEAEL----	40
Mvk_M_thermoautotrophicum	-----MKSSASAPAKIILFGEHAVVYKPAIAAID-RRVTVTVSE----	40
Mvk_A_fulgidus	-----MIASAPGKIILFGEHAVVYGRHAVVSAIN-LRCRVSVRK----	38
Mvk_M_jannaschii	-----MIETPSKVIILFGEHAVVYGYRAISMAIDLSTIEIKETQ----	40
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	MSTGRPEAGAHAFGKLLILSGEHSVLYGAPALAMAIARYTEVWFPLG----	47
Mvk_yeast	---MSLPFLTSAPGKVIIFGEHSAVYNKPAVAASVSALRITYLLISE----	43
Mvk_mouse	-----QSNKGKSVNLPNIGIKQVVDVGMQLQR-LDTSFLE-----	81
Mvk_rat	-----QSNKGKSVNLPNVGKIQVVDVATLQL-LDTGFLE-----	81
Mvk_H_sapiens	-----HSNGKVDLSLPNIGIKRAWVVARLQS-LDTSFLE-----	81
Mvk_P_rhodozyma	TTSSLSSTNITISLTDLNFQSWPVDLPSLAPDWTE-----	89
Mvk_S_pombe	---TNN-NEIVIVMSDIGTERRWNLQSLPWQHVTVEN-----	81
Mvk_A_ernix	-----RRLRVTVRSGGKIVLESSLGR-----	60
Mvk_P_abyssi	-----NDSGNIKIEAHDIKTPGLIVSFSSEDKIYFETD-----	79
Mvk_P_horikoshii	-----NDSGNIKIEAHDIKTPGLIVSFSSEDKIYFETD-----	79
Mvk_P_furiosus	-----IREKKIRIEAHDIKVPLTVSFSSENEIYFETD-----	77
Mvk_M_thermoautotrophicum	-----SSSTHVTIPSLGIRHS-----	62
Mvk_A_fulgidus	-----SDR-----	55
Mvk_M_jannaschii	-----EDEIILNLDLNLKSLGLNLNLEIKN-----	70
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	-----IGEGIRTFANLGGGATYSLKLLSGFKSRLDRR-----	85
Mvk_yeast	----SSAPDTIELDFEIDISLNHKWSINDFNAITEDQVNSQKLAIAQQATD	89
Mvk_mouse	VPTLEQLEKLLKMGDLPRDRAGNEGMALLAFLYLYLAICRKQRTLPSLDM	131
Mvk_rat	APTLEQLEKLLKVVAGLPRDCVGNGLSLLAFLYLYLAICRKQRTLPSLDI	131
Mvk_H_sapiens	TPTSEQVEKLEKVEVAGLPDDCAVTERLAVLAFLYLYLSICRKQRALPSLDI	131
Mvk_P_rhodozyma	SLCPTLLAEIERIAGQGGNGGEREKVATMAFLYLLVLLSKGKPSFP-FEL	138
Mvk_S_pombe	SPNLDLLQGLGELLKNEENG--LIHSAMLCITYLFTSLS---SPSQGCTL	126
Mvk_A_ernix	LPGQGAAAKVSPVLEP-----	96
Mvk_P_abyssi	EVLSYVRHAIELVLEEADKR-----	104
Mvk_P_horikoshii	EVLSYVRYAIELEALEESDKR-----	104
Mvk_P_furiosus	EVLSYVREAINLVLEEADKKN-----	103
Mvk_M_thermoautotrophicum	GILDYIGRCLELYHDA-----	83
Mvk_A_fulgidus	QRHPYVQVAVKRRFGEELRNIP-----	79
Mvk_M_jannaschii	GDFKYCLCAIKNTLDYLNIEP-----	97
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	NGDLKVKVLTLPDLDLAVYALASLLHDKPPGTAAMPPIGAMHHLPRFGEL	145
Mvk_yeast	GLSQELVSLDPLLAQSES--FHYHAAFFLYMFVCLC---PHAKNIKF	134
Mvk_mouse	VVWSELPPGAGLGSSAAYSVCVLAALLTACEEVSNPLKDGVSVSRWPEED	181
Mvk_rat	MVWSELPPGAGLGSSAAYSVCVAAALLTACEEVTNPLKDRGSIGSWPEED	181
Mvk_H_sapiens	VVWSELPPGAGLGSSAAYSVCVLAALLTVCEEIPNPLKDGDCVNRWTKED	181
Mvk_P_rhodozyma	TARSALPMGAGLGSSAALSTSLALVFLHFSHLSPTTTGRE--STIPTAD	186
Mvk_S_pombe	TISSQVPLGAGLGSSATISVVVATSLLLAFGNIEPPS---SNSLQNNKA	172
Mvk_A_ernix	LVESGIPPRAGLGSSAASMVAYALSYSAMHGDP-----	131
Mvk_P_abyssi	SITSQIPVAGLGSSAAVAVATIGAVSKLLDLELS-----	139
Mvk_P_horikoshii	SITSQIPVAGLGSSAAVAVATIGAVSRLGLELS-----	139
Mvk_P_furiosus	SITSQIPVAGLGSSAAVAVATIGAVSKLLGLELS-----	138
Mvk_M_thermoautotrophicum	RVEMEIPAGSGLGSSAALTVALIGALDRYHGRDHG-----	118
Mvk_A_fulgidus	EIESEIPIGSLGSSAAVIVATIAALNAEFDGDM-----	114
Mvk_M_jannaschii	NISSKIPISCGLGSSASITIGTIKAVSGFYNKELK-----	132
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	GSRTLEPIGAGMGSSAAIVAATTVLFETLLDRPKT-----	170
Mvk_yeast	SLKSTLPIGAGLGSSASVSLAAMAYLGGIGSND---LEKLSEN-D	179
Mvk_mouse	LKSINKWAFEGERVIHGNPSGVDNAVSTWGGALRFQ-----	222
Mvk_rat	LKSINKWAYEGERVIHGNPSGVDNSVSTWGGALRYQ-----	222
Mvk_H_sapiens	LELINKWAFQGERMIVHGNPSGVDNAVSTWGGALRYH-----	222
Mvk_P_rhodozyma	TEVIDKWAFLAEKVIHGNPSGIDNAVSTRGGAVAFKR---KIEGKQEGGME	234

图 1

Mvk_S_pombe	LALIEAWSFLGECCHGTPSGIDNAVATNGGLIAPFRKATAHQSAMK---E	219
Mvk_A_ernix	AEDLYSVAMEGEKIAHGKPSGVVDVTIAVRGGVLAAYR-----GENPVD	174
Mvk_P_abyssi	KEEIAKMGHKVELLVQGASSGIDPTVSAIGGFLYYK-----QGFE	179
Mvk_P_horikoshii	KEEIAKLGHKVELLVQGASSGIDPTVSAVGGFLYYK-----QGKF	179
Mvk_P_furiosus	KEEIAKMGHKTELLVQGASSGIDPTVSAIGGFIFYE-----KGKF	178
Mvk_M_thermoautotrophicum	PGETAARARHVEVDVQGAASPLDTAISTYGGLVYLD-----QRRV	159
Mvk_A_fulgidus	KEAIFQMAKQVEIDVQGRASGIDPFIISTFGGSWLPF-----ERRK	154
Mvk_M_jannaschii	DDEIAKLGVMVEKEIQKASITDSTITTYKGIIEIKN---NKFRKIKGEF	179
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	PEQRFDRVRFCERLKHGKAGPIDAASVVRGGVLRVVG-----N	208
Mvk_yeast	KHIVNQWAFIGEKCCHGTPSGIDNAVATYGNALLFEKDHNGTINTNNFK	229
Mvk_mouse	SLKSLPSLQILLTNTKVRSTKALVAVRSL--TKFPEIVAPLLTSIDAI	271
Mvk_rat	SLKRLPALQILLTNTKVRSTKALVAGVRSRL--IKFPEIMAPLLTSIDAI	271
Mvk_H_sapiens	SLKRSALQILLTNTKVRNTRALVAGVNRNL--LKFPEIVAPLLTSIDAI	271
Mvk_P_rhodozyma	AIKSFTSTRFLITDSTRIGRDRSLVAGVNARL--IQEPEVIVPPLLEAIQQI	283
Mvk_S_pombe	FLKPKDTLSVMITDTPKQPKSTKKLVDQGVFELK--ERLPTVIDSIIDAIGI	268
Mvk_A_ernix	IRPGLTGVTLLVADTGVERRTRDVEHVLSIA--DALGEASTIYIYRAADLI	223
Mvk_P_abyssi	EHLPFVLEPIVVGTYGSSGPTKELVAMVRRRY--EEMPELIEPILESMGKL	228
Mvk_P_horikoshii	EPLPFMELPIVVGTYGSGTSTKELVAMVRKRY--EEMPELVEPILEAMGKL	228
Mvk_P_furiosus	EHLPFMELPIVVGTYGSSGPTKELVAMVRKRY--EEMPELIVPILEAMGKV	227
Mvk_M_thermoautotrophicum	RQFEADLGDLVIAHLDYSGETARMVAGVAERF--RRFPDIMGRIMDTVESI	208
Mvk_A_fulgidus	VEMPFKFFVINFG---SRSTAEMVAKVAELR--ERHPEVVDKIFDAIDA	199
Mvk_M_jannaschii	EEFLNKCKFLIVYAEKRRKKTAEVLVNEVAKIE----NKDEIFKIDDKV	223
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	GPGSISFPDLPEDHDLVAGRGWYVWLHGRPVSGTGECVSAVAHAHGRDAA	258
Mvk_yeast	FHDDFPAIPMLITVTRIPRHTKDLVARVRLVTEKFPPEVMKPIILDAMGEC	279
Mvk_mouse	SLECEVRLG--EMVAAP-----VPEQYLVLEELIDMNQHHLNALGVGH	312
Mvk_rat	SLECEVRLG--EMAAP-----VPEQYLVLEELMDMNQHHLNALGVGH	312
Mvk_H_sapiens	SLECEVRLG--EMGEAP-----APEQYLVLEELIDMNQHHLNALGVGH	312
Mvk_P_rhodozyma	ADEAIRCLKDESEMERAV-----MIDR---LQNLVSENHAHALALGVSH	323
Mvk_S_pombe	SKSAVLALTSSES-----DNSSAKKLGFEFIVLNQKLECLGVSH	307
Mvk_A_ernix	AREALHATE-----KGDARLGLIMNAAQGLLSSIGASS	257
Mvk_P_abyssi	VDKAKEVVISKLDEBEK-----FLKLGELMNIHGLLDALGVST	267
Mvk_P_horikoshii	VDKAKEIILSKLDEBEK-----LTKLGELMNIHGLLDALGVST	267
Mvk_P_furiosus	VEKAKDVILSNVDKBEK-----PERLGVLMNIHGLLDALGVST	266
Mvk_M_thermoautotrophicum	TNTAYRELLRNNTPEP-----LGELMNIHGLLDALGVST	242
Mvk_A_fulgidus	SLEASDVGSAR-----LEELYAINQSLLRIGVSN	230
Mvk_M_jannaschii	IDBALKIKNKED-----FGKLMYKNHLLKKNLST	254
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	LWDFAFVCTRALAEALLS-----GGSPDAAITENQRLLERIGVVP	298
Mvk_yeast	ALQGLEIMTKLSKCKCTDDEAVEFNWELYEQLLELIRINHGLLVSIGVSH	329
Mvk_mouse	NSLDQLCQVTAAH--GLHSKLTGAG----GGCGITLLKPGLEQATVEA	355
Mvk_rat	ASLDQLCQVTAAH--GLHSKLTGAG----GGCGITLLKPGLERAKVEA	355
Mvk_H_sapiens	ASLDQLCQVTRAR--GLHSKLTGAG----GGCGITLLKPGLEQPEVEA	355
Mvk_P_rhodozyma	PSLEEIIRIGADKPFELRTPKLTGAG----GGCAVTLVDDFSTETLQA	368
Mvk_S_pombe	YSIDRVLQATK---SIGWTKLTGAG----GGGCTITLLTPECKEKEEFKL	349
Mvk_A_ernix	LEIETLVYRMRASG--ALGAKLTGAG----WGGCVIGLFKEGEVERGLES	301
Mvk_P_abyssi	KKLSELVYAAR--TAGAIGAKLTGAG----GGCMYALAP-----GKQR	305
Mvk_P_horikoshii	KKLGELVYAAR--TAGAIGAKLTGAG----GGCMYALAP-----GRQR	305
Mvk_P_furiosus	KKLSELVYAAR--VAGALGAKITGAG----GGCMYALAP-----NKQR	304
Mvk_M_thermoautotrophicum	RELSMMVYEAR--NAGAAGSKITGAG----GGGSIIAHCP-----GCVD	280
Mvk_A_fulgidus	PRDRTIAELE--RMG--LNAKITGAG----GGCIFGLFK-----GKPK	267
Mvk_M_jannaschii	PKLDRIVDIGN--RFGFGAKLTGAG----GGGCVIILVN-----	287
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	AATQALVAQIEEAG--GAAKICGAGSVRGDHHGAVLVRIDDAQAMASVMA	346
Mvk_yeast	PGLLEIKNLSDDL--RIGSTKLTGAG----GGCSLTLRRDITQEQIDS	373
Mvk_mouse	AKQALT--SCGFDCWETSIGAPGVSTHSAAVGDV-----	388
Mvk_rat	AKQALT--GCGFDCWETSIGAPGVSMHSATSIEDP-----	388
Mvk_H_sapiens	TKQALT--SCGFDCLETSIGAPGVSIHSATSLDSR-----	388
Mvk_P_rhodozyma	LMETLV--QSSFAPYIARVGGSGVGLSSTKADPEDGENRL-----KDGL	411
Mvk_S_pombe	CKESLLAHKN--SIYDVQLGGPGVSVVTDSDS-----FFPQYE	385
Mvk_A_ernix	VVESS-----QAFTASIAEGARLEEF-----	324
Mvk_P_abyssi	EVATAIKIAGGTPMITRISKEGLRIEEVRE-----	335
Mvk_P_horikoshii	EVATAIKIAGGTPMITRVSREGLRIEEVSR-----	335

图 1(续)

Mvk_P_furiosus	EVATAIRIAGGTPMITEISREGLKIEEVIK-----	334
Mvk_M_thermoautotrophicum	DVVTALNRN-WKAMRAEFSVKGLI-----	303
Mvk_A_fulgidus	-----KGSFIVEPEKEGVRIE-----	284
Mvk_M_jannaschii	-----EEKEKELLKELNKEDEVRIFNCRMMN-----	312
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	RHPDLLWAPLRMSRTGAAPGPAPRAQPLPGQG-----	378
Mvk_yeast	F Y KKLQDDFSYETFETDLGGTGCCLLSAKNLNKDLKIKSLVFLFENKTT	423
Mvk_mouse	VRQALG-L-----	395
Mvk_rat	VRQALG-L-----	395
Mvk_H_sapiens	VQQALDGL-----	396
Mvk_P_rhodozyma	VGTEIDELDRWALKTGRWS-	430
Mvk_S_pombe	SDFDFKKLNLLSKFNKYYYI-	404
Mvk_A_ernix	-----	
Mvk_P_abyssi	-----	
Mvk_P_horikoshii	-----	
Mvk_P_furiosus	-----	
Mvk_M_thermoautotrophicum	-----	
Mvk_A_fulgidus	-----	
Mvk_M_jannaschii	-----	
Mvk_P_zeaxanthinifaciens	-----	
Mvk_yeast	TKQQIDDLLLPGNTNLPWTS	443

图 1(续)