

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月5日 (05.04.2001)

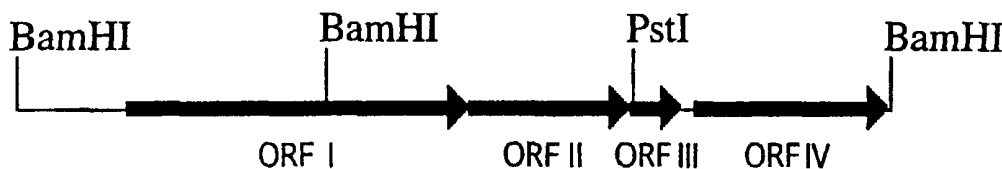
PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/23542 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/10, C12P 21/02, C07K 11/00 // (C12P 21/02, C12R 1:645)
- (74) 代理人: 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.); 〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06783
- (22) 国際出願日: 2000年9月29日 (29.09.2000)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/276314 1999年9月29日 (29.09.1999) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16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): 矢内耕二 (YANAI, Koji) [JP/JP]. 岡倉 薫 (OKAKURA, Kaoru) [JP/JP]. 安田昌平 (YASUDA, Shohei) [JP/JP]. 渡辺 学 (WATANABE, Manabu) [JP/JP]. 宮本功一 (MIYAMOTO, Koichi) [JP/JP]. 御堂直樹 (MIDOH, Naoki) [JP/JP]. 村上 健 (MURAKAMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSFORMANT PRODUCING SECONDARY METABOLITE MODIFIED WITH FUNCTIONAL GROUP AND NOVEL BIOSYNTHESIS GENES

(54) 発明の名称: 官能基により修飾された二次代謝産物を生産する形質転換体および新規生合成遺伝子



(57) Abstract: A transformant having been modified so as to produce a secondary metabolite wherein a benzene ring of a secondary metabolite is modified at the para-position with a nitrogen-containing functional group. This transformant is a transformant of an organism which produces a secondary metabolite having a benzene ring skeleton free from substitution at the para-position by a nitrogen-containing functional group, characterized in that it has been transformed by transferring a gene participating in the biosynthesis pathway from chorismic acid into p-aminophenylpyruvic acid so as to enable the production of a secondary metabolite having a benzene ring skeleton substituted at the para-position by a nitrogen-containing functional group. Also, novel genes participating in the biosynthesis pathway from chorismic acid into p-aminophenylpyruvic acid are provided. These novel genes encode the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 4 and 6 or modification sequences derived therefrom.

[続葉有]



WO 01/23542 A1



(57) 要約:

本発明は、二次代謝産物のベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された二次代謝産物を生産できるように改変された形質転換体を提供することをその目的とする。本発明による形質転換体は、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されていないベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を生産する生物の形質転換体であって、コリスミ酸から *p*-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子を導入することによって、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を生産するように形質転換されたことを特徴とする形質転換体である。本発明はまた、コリスミ酸から *p*-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する新規遺伝子を提供することもその目的とする。本発明による新規遺伝子は、配列番号 2、4、および 6 のアミノ酸配列またはそれらの改変配列をコードする遺伝子である。

明 細 書

官能基により修飾された二次代謝産物を生産する形質転換体
および新規生合成遺伝子

発明の背景

発明の分野

本発明は、官能基により修飾された二次代謝産物を生産する形質転換体に関し、更に詳細には、ベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基で修飾された二次代謝産物を生産する形質転換体に関する。本発明はまた、コリスミ酸から

p

-アミノフェニルビルビン酸への生合成経路に関与する新規遺伝子にも関する。

関連技術の説明

生物は生物学的活性を有する多種、多様な二次代謝産物を生産するため、これらを医薬品、動物薬、農薬等へ利用しようとする研究が盛んに行われている。しかし、生物由来の二次代謝産物がそのまま実用化されるということは希であり、その生物学的活性を最適化するために様々な官能基で修飾されるのが一般的である。その中で、窒素原子を含む官能基、例えばニトロ基あるいはアミノ基による修飾は最も重要な修飾の一つである。

ある物質をニトロ基で修飾するには化学的手法が利用可能である。しかし、化学的手法を用いて、ベンゼン環のパラ位特異的にニトロ基を導入することは難しいため、その収率は非常に低い。さらに、ニトロ基で修飾しようとする物質が生物由来の二次代謝産物のように複雑な物質である場合、その中に含まれるベンゼン環のパラ位を特異的にニトロ基で修飾するには一層の困難を伴う。

一方、アミノ基を導入する方法には、大別して酵素法と化学法の2つの方法がある。酵素法では、アミノトランスフェラーゼ (EC 2.6.1群) と呼ばれる酵素を使用して行う。しかし、アミノトランスフェラーゼの基質となり得る物質が限られており、ベンゼン環に直接アミノ基を転移することができる酵素はこれまでに知られていない。よって、ベンゼン環をアミノ基で修飾しようとする場合には化学法のみが使用可能であった。

しかし、化学法の場合、初めにベンゼン環をニトロ基で修飾し、これを還元してアミノ基とする、という反応が必要である。第一段階のニトロ化の反応は非常に困難なことから、化学法によるベンゼン環へのアミノ基の導入は非常に困難であった。従って、ベンゼン環のパラ位を特異的にニトロ基またはアミノ基で修飾する方法の開発が切望されていたといえる。

発明の概要

本発明は、二次代謝産物のベンゼン環のパラ位が窒素原子を含む官能基により修飾された二次代謝産物を生産できるように改変された形質転換体、および修飾された二次代謝産物を簡便に、かつ安価に製造する方法を提供することをその目的とする。

本発明者らは、ベンゼン環骨格を含むPF1022物質を生産する微生物を、コリスミ酸から

u

-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子を含むDNAによって形質転換し、ベンゼン環のパラ位がアミノ基により修飾されたPF1022物質を生産する形質転換体を得ることに成功した。

本発明による形質転換体は、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されていないベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を生産する微生物の形質転換体であって、コリスミ酸から

u

-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子（以下単に「生合成遺伝子」ということがある）を導入することによって、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を生産するように形質転換されたことを特徴とする形質転換体である。

本発明による製造法は、上記形質転換体を培養し、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を採取することを含んでなる、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物の製造法である。

本発明はまた、コリスミ酸から

u

-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する新規遺伝子を提供することもその目的とする。

本発明による新規遺伝子は、

配列番号2に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸

合成酵素活性を有するその改変配列をコードする遺伝子、

配列番号4に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性を有するその改変配列をコードする遺伝子、および

配列番号6に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するその改変配列をコードする遺伝子である。

図面の簡単な説明

図1は、ストレプトミセス・ヴェネズエラ (Streptomyces venezuelae) から単離した DNA 断片の制限酵素地図およびオープンリーディングフレームの位置を示す。

図2は、プラスミド pTrc-papA の構築を示す。

図3は、papA 遺伝子産物の酵素活性検出に用いたアミノ酸分析機のクロマトグラムを示す。

図4は、プラスミド pTrc-papB の構築を示す。

図5は、papB 遺伝子産物の酵素活性検出に用いたアミノ酸分析機のクロマトグラムを示す。

図6は、プラスミド pET-papC1 の構築を示す。

図7は、papC 遺伝子産物の酵素活性検出に用いたアミノ酸分析機のクロマトグラムを示す。

図8は、プラスミド pPF260-A2 および pPF260-A3 の構築を示す。

図9は Abp1 遺伝子を含む 6 kb の HindIII 断片の制限酵素地図を示す。

図10は pABPd の構成および制限酵素地図を示す。

図11は、プラスミド pPF260-B3 の構築を示す。

図12は、プラスミド pPF260-C3 の構築を示す。

図13は、ベンゼン環のパラ位がニトロ基若しくはアミノ基で修飾された PF1022 誘導体の検出に用いた HPLC のクロマトグラムを示す。

発明の具体的説明

微生物の寄託

実施例5に記載されるPF1022菌株は、1989年1月24日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-2671である。

マイセリア・ステリリア (Mycelia Sterilia) の形質転換体55-65は、1999年9月17日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7255である。

プラスミド pUC118-papA で形質転換された大腸菌（大腸菌 JM109）は、1999年9月17日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7256である。

プラスミド pTrc-papB で形質転換された大腸菌（大腸菌 JM109）は、1999年9月17日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7257である。

プラスミド pET-papC で形質転換された大腸菌（大腸菌 JM109）は、1999年9月17日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7258である。

形質転換される生物

本発明に用いることができる生物としては、ベンゼン環骨格を含む二次代謝産物を生産する生物を用いることができる。好ましい生物としては、コリスミ酸を経由して生合成される二次代謝産物、特に、フェニルピルビン酸、p-ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニルアラニン、チロシン、およびフェニル乳酸からなる群から選択される少なくとも一つのビルディングブロックから合成される二次代謝産物、を生産する生物が挙げられる。

好ましい生物としてはまた、ペプチドまたはデプシペプチド、特にフェニルア

ラニン、チロシン、およびフェニル乳酸からなる群から選択される少なくとも一つのビルディングブロックから合成されるペプチドあるいはデプシペプチド、を二次代謝産物として生産する生物が挙げられる。

このような二次代謝産物およびそれを生産する微生物は下記の通りである。

化合物と微生物名

オルスタチンD	<u>Bacillus cereus</u> KY-21, <u>Nigrosabulum</u> sp. 28Y1
ナノケリン	<u>Nannocystis exedens</u> Nae485
フォスフォノフェニルアラニル アルギニン	<u>Streptomyces rishiensis</u> NK-122
I 5 B 1	<u>Actinomadura spiculoospora</u> K-4
アフファチニンA	<u>Streptomyces</u> sp. WK-142
A-38533	<u>Streptomyces</u> sp.
メラノスタチン	<u>Streptomyces clavus</u> N924-1, <u>Streptomyces clavifer</u> N924-2
アルドスタチン	<u>Pseudoeurotium zonatum</u> M4109
N-アセチルL-フェニル アラニル-L-フェニル アラニノール	<u>Emericellopsis salmosynemata</u>
ベスタチン	<u>Streptomyces olivoverticuli</u>
エスタチンA	<u>Myceliophthora thermophila</u> M4323
N-(N-L-アルギニル- D-アロ-スレオニル)-L- フェニルアラニン	<u>Keratinophyton terreum</u> Tu 534
ストレプトチンP1	<u>Streptomyces tanabeensis</u>
WF-10129	<u>Doratomyces putredinis</u> F-214690
クロバミド	<u>Kobatiella caulivora</u>

SP-キモスタチンB	<u>Streptomyces nigrescens</u> WT-27, <u>Streptomyces libani</u> , <u>Streptomyces</u> sp. GE16457
アンチパイン	<u>Streptomyces</u> sp. KC84-AG13
ミロリジンK _A	<u>Metarrhizium anisopliae</u> U-47
チロスタチン	<u>Kitasatospora</u> sp. 55, <u>Streptomyces</u> sp. SAM-0986
デトキシシ	<u>Streptomyces caespitosus</u> var. <u>detoxicus</u> 7072 GC, <u>Streptomyces mobaraensis</u>
キモスタチン	<u>Streptomyces</u> sp.
トリデカブチン	<u>Bacillus polymyxa</u>
アラメサイシ	<u>Trichoderma viridis</u>
トリコセリン	<u>Trichoderma viride</u>
トリコスポリンB	<u>Trichoderma polysporum</u>
トリコジアニン	<u>Trichoderma polysporum</u> , <u>Trichoderma harzianum</u>
サマロスポリンI	<u>Emericellopsis microspora</u> , <u>Samarospora</u> sp., <u>Stibella</u> sp.
スズカシリンA	<u>Trichoderma viride</u>
トリコロギン	<u>Trichoderma longibrachiatum</u>
ザーバミシ	<u>Emericellopsis microspora</u> , <u>Emericellopsis salmosynnemata</u>
アンチアメピン	<u>Emericellopsis synnematicola</u> , <u>Emericellopsis poonesis</u> , <u>Cephalosporum pimprina</u>
グラミシジンC	<u>Bacillus brevis</u>
オクラトキシ	<u>Aspergillus ochraceus</u> , <u>Aspergillus melleus</u> , <u>Aspergillus sulphureus</u> , <u>Penicillium viridicatum</u>
FR-900261	<u>Petriella</u> sp., <u>Petriella guttulata</u> 3161
クラミドシ	<u>Diheterospora chlamydosporia</u>

トラボキシシ	<u>Helicoma ambiens</u> RF-1023
Cyl-1	<u>Cylindrocladium scoparium</u>
Cyl-2	<u>Cylindrocladium scoparium</u>
アスペルコリン	<u>Aspergillus versicolor</u>
ロツシン	<u>Zizyphus lotus</u>
リシュウミン	<u>Lycium chinense</u> Mill.
アベラニン	<u>Hamigera avellanea</u> , <u>Penicillium</u> sp. PF1119
シクロアスブチド	<u>Aspergillus</u> sp. NE-45
ボバルジン	<u>Bouvardia ternifolia</u> , <u>Rubia cordifolia</u>
シクロアマニドA	<u>Amanitia phalloides</u>
シクロアマニドB	<u>Amanitia phalloides</u>
ヘテロフィリンA	<u>Pseudostellarea heterophylla</u>
ポリミキシシ	<u>Bacillus polymyxa</u>
オクタペプチン	<u>Bacillus circulans</u> G493-B6, <u>Bacillus</u> sp. JP-301
Bu-2470A	<u>Bacillus circulans</u>
マイコサチリン	<u>Bacillus subtilis</u>
バシロマイシンD	<u>Bacillus subtilis</u> I-164, <u>Bacillus subtilis</u> Sc-3
イツリンA	<u>Bacillus subtilis</u>
シアノギシシ	<u>Microcystis aeruginosa</u>
バシトラシシ	<u>Bacillus subtilis</u> , <u>Bacillus licheniformis</u>
グラミシジンS	<u>Bacillus brevis</u>
アンタマニド	<u>Amanitia phalloides</u>
チロシジン	<u>Bacillus brevis</u>
コチナリン	<u>Cortinarius speciosissimus</u>
グラチシシ	<u>Bacillus brevis</u>
マイコバシリン	<u>Bacillus subtilis</u>
TL119	<u>Bacillus subtilis</u>

ビュウベロライド	<u>Beauveria bassiana</u> , <u>Isaria</u> sp.
ネオアンチマイシン	<u>Streptoverticillium orinoci</u>
MK 3 9 9 0	<u>Basidiobolus</u> sp. MK3990
ロイアラシン	<u>Hapsidospora irregularis</u> SANK 17182
A 5 4 5 5 6	<u>Streptomyces hawaiiensis</u>
エノペプチンB	<u>Streptomyces</u> sp. RK-1051
ビュウベリシン	<u>Beauveria bassiana</u>
キサントスタチン	<u>Streptomyces spiroverticillatus</u>
バリアペプチン	<u>Streptomyces citrus</u> K3619, <u>Streptomyces flavidovirens</u>
バージニアマイシン S ₁	<u>Streptomyces virginiae</u> , <u>Streptomyces alborectus</u>
シクロヘプタマイシン	<u>Streptomyces</u> sp.
WS-9326	<u>Streptomyces violaceusniger</u> 9326
フサリア フンギ シクロ ブシペプチド	<u>Fusarium sporotrichoides</u> , <u>Fusarium roseum</u> , <u>Fusarium tricinctum</u>
FR-900359	<u>Ardisia crenata</u>
ベルラメリン	<u>Verticillium lamellicola</u> MF4683
ジデムニン	<u>Trididermnum solidam</u>
リポペプチンA	<u>Streptomyces</u> sp. AC-69
20561	<u>Aeromonas</u> sp.
ネオペプチン	<u>Streptomyces</u> sp. K-710
オーレオバシジン	<u>Aureobasidium pullulans</u> R106
シリngoマイシン	<u>Pseudomonas syringae</u> pv. <u>Syringae</u>
プリバスタチン	<u>Bacillus cereus</u> BMG302-ff67
パーメチンA	<u>Bacillus circulans</u> H913-B4
BMY-28160	<u>Bacillus circulans</u>
ポリペプチンA	<u>Bacillus circulans</u>

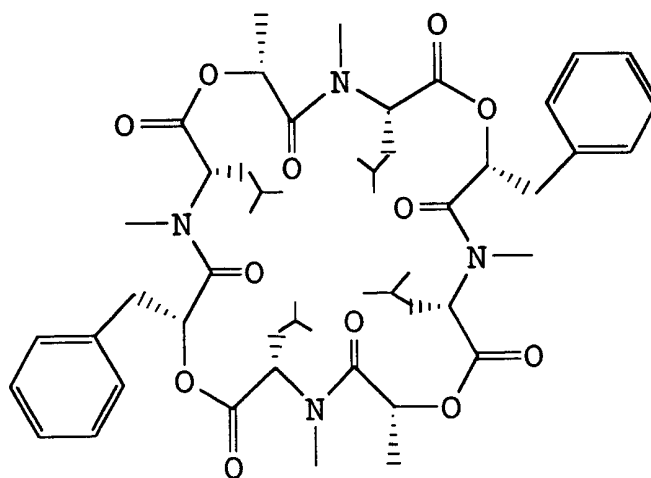
ブレビスチン	<u>Bacillus brevis</u>
ラモブラニン	<u>Actinoplanes</u> sp. ATCC33076
アンコベニン	<u>Streptomyces</u> sp. A-647P
デュラマイシン	<u>Streptomyces hachijoensis</u> var. <u>takahagiensis</u> E-312, <u>Streptoverticillium griseoluteus</u> 2075, <u>Streptoverticillium griseoverticillatum</u> PA-48009
シナマイシン	<u>Streptomyces cinnamoneus</u>
アクチノイジン	<u>Nocardia actinoides</u> SKF-AAJ-193, <u>Proactinomycetes actinoides</u>
PF1022物質	<u>Mycelia sterilia</u>

これらの物質は、Dictionary of Natural Products (Chapman & Hall, 1994) に記載されている。

本発明において形質転換される「生物」としては、細菌、酵母、およびカビのような微生物や植物が挙げられる。植物には植物細胞も含まれる。

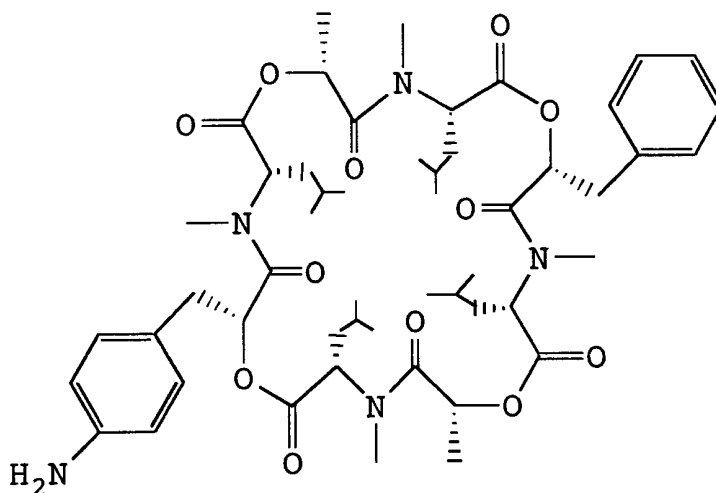
窒素原子を含む官能基の例としては、アミノ基およびニトロ基が挙げられる。

形質転換される生物が下記式で表されるPF1022物質：



を生産する微生物である場合、形質転換体から生産される二次代謝産物は下記式

で表されるアミノ基で修飾されたPF1022物質（以下「PF1022物質誘導体」という）：



であることができる。

PF1022物質 [シクロ (D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル-D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル)] は、アゴノマイセタレス (*Agonomycetales*) に属する糸状菌、PF1022菌株 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) により生産される環状デブシペプチドであり、動物寄生性の線虫類に対して極めて高い駆虫活性を示す (特開平3-35796号、Sasaki, T. et al. J. Antibiotics., 45, 692, (1992))。このため、PF1022物質は動物用の駆虫薬として有用であると共に、アミノ基で修飾されたその誘導体は高活性な本物質の誘導体を合成するための原料として有用である。

PF1022物質は4分子のL-ロイシン、2分子のD-乳酸、および2分子のD-フェニル乳酸からPF1022物質合成酵素により合成される。以下の理論に拘束される訳ではないが、(1) コリスミ酸からp-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子をPF1022物質生産菌に導入することにより、p-アミノフェニルピルビン酸が形質転換体において生産され、(2) これにD-フェニル乳酸デヒドロゲナーゼ (D-PLDH) が作用してp-アミノ-D-フェニル乳酸が形質転換体において生産され、(3) D-フェニル乳酸の代わりにp-アミノ-D-フェニル乳酸に対してPF1022物質合成酵素が

作用し、(4) PF1022物質誘導体が生産される、と考えられる。

生合成遺伝子

コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成に関与する酵素としては、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ、および4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼが挙げられる (Blanc, V., et al. Mol. Microbiol. 23, 191-202(1997))。コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路を概略すると下記の通りである：コリスミ酸に4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素が作用して4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸が生成し、生成した4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸に4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼが作用して4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸が生成し、生成した4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸に4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼが作用して p-アミノフェニルピルビン酸が生成する。

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素はコリスミ酸に作用して、これを4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸に変換する酵素を意味する。

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素は、コリスミ酸から p-アミノ安息香酸生合成系の一部として生物界に広く存在している。p-アミノ安息香酸はコリスミ酸から二段階の反応で生成される。この内初めの反応を4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素が触媒し、後の反応を4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼが触媒する (Green, J. M. and Nichols, B. P., J. Biol. Chem. 266, 12971-12975(1991))。

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子としては、大腸菌 (Kaplan, J. B. and Nichols, B. P., J. Mol. Biol. 168, 451-468(1983)、Goncharoff, P. and Nichols, B. P., J. Bacteriol. 159, 57-62(1984))、枯草菌 (Slock, J. et al., J. Bacteriol. 172, 7211-7226(1990))、クレブシラ・ニューモニアエ (Klebsiella pneumoniae) (Kaplan, J. B. et al., J. Mol. Biol. 183, 327-340(1985)、Goncharoff, P. and Nichols, B. P., Mol. Biol. Evol. 5, 531-548(1988))、ストレプトマイセス・プリスチナスピラリス (Streptomyces pristinaespiralis) (Blanc, V., et al. Mol. Microbiol. 23, 191-202(1997))、ストレプトマイセス・ベネズエラ (Streptomyces ven

ezuelae) (Brown, M. P. et al., Microbiology 142, 1345-1355(1996))、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) (Edman, J. C. et al., Yeast 9, 669-675(1993)) 由来のものが報告されており、これらを使用することが可能である。これら以外の4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子を、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有する生物より常法に従って単離して使用しても良い。

一方、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素は、大腸菌、枯草菌、クレブシラ・ニューモニアエ由来のもののように2つのポリペプチドに分かれているものと、一部の放線菌またはサッカロマイセス・セレビシエ由来のもののように一つのポリペプチドから成るものの二つに大別することができる。本発明では、複数の遺伝子を宿主に導入する必要があることから、一つのポリペプチドから成る4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子を利用することが好ましい。

本発明において、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子の好ましい例としては、配列番号2のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有するその改変配列をコードする遺伝子であり、より好ましくは、配列番号1に示されるDNA配列を含む遺伝子である。

本発明において「改変配列」とは置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上、例えば1~数個、の改変を有する配列をいう。

本発明において、改変アミノ酸配列が「4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有する」か否かは、そのアミノ酸配列からなるタンパク質を基質に作用させ、反応産物を検出することにより評価することができ、例えば、実施例2に記載の方法に従って評価することができる。

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼは、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸に作用してこれを4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸に変換する酵素を意味する。

4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼは、4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸に作用してこれをp-アミノフェニルピルビン酸に変換する酵素を意味する。

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子および4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、p-アミノフェニルピルビン酸を生合成できる生物から得ることができる。より具体的には、プリスチナマイシン I (pristinamycin I) を生産するストレプトマイセス・プリスチナスピラリス (Streptomyces pristinaespiralis)、ベルナマイシン B (vernamicin B) を生産するストレプトマイセス・ロイデンス (Streptomyces loidens)、コリネシン (corynesin) を生産するノカルジア・パラフィンカ (Nocardia paraffinnica) およびコリネバクテリウム・ハイドロカルボクラスタス (Corynebacterium hydrocarboclastus)、クロラムフェニコール (chloramphenicol) を生産するストレプトマイセス・ベネズエラ (Streptomyces venezuelae) 等が挙げられる。この内、ストレプトマイセス・プリスチナスピラリス (Streptomyces pristinaespiralis) からは、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼおよび4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードすると推定されるそれぞれの遺伝子が既に単離され、その塩基配列が明らかにされており (V. Blanc et al., Mol. Microbiol., 23, 191-202(1997))、本発明に利用可能である。

コリスミ酸ムターゼおよびプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードするそれぞれの遺伝子は、細菌、酵母、植物等から既に多数単離されており、これらを元にして蛋白質工学的的手法または進化工学的的手法を利用し、適切なアミノ酸を置換、欠失あるいは付加することによって4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性および4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を持つように改変することは可能であり、改変された遺伝子を本発明に利用することも可能である。

本発明において、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子の好ましい例としては、配列番号4のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性を有するその改変配列をコードする遺伝子であり、より好ましくは、配列番号3のDNA配列を含む遺伝子である。

本発明において、改変アミノ酸配列が「4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性を有する」か否かは、そのアミノ酸配列からなるタンパク質を基質に作用させ、反応産物を検出することにより評価することができ、例えば、実施

例3に記載の方法に従って評価することができる。

本発明において、4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の好ましい例としては、配列番号6のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するその改変配列をコードする遺伝子であり、より好ましくは、配列番号5のDNA配列を含む遺伝子である。

本発明において、改変アミノ酸配列が「4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する」か否かは、そのアミノ酸配列からなるタンパク質を基質に作用させ、反応産物を検出することにより評価することができる。例えば、実施例4に記載の方法に従って評価することができる。

本発明において生合成に関与する酵素のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするヌクレオチド配列は容易に定まり、配列番号2、4、および6に記載されるアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を選択することができる。従って、本発明による生合成遺伝子とは、配列番号1、3、および5に記載のDNA配列の一部または全部に加え、同一のアミノ酸をコードするDNA配列であって縮重関係にあるコドンでDNA配列として有する配列をも意味するものとし、更にこれらに対応するRNA配列も含まれる。

形質転換体

本発明の形質転換体は、コリスミ酸からp-アミノフェニルピルビン酸への生合成に関与する遺伝子を含んでなる、宿主細胞内で複製可能かつ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクター、を宿主に導入することにより得ることができる。

本発明においては複数の生合成遺伝子を宿主に導入する場合、各遺伝子は同一または別々のDNA分子に含まれていても良い。さらに、宿主が細菌である場合には、各遺伝子をポリシストロン性mRNAとして発現させるように設計し、一つのDNA分子とすることも可能である。

本発明において利用される発現ベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクター等から適宜選択することができる。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合は入ファージ系のバクテリオファージ、

pBR、pUC系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYE_p、YR_p、YC_p、YI_p系のプラスミドベクターが挙げられる。

また、使用されるプラスミドベクターの内、少なくとも一つは、形質転換体を選抜するための選択マーカを含むのが好ましく、選択マーカとしては薬剤耐性遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を使用することができる。その好ましい具体例としては、使用する宿主が細菌の場合は、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等であり、酵母の場合はトリプトファン生合成遺伝子 (TRP1)、ウラシル生合成遺伝子 (URA3)、ロイシン生合成遺伝子 (LEU2) 等であり、カビの場合はハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、プレオマイシン耐性遺伝子、オーレオバシジン耐性遺伝子等であり、植物の場合にはカナマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子等が挙げられる。

さらに発現ベクターにおいては、各遺伝子の発現に必要な制御配列、例えば、プロモーター、転写開始信号、リボソーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結信号等の転写調節信号、翻訳調節信号等が、生合成遺伝子に作動可能に連結されていてもよい。制御配列の選択および連結は常法に従って行うことができる。

プロモーターとしては、例えば、大腸菌においてはラクトースオペロン、トリプトファンオペロン等のプロモーターを、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、酸性フォスファターゼ遺伝子、ガラクトース資化性遺伝子、グリセロールデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子等のプロモーターを、カビでは α -アミラーゼ遺伝子、グルコアミラーゼ遺伝子、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、グリセロールデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、Abp1 遺伝子等のプロモーターを、植物ではCaMV 35SRNAプロモーター、CaMV 19SRNAプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター等を選択できる。

生物の形質転換には、カルシウムイオン法、リチウムイオン法、エレクトロポレーション法、PEG法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法等のような常法を用いることができ、形質転換される生物に応じて選択できる。

本発明においては、形質転換体を培養し、その培養物を得ることにより所望の修飾された二次代謝産物を得ることができる。本発明による形質転換体の培養も

常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。

培地としては、本発明の形質転換体が同化し得る炭素源、資化し得る窒素源、無機塩類、各種ビタミン、グルタミン酸またはアスパラギン等の各種アミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。また、本発明の形質転換体の発育を助け、目的とする二次代謝産物の生産を促進するような有機物および無機物を適当に添加することができる。さらに、必要に応じてその他の栄養物をほどよく含有する合成培地または天然培地を使用することができる。

培地に使用される炭素源および窒素源としては、本発明の形質転換体の利用可能なものならば何れの種類でも良い。同化し得る炭素源としては例えばショ糖、ブドウ糖、澱粉、グリセリン、グルコース、シュクロース、グリセロール、フラクトース、マルトース、マンニトール、キシロース、ガラクトース、リボース、デキストリン、動・植物油等またはその加水分解物等の種々の炭水化物が利用できる。その濃度は通常、培地に対して0.1%~5%が好ましい。

資化し得る窒素源としては例えばペプトン、肉エキス、コーン・ステープ・リカー、脱脂大豆粉等の動植物体成分または浸出エキス類、コハク酸アンモニウム塩類、酒石酸アンモニウム等の有機酸アンモニウム類、尿素その他各種無機酸若しくは有機酸の含窒素化合物も使用可能である。

また、無機塩類としては例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸およびその他のイオンを生成することのできる塩類が適宜使用できる。

勿論、その他の成分として例えば酵母等の微生物の菌体または浸出液および浸出エキス等、また植物体の細末を含む培地であっても本発明の形質転換体の生育および目的とする二次代謝産物の生産蓄積を妨げない限り何れをも適宜に使用し得る。また、栄養要求性を示す変異株を培養する場合には、その栄養要求性を満足させ得る物質を培地に加えるが、この種の栄養素は、天然物を含む培地を使用する場合は、特に添加を必要としない場合がある。

培地のpHは、例えばpH6~pH8程度である。培養法としては、好气的条件での振とう培養法、通気攪拌培養法または深部好気培養法により行うことがで

きる。培養に適当な温度は、15℃～40℃であるが、多くの場合26℃～37℃付近で生育する。目的とする二次代謝産物の生産は、培地および培養条件、または使用した宿主により異なるが、何れの培養法においても通常2日～25日間でその蓄積が最高に達する。目的とする二次代謝産物の量が最高になった時に培養を停止し、培養物から目的物質を単離、精製する。

これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気量等の培養条件は使用する形質転換体および外部の条件等に応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることはいうまでもない。液体培養において、発泡があるときは、シリコン油、植物油、鉱物油、界面活性剤等の消泡剤を適宜使用できる。このようにして得られた培養物に蓄積される目的とする二次代謝産物は、本発明の形質転換体内および培養濾液中に含有されるので、培養物を遠心分離して培養濾液と形質転換体とに分離し、各々から目的とする二次代謝産物を採取することが可能である。

培養濾液から目的とする二次代謝産物を採取するには、常法により、培養物から目的とする二次代謝産物を採取するのに用いられる手段を、単独若しくは任意の順序に組合せまたは反復して用いられる。すなわち、例えば抽出濾過、遠心分離、透析、濃縮、乾燥、凍結、吸着、脱着、各種溶媒に対する溶解度の差を利用する例えば沈澱、結晶化、再結晶、転溶、向流分配法、クロマトグラフィー等の手段が用いられる。

また、本発明の形質転換体内の培養物から、目的とする二次代謝産物を取得することができる。常法により、例えば培養物から抽出（磨砕処理、加圧破碎等）、回収（ろ過、遠心分離等）および精製（塩析法、溶媒沈殿法等）等の手法が用いられる。

得られた粗物質は、常法により、例えばシリカゲル、アルミナ等の担体を用いるカラムクロマトグラフィーまたはODS担体を用いる逆相クロマトグラフィーにより精製することができる。以上のような方法により、またはこれらを適宜組合せることにより、本発明の形質転換体の培養物から目的とする純粋な二次代謝産物が得られる。

P F 1 0 2 2 物質誘導体を生産する形質転換体

本発明の好ましい態様によれば、コリスミ酸から p-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子（生合成遺伝子）が導入された P F 1 0 2 2 物質生産菌の形質転換体が提供される。

この形質転換体は P F 1 0 2 2 物質誘導体を生産することができる。

形質転換される P F 1 0 2 2 物質生産菌は Mycelia sterilia、好ましくは、FERM BP-2671 の受託番号のもと生命工学技術研究所に寄託された菌株であることができる。

生合成遺伝子は、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子、および4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子からなることができる。4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子は、好ましくは、配列番号2に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有するその改変配列をコードする遺伝子であることができる。4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子は、好ましくは、配列番号4に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性を有するその改変配列をコードする遺伝子であることができる。4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、好ましくは、配列番号6に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するその改変配列をコードする遺伝子であることができる。

形質転換に用いられる発現ベクターとしては、P F 1 0 2 2 物質生産菌で機能する制御配列（プロモーター、ターミネーター等）に生合成遺伝子を作動可能に連結した発現ベクターが好ましく、最も好ましくは P F 1 0 2 2 菌株（Mycelia sterilia、FERM BP-2671）において機能する制御配列を生合成遺伝子に作動可能に連結した発現ベクターである。

形質転換体は、FERM BP-7255 の受託番号のもと生命工学工業技術研究所に寄託された形質転換体 55-65 株であることができる。

本発明の更なる態様によれば、P F 1 0 2 2 物質生産菌の形質転換体を培養し、

P F 1 0 2 2 物質誘導体を採取することを含んでなる、P F 1 0 2 2 物質誘導体の製造法が提供される。

実 施 例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 : ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*) から
の 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子、4-アミ
ノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子、および 4-アミノ-
4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の単離

(1) プローブ用 DNA 断片の取得

50 ml 分の液体培地 (2 % 可溶性デンプン、1 % ポリペプトン、0.3 % 肉エキス、0.05 % リン酸二水素カリウム、pH 7.0) を 250 ml 容の三角フラスコに作製した。この培地に、ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*) ISP52 30 株および 140-5 株をそれぞれ植菌し、28 °C、24 時間培養した。培養終了後、培養液から遠心により菌体を集め、これらの菌体より Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual (D. A. Hopwood et al., The John Innes Foundation, 1985) に記載の方法で染色体 DNA を調製した。

次に、上記ストレプトマイセス・ベネズエラ (*Streptomyces venezuelae*) ISP52 30 株の染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 7 および配列番号 8 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い PCR を行った。PCR は、TaKaRa LA PCR™ kit Ver. 2.1 (宝酒造社製) を使用し、GeneAmp PCR System 2400 (パーキン・エルマー社製) を用いて行った。反応液は、染色体 DNA を 1 μ l (0.62 μ g 相当量)、キットに添付の 10 倍濃度反応用緩衝液を 5 μ l、2.5mM dNTP 溶液を 8 μ l、100 pmol/ μ l の濃度に調整した上記プライマーを各 0.5 μ l ずつ、ジメチルスルホキシド (和光純薬社製) を 5 μ l、TaKaRa LA-Taq (2.5U) を 0.5 μ l、滅菌水を 29.5 μ l 加えて 50 μ l とした。反応は、94 °C、10 分間の前処理後、94 °C で 1 分間、50 °C で 1 分間、72 °C で 3 分間のインキュベーションを 25 サイクル行った。反応終了後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供した結果、約 2 k

bp の DNA 断片が特異的に増幅されている事が確認された。そこで、残りの反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、60 μ l のスケールで制限酵素 BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 2 kbp のバンドを常法に従って切り出して DNA 断片を回収した。

この DNA 断片をプラスミド pTrcHis B（インビトロジェン社製）の BamHI 部位にクローニングした。得られたプラスミドの挿入断片の制限酵素地図はブラウンら（M. P. Brown, et al, Microbiology, 142, 1345-1355 (1996)）によって示されている pabAB 遺伝子（U21728）のものと一致した事から、pabAB 遺伝子がクローニングされたと判断し、このプラスミドを pTH-PAB と命名した。後述する染色体 DNA ライブラリーのスクリーニングには、プラスミド pTH-PAB から制限酵素 BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動で分離、回収して得られる挿入断片をプローブとして用いた。

（2）染色体 DNA ライブラリーのスクリーニングと遺伝子の単離

ストレプトマイセス・ベネズエラ（Streptomyces venezuelae）140-5 株の染色体 DNA 約 10 μ g を制限酵素 Sau3AI で部分消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、10 kbp ~ 20 kbp の DNA 断片を分離、回収した。

こうして回収した 10 kbp ~ 20 kbp の DNA 断片約 0.5 μ g と、予め制限酵素 BamHI および XhoI で二重消化しておいた λ DASH II 1 μ g を T4 DNA リガーゼで連結し、Gigapack III パッケージングエキストラクト（ストラタジーン社製）を用いて in vitro パッケージし、染色体 DNA ライブラリーを作成した。これを大腸菌 XLI-Blue MRA に感染させる事によりプラークを形成させた。

（1）で単離した約 2 kbp の DNA 断片をプローブとして用い、ECL ダイレクト DNA/RNA ラベリング・検出システム（アマシャムファルマシアバイオテック社製）を使用してプラークハイブリダイゼーションを行い、約 24000 個のプラークをスクリーニングした。取得された陽性クローンの内 10 個について 2 次スクリーニングを行い、陽性クローンを純化した後、ファージ DNA を調製した。

これらファージ DNA を制限酵素 BamHI で消化し、サザン解析を行った結果、プローブは約 1.8 kbp および約 3.4 kbp の 2 種類の DNA 断片にハイブリダイズす

る事が明らかとなった。また、ファージ DNA の制限酵素地図の解析から、これら 2 種類の DNA 断片は染色体 DNA 上で隣り合う断片である事が明らかとなった。

そこで、これら 2 種類の DNA 断片の全塩基配列を蛍光 DNA シークエンサー ABI PRISM 377 (パーキン・エルマー社製) を用いて決定した。そして、オープンリーディングフレーム (ORF) を検索した結果、図 1 に示すように ORF I ~ I V の ORF を見出す事ができた。各 ORF から推定されるアミノ酸配列について、データベースを利用して既知のアミノ酸配列との相同性を検索した結果、ORF I は p-アミノ安息香酸合成酵素と、ORF II はプレフェン酸デヒドロゲナーゼと、ORF III はコリスミ酸ムターゼと相同性を示すことが明らかとなった。そこで、ORF I、II および III の遺伝子をそれぞれ papA、papC および papB と命名した。p papA がコードするアミノ酸配列および塩基配列をそれぞれ配列番号 2 および配列番号 1 に、papB がコードするアミノ酸配列および塩基配列をそれぞれ配列番号 4 および配列番号 3 に、papC がコードするアミノ酸配列および塩基配列をそれぞれ配列番号 6 および配列番号 5 に示した。

実施例 2 : 大腸菌における papA 遺伝子の発現

papA 遺伝子の翻訳領域を取得するため、実施例 1 に示した陽性クローン由来のファージ DNA を鋳型とし、配列番号 9 および配列番号 10 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行った。PCR は、DNA ポリメラーゼとして KOD Dash (東洋紡績社製) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (パーキン・エルマー社製) を用いて行った。反応液は、ファージ DNA を 1 μ l (1 μ g 相当量)、酵素に添付の 10 倍濃度反応用緩衝液を 5 μ l、2 mM dNTP 溶液を 5 μ l、100 pmol/ μ l の濃度に調整した上記プライマーを各 1 μ l ずつ、ジメチルスルホキシド (和光純薬社製) を 5 μ l、KOD Dash を 1 μ l、滅菌水を 31 μ l 加えて 50 μ l とした。反応は、94 $^{\circ}$ C、5 分間の前処理後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、50 $^{\circ}$ C で 2 秒間、72 $^{\circ}$ C で 30 秒間のインキュベーションを 15 サイクル行った。得られた反応液をフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、DNA ブラッキングキット (宝酒造社製) を用いて DNA 末端を平滑化した。さらに、T4 DNA キナーゼ

(和光純薬社製)を利用して5'末端をリン酸化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2 kbpのDNA断片を切り出し、回収した後、プラスミド pUC118 の SmaI 部位にクローニングし、プラスミド pUC118-papA を得た。

pUC118-papA の挿入断片について、蛍光 DNA シークエンサー ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (パーキン・エルマー社製)を用いて塩基配列を決定した結果、配列番号1に記載の塩基配列の2043番目のシトシンがアデニンに置換されていることが明らかとなった。これは、PCRによるDNA断片の増幅時のエラーと推定されたが、コードされるアミノ酸配列には変化が無いことから、pUC118-papA の挿入断片を以降の実験に用いることにした。

pUC118-papA を大腸菌 JM110 へ導入し、取得された形質転換体より常法によりプラスミドを調製した。これを制限酵素 BclI で消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2 kbpの BclI DNA断片を分離、回収した。

一方、プラスミド pTrc99A (アマシャムファルマシアバイオテク社製)を制限酵素 NcoI で消化し、Mung Bean Nuclease (和光純薬社製)を用いてDNA末端を平滑化した。これを更に制限酵素 SmaI で消化した後、T4 DNA リガーゼで自己連結してプラスミド pTrc101 を得た。

pTrc101 を制限酵素 BamHI で消化し、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製)処理を施した後、上述の2 kbpの BclI DNA断片と連結した。pTrc101 に含まれるプロモーターに対し、papA 遺伝子が正方向に挿入されたプラスミドを選択し、pTrc-papA と命名した。これまでのプラスミドの構築工程について図2に示した。

pTrc-papA を保持する大腸菌 JM109 株を、100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地 (1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) 中、37°Cで一晩培養した。得られた培養液1 mlを100 mlの同培地にシードし、30°C、4時間培養した後、1 mlの100 mMイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を添加し、さらに30°Cで3時間培養した。培養後、培養液から遠心により菌体を集め、4 mlの細胞破碎用緩衝液 (50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、5 mM EDTA、10%グリセロール) に懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。破碎後、遠心により上清を得、これを細胞抽出液とした。また、プラスミド pTr

c101 を保持する大腸菌 JM109 株についても同様の処理を行い、細胞抽出液を調製した。

この様にして調製した細胞抽出液を用いて酵素活性を測定した。すなわち、細胞抽出液を 100 μ l、蒸留水を 400 μ l、基質溶液（10 mM コリスミ酸バリウム塩（シグマ社製）、10 mM グルタミン（和光純薬社製）、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM MOPS（和光純薬社製）、pH 7.5）を 500 μ l 混合し、30 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。反応終了後、反応液の一部を全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V（日本電子株式会社製）を用いて分析した。

その結果、図 3 に示すように、pTrc-papA を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、チア-ユ ピー テンら（Chia-Yu P. Teng, et al, J. Am. C hem. Soc., 107, 5008-5009 (1985)）の方法に従って合成した 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸標品と同一の保持時間の位置にピークが検出された。一方、煮沸処理した細胞抽出液や、pTrc101 を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合にはその位置にピークは検出されなかった。以上の結果から papA 遺伝子は 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードしていることが示された。

実施例 3：大腸菌における papB 遺伝子の発現

papB 遺伝子の翻訳領域を取得するため、実施例 1 に示した陽性クローン由来のファージ DNA を鋳型とし、配列番号 11 および配列番号 12 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行った。PCR は、DNA ポリメラーゼとして KOD Dash（東洋紡績社製）を使用し、GeneAmp PCR System 9700（パーキン・エルマー社製）を用いて行った。反応液は、ファージ DNA を 1 μ l（1 μ g 相当量）、酵素に添付の 10 倍濃度反応用緩衝液を 5 μ l、2 mM dNTP 溶液を 5 μ l、100 pmol/ μ l の濃度に調整した上記プライマーを各 1 μ l ずつ、ジメチルスルホキシド（和光純薬社製）を 5 μ l、KOD Dash を 1 μ l、滅菌水を 31 μ l 加えて 50 μ l とした。反応は、94 $^{\circ}$ C、5 分間の前処理後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、50 $^{\circ}$ C で 2 秒間、72 $^{\circ}$ C で 30 秒間のインキュベーションを 15 サイクル行った。得られた反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、制限酵素 BamHI で消化し

た後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 0.3 kbp のバンドを定法に従って切り出して DNA 断片を回収した。

pTrc101 を制限酵素 BamHI で消化し、アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）処理を施した後、上述の 0.3 kbp の BamHI DNA 断片と T4 DNA リガーゼで連結した。pTrc101 に含まれるプロモーターに対し、papB 遺伝子が正方向に挿入されたプラスミドを選択し、pTrc-papB と命名した（図 4）。pTrc-papB の挿入断片について、蛍光 DNA シークエンサー ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（パーキン・エルマー社製）を用いて塩基配列を決定し、配列番号 3 に記載の塩基配列と一致していることを確認した。

pTrc-papB を保持する大腸菌 JM109 株を、100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地（1 %バクトトリプトン、0.5 %酵母エキス、0.5 %塩化ナトリウム）中、37 °Cで一晩培養した。得られた培養液 1 ml を 100 ml の同培地にシードし、37 °C、2 時間培養した後、1 ml の 100 mM イソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添加し、さらに 37 °C で 5 時間培養した。培養後、培養液から遠心により菌体を集め、4 ml の細胞破碎用緩衝液（50 mM トリス-塩酸（pH 8.0）、5 mM EDTA、10 %グリセロール）に懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。破碎後、遠心により上清を得、これを細胞抽出液とした。また、プラスミド pTrc101 を保持する大腸菌 JM109 株についても同様の処理を行い、細胞抽出液を調製した。

この様にして調製した細胞抽出液を用いて酵素活性を測定した。すなわち、細胞抽出液を 50 μ l、蒸留水を 200 μ l、基質溶液（2 mg/ml 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM MOPS（和光純薬社製）、pH 7.5）を 250 μ l 混合し、30 °C、1 時間反応させた。反応終了後、反応液の一部を全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V（日本電子株式会社製）を用いて分析した。

その結果、図 5 に示すように、pTrc-papB を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸のピークが減少し、4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークが新たに検出された。また、5 分間煮沸処理を施した細胞抽出液を用いた場合でも同様の結果が得られた。

一方、pTrc101 を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、

4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸のピークに変化が無く、4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークも検出されなかった。以上の結果から papB 遺伝子が4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードしていることおよび papB 遺伝子にコードされる4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼは5分間の煮沸処理でも失活しないだけの耐熱性を有していることが示された。

実施例4：大腸菌における papC 遺伝子の発現

papC 遺伝子の翻訳領域を取得するため、実施例1に示した陽性クローン由来のファージ DNA を鋳型とし、配列番号13および配列番号14に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行った。PCR は、DNA ポリメラーゼとして KOD Dash (東洋紡績社製) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (パーキン・エルマー社製) を用いて行った。反応液は、ファージ DNA を 1 μ l (1 μ g 相当量)、酵素に添付の10倍濃度反作用緩衝液を 5 μ l、2 mM dNTP 溶液を 5 μ l、100 pmol/ μ l の濃度に調整した上記プライマーを各 1 μ l ずつ、ジメチルスルホキシド (和光純薬社製) を 5 μ l、KOD Dash を 1 μ l、滅菌水を 31 μ l 加えて 50 μ l とした。反応は、94 $^{\circ}$ C、5分間の前処理後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、50 $^{\circ}$ C で 2 秒間、72 $^{\circ}$ C で 30 秒間のインキュベーションを 15 サイクル行った。得られた反応液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) で抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿を滅菌水に再溶解し、制限酵素 BamHI で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1 kbp のバンドを常法に従って切り出して DNA 断片を回収した。

プラスミド pET-11c (ストラタジーン社製) を制限酵素 BamHI で消化し、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) 処理を施した後、上述の 1 kbp の BamHI DNA 断片と T4 DNA リガーゼで連結した。pET-11c に含まれるプロモーターに対し、papC 遺伝子が正方向に挿入されたプラスミドを選択し、pET-papC と命名した。

pET-papC の挿入断片について、蛍光 DNA シークエンサー ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (パーキン・エルマー社製) を用いて塩基配列を決定し、配列番号5に記載の塩基配列と一致していることを確認した。

一方、pET-papC を用いて papC 遺伝子を発現させた場合、ベクター由来の 14

アミノ酸から成るペプチドが papC 遺伝子産物の N 末端側に付加されるため、pa
pC 遺伝子産物の性質を正確に評価できないことが予想された。そこで、pET-pap
C を制限酵素 NdeI で消化した後、T4 DNA リガーゼで自己連結してプラスミド p
ET-papC1 を得た。pET-papC1 を用いることで、融合蛋白質としてではなく、pap
C 遺伝子産物そのものを大腸菌で生産させることが可能となった。これまでのプ
ラスミドの構築工程について図 6 に示した。

pET-papC1 を保持する大腸菌 BL21(DE3) 株を、100 μ g/ml のアンピシリンを
含む LB 液体培地 (1 % バクトトリプトン、0.5 % 酵母エキス、0.5 % 塩化ナトリ
ウム) 中、37 °C で一晚培養した。得られた培養液 1 ml を 100 ml の同培地にシー
ドし、37 °C、2 時間培養した後、1 ml の 100 mM イソプロピルチオガラクトシ
ド (IPTG) を添加し、さらに 37 °C で 5 時間培養した。培養後、遠心により菌体
を集め、4 ml の細胞破碎用緩衝液 (50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、5 mM ED
TA、10 % グリセロール) に懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。破
碎後、遠心により上清を得、これを細胞抽出液とした。また、プラスミド pET-1
1c を保持する大腸菌 BL21(DE3) 株についても同様の処理を行い、細胞抽出液を
調製した。

この様にして調製した細胞抽出液を用いて酵素活性を測定した。すなわち、本
細胞抽出液を 40 μ l、実施例 3 に記載の pTrc-papB を保持する大腸菌から調製し
且つ煮沸処理を施した細胞抽出液を 10 μ l、蒸留水を 190 μ l、10 mM NAD 溶
液を 10 μ l、基質溶液 (2 mg/ml 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸、10 mM
塩化マグネシウム、100 mM MOPS (和光純薬)、pH 7.5) を 250 μ l 混合し、
30 °C、1 時間反応させた。反応終了後、反応液の一部を全自動アミノ酸分析機 J
LC-500/V (日本電子株式会社製) を用いて分析した。

その結果、図 7 に示すように、pET-papC1 を保持する大腸菌から調製した細胞
抽出液を用いた場合には、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸のピークが減少
し、さらに papB 遺伝子産物によって生じる 4-アミノ-4-デオキシプレフェ
ン酸のピークも消失していた。p-アミノフェニルピルビン酸は全自動アミノ酸
分析機 JLC-500/V において検出されないため、その生成を直接確認することはで
きなかった。

しかし、p-アミノフェニルアラニンのピークが検出され、これは papC 遺伝子産物によって生じた p-アミノフェニルピルビン酸が大腸菌のアミノトランスフェラーゼによりアミノ化されて生じたものと推定された。一方、煮沸処理を施した細胞抽出液および pET-11c を保持する大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた場合には、papB 遺伝子産物によって生じた 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸のピークに変化はなかった。以上の結果から papC 遺伝子は 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードしていることが示された。

実施例 5 : PF1022 生産菌導入用プラスミド pPF260-A2 および pPF260-A3 の構築

PF1022 生産菌内で papA 遺伝子を発現させるためのプラスミド pPF260-A2 および pPF260-A3 は図 8 に示すようにして構築した。

PF1022 生産菌用発現ベクター pABPd を構築し、次いでこれに実施例 2 に記載のプラスミド pUC118-papA より得られた DNA 断片を連結して発現ベクターとした。具体的には下記のようにして発現ベクターを構築した。

PF1022 物質生産菌のゲノム DNA の単離

PF1022 物質生産菌 (FERM BP-2671) のゲノム DNA の単離は (H. Horiuchi et. al., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)) に記載の方法に従った。具体的には、まず PF1022 菌株 (FERM BP-2671) を種培地 (可溶性澱粉 2.0%、グルコース 1.0%、ポリペプトン 0.5%、小麦胚芽 0.6%、酵母エキス 0.3%、大豆粕 0.2% および炭酸カルシウム 0.2%; 殺菌前が pH 7.0; WO97/00944 号 実施例 1 参照) で 2 日間培養し、遠心分離 (3500rpm、10 分) によって菌体を回収した。次いで、得られた菌体を凍結乾燥後、TE に懸濁し、3%SDS 溶液中、60℃、30 分間処理後、TE 飽和フェノール抽出により、菌体残渣を除去した。抽出液はエタノール沈殿化後、リボヌクレアーゼ A (シグマ社製) およびプロテイナーゼ K (和光純薬社製) 処理し、さらに 12% ポリエチレングリコール 6000 により核酸を沈殿化させた。これを TE 飽和フェノール抽出、エタノール沈殿化を行い、同沈殿を TE に溶解し、これをゲノム DNA とした。

PF1022 物質生産菌のゲノムライブラリーの作製

上記のように調製した PF1022 物質生産菌由来ゲノム DNA を Sau3AI により部分消化した。これをファージベクター、 λ EMBL3 クローニングキット（ストラタジーン社製）の BamHI アームに T4 リガーゼ（宝酒造社製ライゲーションキット Ver.2）を用いて連結させた。これをエタノール沈澱後、TE に溶解した。連結混合物の全量をギガパック III プラスパッケージングキット（ストラタジーン社製）を用いて、大腸菌 LE392 株に感染させ、ファージプラークを形成させた。この方法により得られた 1.3×10^4 個 (2.6×10^4 PFU/ml) のファージライブラリーを用いて Abp1 遺伝子のクローニングを行った。

PF1022 物質生産菌由来のゲノム DNA からの Abp1 遺伝子クローニング

プローブは Abp1 遺伝子の翻訳領域を PCR 法により増幅し、用いた。前記のように PF1022 物質生産菌から調製したゲノム DNA を鋳型に、8-73U および 8-73R なる合成プライマーを用いて、レッツゴー PCR キット（サワディーテクノロジー社製）に従い PCR を行った。PCR の反応条件は、94 °C 30 秒間、50 °C 30 秒間、72 °C 90 秒間のステップを 25 回繰り返すことにより増幅を行った。以下に 8-73U および 8-73R の DNA 配列を示す。

8-73U: CTCAAACCCAGGAACTCTTTC (配列番号 15)

8-73R: GACATGTGGAAACCACATTTTG (配列番号 16)

このようにして得られた PCR 産物は ECL ダイレクトシステム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、標識化した。前記のように作成したファージプラークを、ハイボンド N+ナイロントランスファーメンブラン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に転写し、アルカリ変成後、5 倍濃度 SSC (SSC: 15mM クエン酸 3 ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、乾燥させ DNA を固定した。キットに記載の方法に従って、1 時間のプレハイブリダイゼーション (42 °C) の後、先の標識化したプローブを添加し、16 時間 (42 °C) ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は前述キットに記載の方法に従った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、検出溶液に 1 分間浸したあと、メディカル X 線フィルム（富士写真フィルム社製）に感光させ、1 個の陽性クローンを得た。本クローンはサザン解析の結果、少なくとも 6kb の HindIII 断片がゲノム DNA の制限酵素断片長と一致していた。この HindIII 断片の制限酵素地図

を図9に示す。HindIII断片はpUC119にサブクローニングし(pRQHin/119)、以降の実験に供した。

発現ベクターの構築

pRQHin/119を鋳型にAbp1遺伝子のプロモーター領域およびターミネーター領域をPCR法を用いて増幅した。プロモーターの増幅はABP-NecoおよびABP-Nbam、一方、ターミネーターの増幅はABP-CbamおよびABP-Cxbaなるプライマーを用い、PCRスーパーミックスハイファイデリティ(ライフテックオリエンタル社製)によりPCR法を行った。反応条件は、94℃30秒間、50℃30秒間、72℃90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下にABP-Neco、ABP-Nbam、ABP-CbamおよびABP-CxbaのDNA配列を示す。

ABP-Neco: GGGGAATTCGTGGGTGGTGATATCATGGC (配列番号17)

ABP-Nbam: GGGGGATCCTTGATGGGTTTTGGG (配列番号18)

ABP-Cbam: GGGGGATCCTAAACTCCCATCTATAGC (配列番号19)

ABP-Cxba: GGGTCTAGACGACTCATTGCAGTGAGTGG (配列番号20)

各PCR産物はマイクロスピンス-400カラム(アマシャムファルマシアバイオテック社製)で精製し、エタノール沈殿化の後、プロモーターはEcoRIおよびBamHI、ターミネーターはBamHIおよびXbaIで消化し、同様の酵素で消化したpBluescriptII KS+に順次連結した。これをXbaIで消化し、pMKD01(WO98/03667号)由来デストマイシン耐性カセットを挿入しpABPdを構築した(図10)。pABPdはAbp1遺伝子のプロモーターおよびターミネーターを有する。

実施例2に記載のプラスミドpUC118-papAより約2kbpのBclIDNA断片を調製した。これを、PF1022生産菌用発現ベクターpABPdのBamHI部位に挿入し、プラスミドpPF260-Aを得た。

次に、pPF260-Aを制限酵素PstIおよびBanHIで二重消化し、約1.7kbpのDNA断片を調製した。これをpUC119のPstIおよびBamHI部位にサブクローニングし、プラスミドpUC119-Aを得た。pUC119-Aを鋳型DNA、配列番号21に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、Muta-Gene in vitro ミュータジェネシスキット(バイオラッド社製)を用いて部位特異的変異処理を施し、プラスミドpUC119-A1を得た。

次に、pUC119-A1 および pPF260-A を制限酵素 PstI および BamHI で二重消化し、約 1.7 kbp および約 8.6 kbp の DNA 断片を調製した後、これらを連結してプラスミド pPF260-A2 を得た。さらに、pPF260-A2 を制限酵素 XbaI で消化した後、T4 DNA リガーゼで自己連結してプラスミド pPF260-A3 を得た。

実施例 6 : PF1022 生産菌導入用プラスミド pPF260-B3 の構築

PF1022 生産菌内で papB 遺伝子を発現させるためのプラスミド pPF260-B3 は図 1 1 に示すようにして構築した。

実施例 3 に記載のプラスミド pTrc-papB より約 0.3 kbp の BamHI DNA 断片を調製した。これを発現ベクター pABPd (実施例 5) の BamHI 部位に挿入し、プラスミド pPF260-B を得た。pPF260-B を制限酵素 XbaI で消化した後、T4 DNA リガーゼで自己連結してプラスミド pPF260-B1 を得た。

次に、pPF260-B1 を制限酵素 PstI で消化し、約 0.6 kbp の DNA 断片を調製した。これを pUC118 の PstI 部位に、papB 遺伝子の向きが lacZ 遺伝子と同じ向きになるようにサブクローニングし、プラスミド pUC118-B を得た。pUC118-B を鋳型 DNA、配列番号 2 2 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、MutaGene in vitro ミュータジェネシスキット (バイオラッド社製) を用いて部位特異的変異処理を施し、プラスミド pUC118-B1 を得た。

次に、pUC118-B1 および pPF260-B1 を制限酵素 PstI で消化し、約 0.6 kbp および約 8.0 kbp の DNA 断片をそれぞれ調製した後、これらを連結してプラスミド pPF260-B3 を得た。

実施例 7 : PF1022 生産菌導入用プラスミド pPF260-C3 の構築

PF1022 生産菌内で papC 遺伝子を発現させるためのプラスミド pPF260-C3 は図 1 2 に示すようにして構築した。

実施例 4 に記載のプラスミド pET-papC より約 1 kbp の BamHI DNA 断片を調製した。これを発現ベクター pABPd (実施例 5) の BamHI 部位に挿入し、プラスミド pPF260-C を得た。pPF260-C を制限酵素 XbaI で消化した後、T4 DNA リガーゼで自己連結してプラスミド pPF260-C1 を得た。

次に、pPF260-C1 を制限酵素 PstI および SphI で二重消化し、約 1.7 kbp の DNA 断片を調製した。これを pUC118 の PstI および SphI 部位にサブクローニング

し、プラスミド pUC118-C を得た。pUC118-C を鋳型 DNA、配列番号 2 3 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、Muta-Gene in vitro ミュータジェネシスキット（バイオラッド社製）を用いて部位特異的変異処理を施し、プラスミド pUC118-C1 を得た。

次に、pUC118-C1 および pPF260-C1 を制限酵素 PstI および SphI で二重消化し、約 1.7 kbp および約 7.6 kbp の DNA 断片をそれぞれ調製した後、これらを T4 DNA リガーゼで連結してプラスミド pPF260-C3 を得た。

実施例 8 : PF1022 生産菌の形質転換

pPF260-A2、pPF260-A3、pPF260-B3 および pPF260-C3 をそれぞれ 1 μ g、3 μ g、3 μ g および 3 μ g となるように混合し、エタノールで沈殿させた後、10 μ l の TE 緩衝液（10 mM トリス-塩酸（pH 8.0）、1 mM EDTA）に再溶解した。このようにして調製した DNA 溶液を用いて、WO97/00944 号の実施例 1 に記載の方法で PF1022 生産菌を形質転換した。具体的には、PF1022 生産菌を実施例 5 に記載の種培地で、26°C、48 時間培養した。その後、3000 r.p.m.、10 分間の遠心分離により、菌糸体を集菌し、0.5M シュークロース溶液で洗浄した。得られた菌糸体を、 β -グルクロニダーゼ（シグマ社製）3mg/ml、キチナーゼ（シグマ社製）1mg/ml 及びザイモラーゼ（生化学工業社製）1mg/ml を含む 0.5M シュークロース溶液中で、30°C、2 時間振とうすることによりプロトプラスト化させた。得られた混合物を濾過し、菌体残さを除去した。SUTC 緩衝液（0.5M シュークロース、10mM トリス-塩酸（pH 7.5）、10mM 塩化カルシウム）で 2 回遠心分離（2500 r.p.m.、10 分間、4°C）することによりプロトプラストを洗浄し、次いで、SUTC 緩衝液で 1×10^8 個/ml のプロトプラスト懸濁液を調製した。

プロトプラスト懸濁液 100 μ l に、先に調製したプラスミド DNA 溶液を加え、得られた混合物を氷冷下に 5 分間放置した。その後、当該混合物に、400 μ l のポリエチレングリコール溶液（60% ポリエチレングリコール 4000（和光純薬）、10mM トリス-塩酸（pH 7.5）、10mM 塩化カルシウム）を加え、得られた混合物を氷冷下に 20 分間放置した。

以上のように処理したプロトプラストを、SUTC 緩衝液で洗浄した後、同緩衝液に再懸濁した。得られた懸濁液を 100 μ g/ml のハイグロマイシン B 及び 0.5M シュークロ

ースを含むポテトデキストロース寒天培地に、ポテトデキストロース軟寒天培地と共に重層した。26°Cにて5日間培養し、現れたコロニーを形質転換体とした。

得られた形質転換体より染色体 DNA を調製し、これらを鋳型 DNA とし、サイクル数を 25 サイクルとした以外は実施例 2、3、および 4 に記載の条件で PCR を行い、papA、papB および papC 遺伝子の検出を行った。その結果、3 種全ての遺伝子が導入された形質転換体として 55-65 株 (FERM BP-7255) を選抜した。

実施例 9 : PF1022 生産菌形質転換体の培養と PF1022 誘導体の検出

実施例 8 において選抜した形質転換体 55-65 株 (FERM BP-7255) および親株を WO97/20945 号に記載されている条件に従って培養した。即ち、実施例 5 に記載の種培地で、26°C、2日間培養した。得られた培養液 2ml を 50ml の生産培地 (小麦胚芽 0.6%、ファーマメディア 1.0%、可溶性澱粉 2.6%、水飴 6.0%、MgSO₄ · 7H₂O 0.2%、NaCl 0.2%) に植菌し、さらに 26°C、6日間培養した。培養終了後、40 ml 分の培養液から遠心により菌体を集め、30 ml の酢酸エチルで抽出した。抽出液を濃縮乾固した後、2 ml のアセトニトリルに再溶解した。このうち 10 μl を HPLC 分析に供した。

HPLC 分析の条件は、

HPLC システム : 株式会社 日立製作所 655A-11

カラム : Inertsil ODS-2 4.6 X 250 mm

移動相 : アセトニトリル : 水 = 70 : 30

流速 : 1.0 ml/min

カラム温度 : 40 °C

検出器 : 日本分光工業株式会社 870-UV

UV 波長 : 245 nm

とした。

図 13 に示したように、形質転換体 55-65 株には、PF1022-268 (WO97/11064 号実施例 1、Cyclo[MeLeu-Lac-MeLeu-(O₂N)PhLac-MeLeu-Lac-MeLeu-PhLac]) および PF1022-269 (WO97/11064 号実施例 2、Cyclo[MeLeu-Lac-MeLeu-(H₂N)PhLac-MeLeu-Lac-MeLeu-PhLac]) と保持時間が一致するピークが検出された。一方、

これらのピークは親株には検出されなかった。また、形質転換体由来の抽出液と各標準品を混合した後に HPLC 分析を行った実験において、これらのピークが標準品のピークと完全に重なることが示された。さらに、これらのピークに含まれる物質について、LC-MS（四重極型ベンチトップ LC/MS システム NAVIGATOR with aQa™（サーモクエスト株式会社製）を用いて質量スペクトルを測定した結果、標準品のものと一致した。

以上の結果から、papA、papB および papC 遺伝子の 3 種が全て導入された形質転換体 55-65 株が、ベンゼン環のパラ位がニトロ基若しくはアミノ基で修飾された PF1022 物質誘導体を生産することが明らかとなった。

請求の範囲

1. パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されていないベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を生産する生物の形質転換体であって、コリスミ酸から *p*-アミノフェニルピルビン酸への生合成経路に関与する遺伝子（生合成遺伝子）を導入することによって、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を生産するように形質転換されたことを特徴とする、形質転換体。

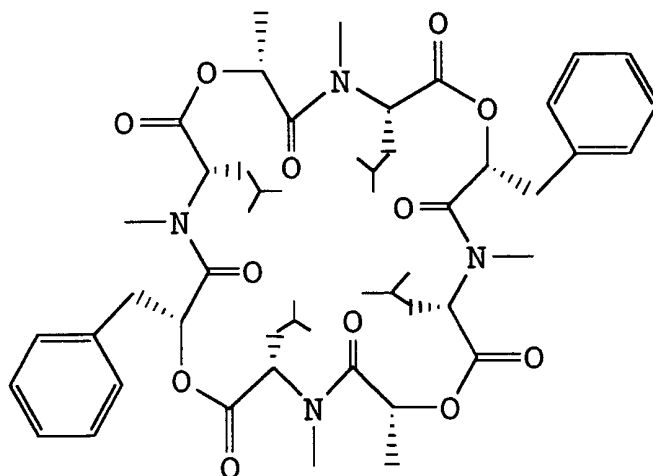
2. 形質転換される生物が、コリスミ酸を経由して生合成される二次代謝産物を生産する生物である、請求項 1 に記載の形質転換体。

3. コリスミ酸を経由して生合成される二次代謝産物が、フェニルピルビン酸、*p*-ヒドロキシフェニル乳酸、フェニルアラニン、チロシン、およびフェニル乳酸からなる群から選択される少なくとも一つのビルディングブロックから合成されることを特徴とする、請求項 2 に記載の形質転換体。

4. 形質転換される生物が、ペプチドまたはデプシペプチドを二次代謝産物として生産する生物である、請求項 1 に記載の形質転換体。

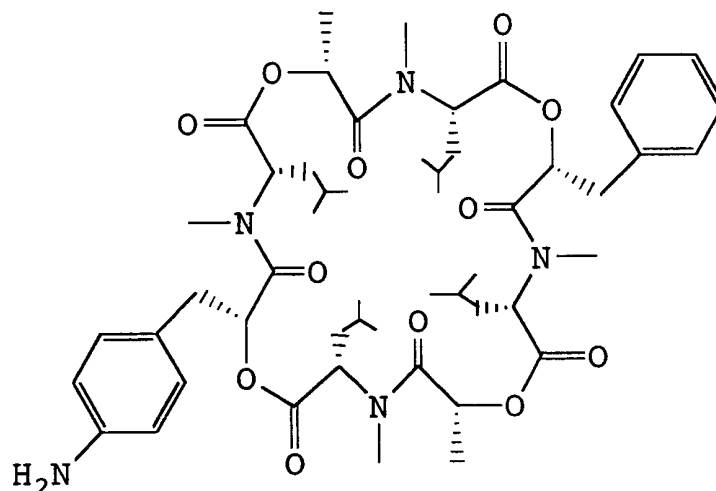
5. ペプチドまたはデプシペプチドが、フェニルアラニン、チロシン、およびフェニル乳酸からなる群から選択される少なくとも一つのビルディングブロックから合成されることを特徴とする、請求項 4 に記載の形質転換体。

6. 形質転換される生物が、下記式の化合物：



を生産する微生物である、請求項 1 に記載の形質転換体。

7. 形質転換体から生産される二次代謝産物が、下記式の化合物：



であることを特徴とする、請求項6に記載の形質転換体。

8. 生合成遺伝子が、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子、および4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子からなる、請求項1~7のいずれか一項に記載の形質転換体。

9. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子、および4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子からなる生合成遺伝子のうち少なくとも一つが、ストレプトマイセス属、ノカルジア属、またはコリネバクテリウム属由来の遺伝子である、請求項8に記載の形質転換体。

10. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子が、配列番号2に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項8または9に記載の形質転換体。

11. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子が、配列番号1のDNA配列からなることを特徴とする、請求項8~10のいずれか一項に記載の形質転換体。

12. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子が、配列番号4に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ム

ターゼ活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の形質転換体。

13. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子が、配列番号 3 の DNA 配列からなることを特徴とする、請求項 8、9、または 12 に記載の形質転換体。

14. 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列または 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の形質転換体。

15. 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、配列番号 5 の DNA 配列からなることを特徴とする、請求項 8、9、または 14 に記載の形質転換体。

16. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子、および 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、それぞれ、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列または 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチド、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列または 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチド、および配列番号 6 に記載のアミノ酸配列または 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の形質転換体。

17. 4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素をコードする遺伝子、4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子、および 4-アミノ-4-デオキシプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、それぞれ、配列番号 1 の DNA 配列、配列番号 3 の DNA 配列、および配列番号 5 の DNA 配列からなることを特徴とする、請求項 8、9、または 16 に記載の形質転換体。

18. 形質転換される生物が微生物である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項

に記載の形質転換体。

19. 微生物が *Mycelia sterilia* である、請求項 18 に記載の形質転換体。

20. *Mycelia sterilia* が FERM BP-2671 の受託番号のもと生命工学工業技術研究所に寄託された PF1022 菌株である、請求項 19 に記載の形質転換体。

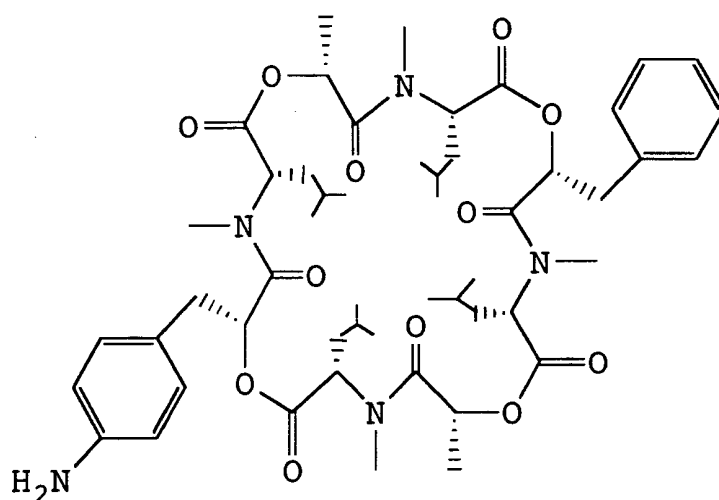
21. FERM BP-7255 の受託番号のもと生命工学工業技術研究所に寄託された 55-65 株である、請求項 1~20 のいずれか一項に記載の形質転換体。

22. 形質転換される生物が植物である、請求項 1~17 のいずれか一項に記載の形質転換体。

23. 請求項 1~22 のいずれか一項に記載の形質転換体を培養し、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物を採取することを含んでなる、パラ位が窒素原子を含む官能基により置換されたベンゼン環骨格を有する二次代謝産物の製造法。

24. 窒素原子を含む官能基がニトロ基またはアミノ基である、請求項 23 の製造法。

25. 請求項 6、19、20、または 21 に記載の形質転換体を培養し、下記式で表される PF1022 物質誘導体を採取することを含んでなる、PF1022 物質誘導体の製造法。



26. 配列番号2に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸合成酵素活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチド。

27. 配列番号1に記載のDNA配列からなる、請求項26に記載のポリヌクレオチド。

28. 配列番号4に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸ムターゼ活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチド。

29. 配列番号3に記載のDNA配列からなる、請求項28に記載のポリヌクレオチド。

30. 配列番号6に記載のアミノ酸配列または4-アミノ-4-デオキシブレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するその改変配列をコードするポリヌクレオチド。

31. 配列番号5に記載のDNA配列からなる、請求項30に記載のポリヌクレオチド。

1 / 12

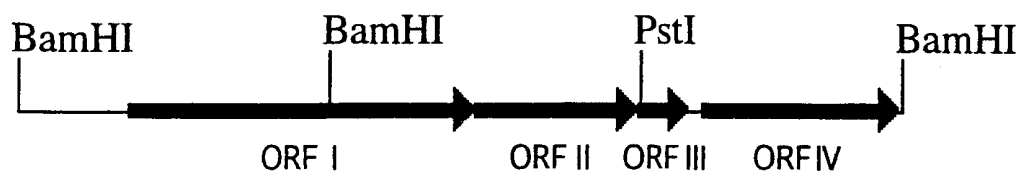


FIG. 1

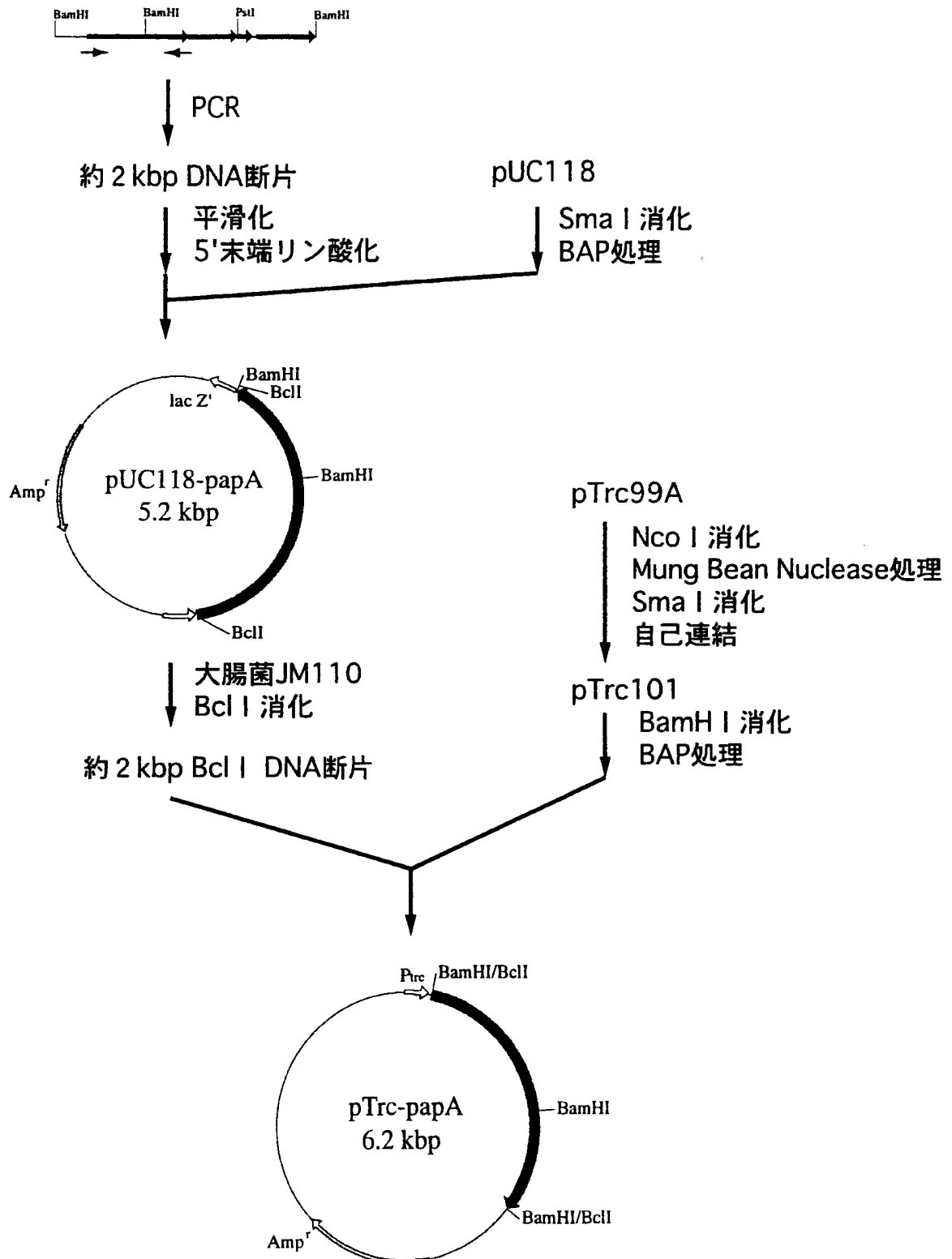


FIG. 2

3 / 12

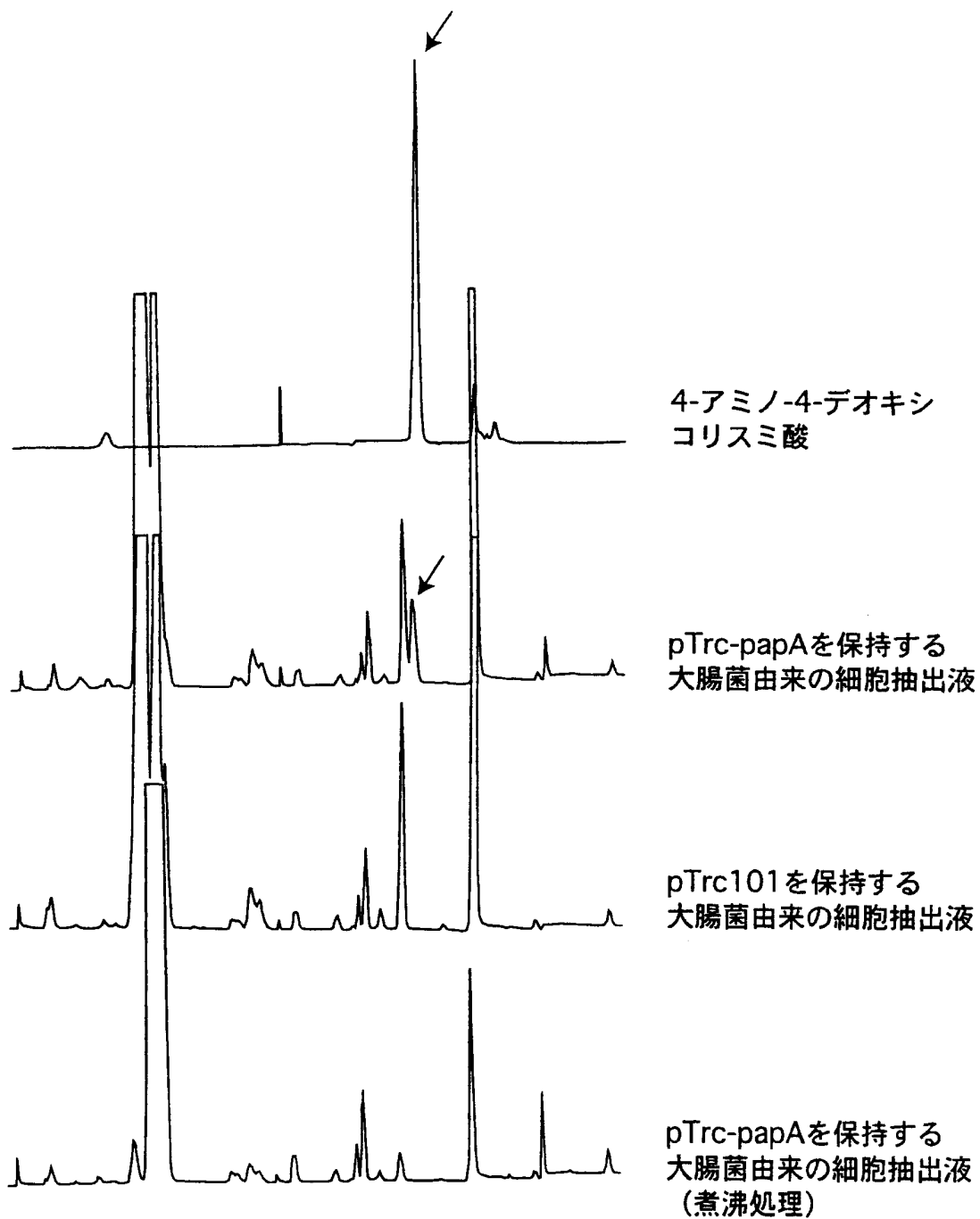


FIG. 3

4 / 12

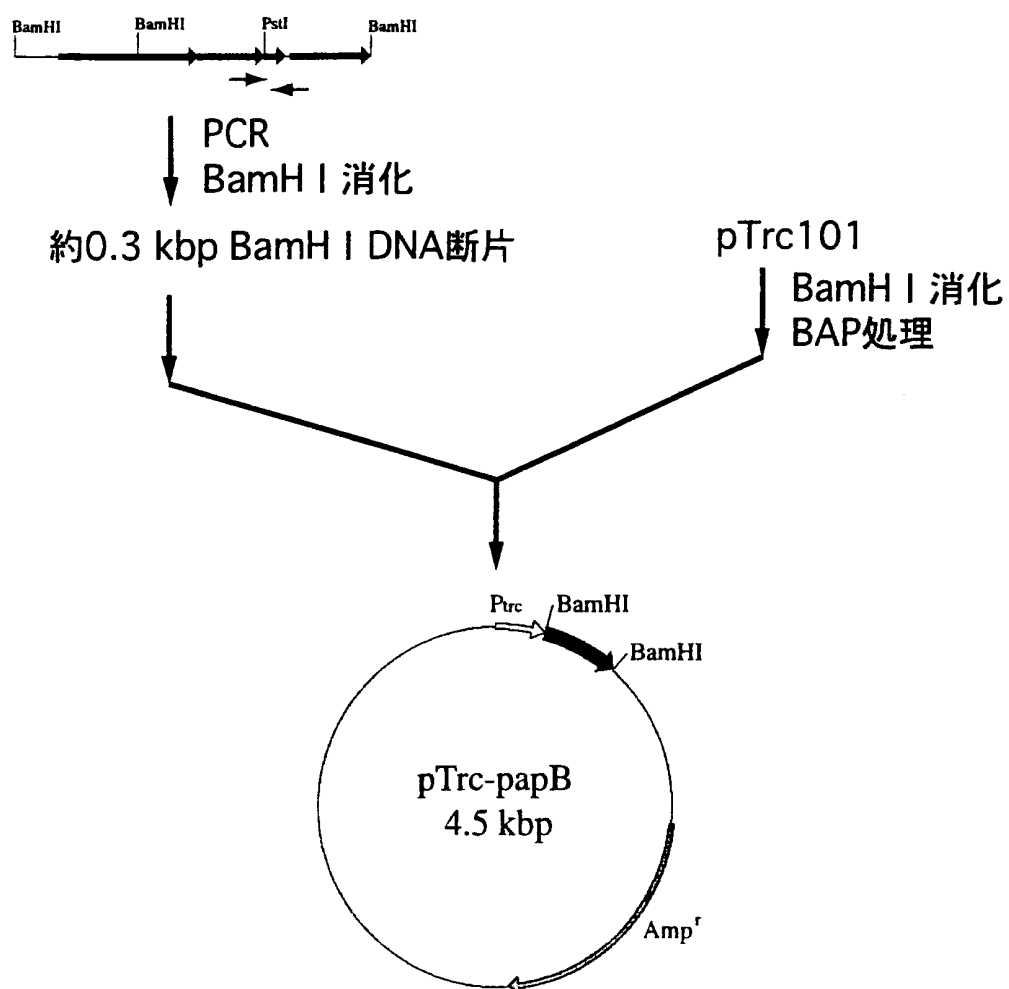


FIG. 4

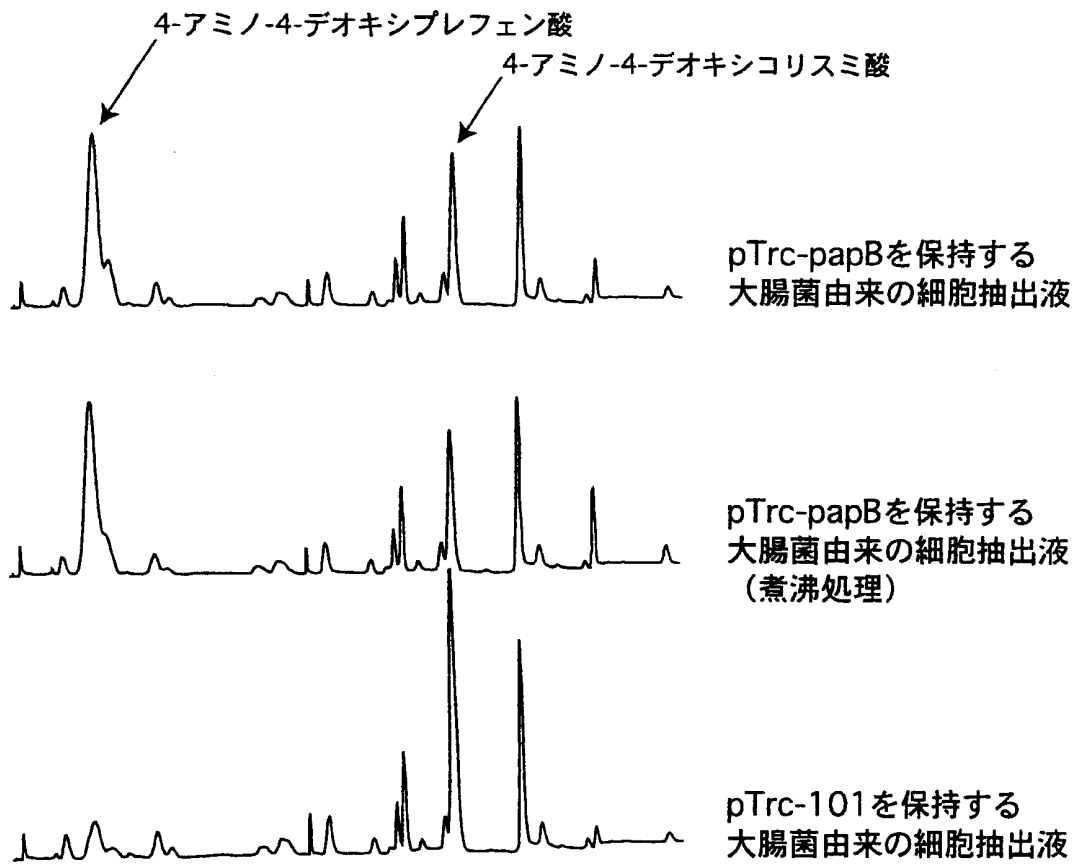


FIG. 5

6 / 12

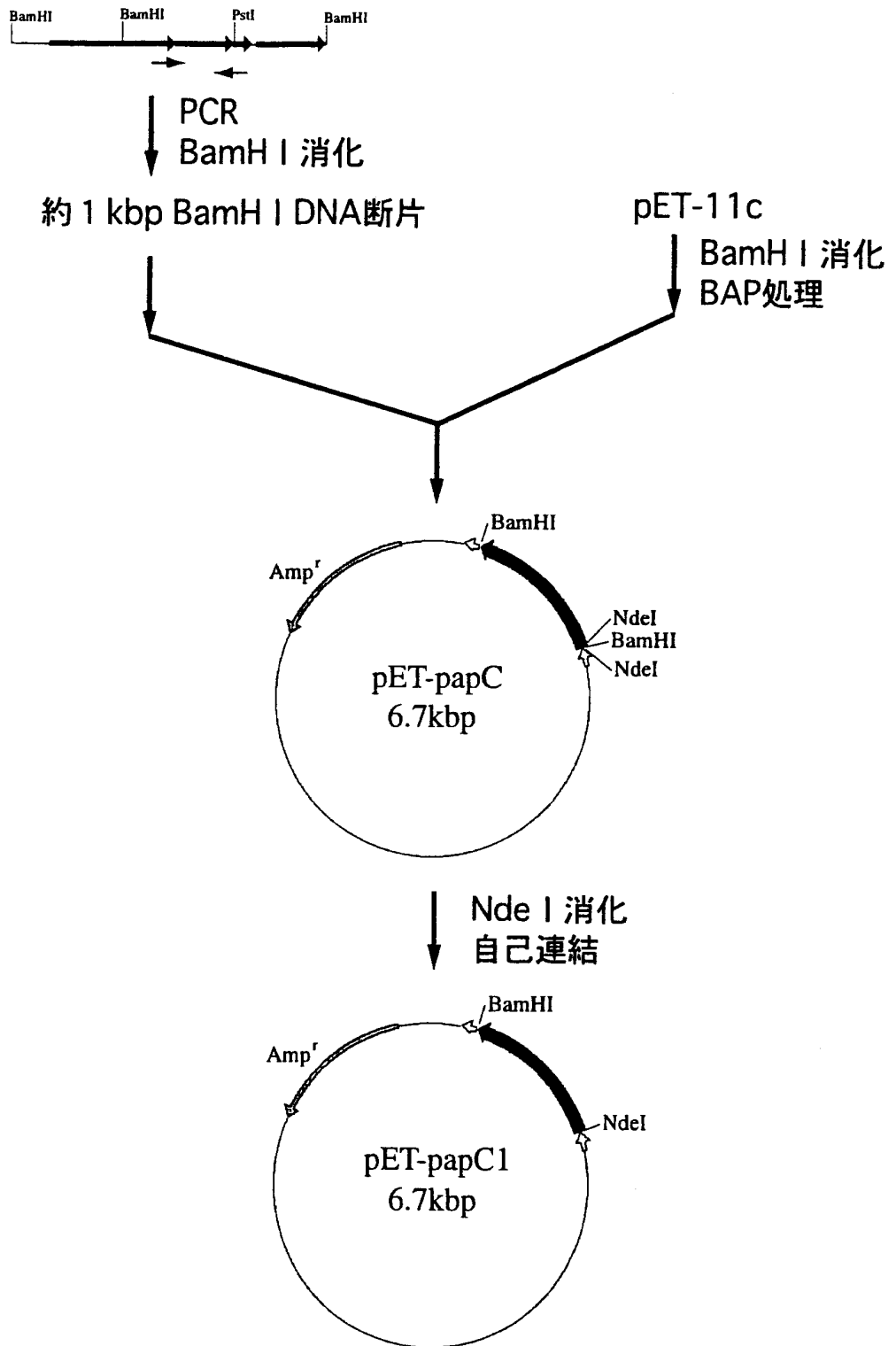


FIG. 6

7/12

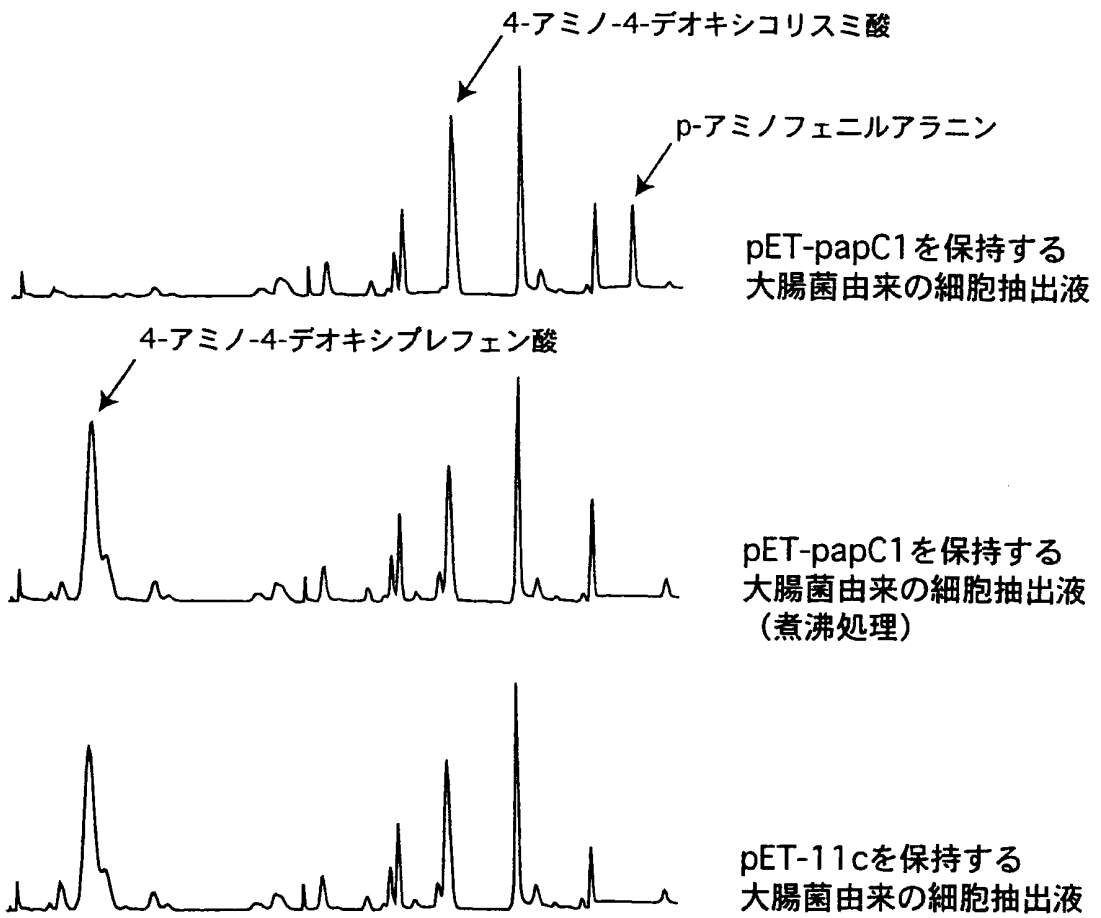


FIG. 7

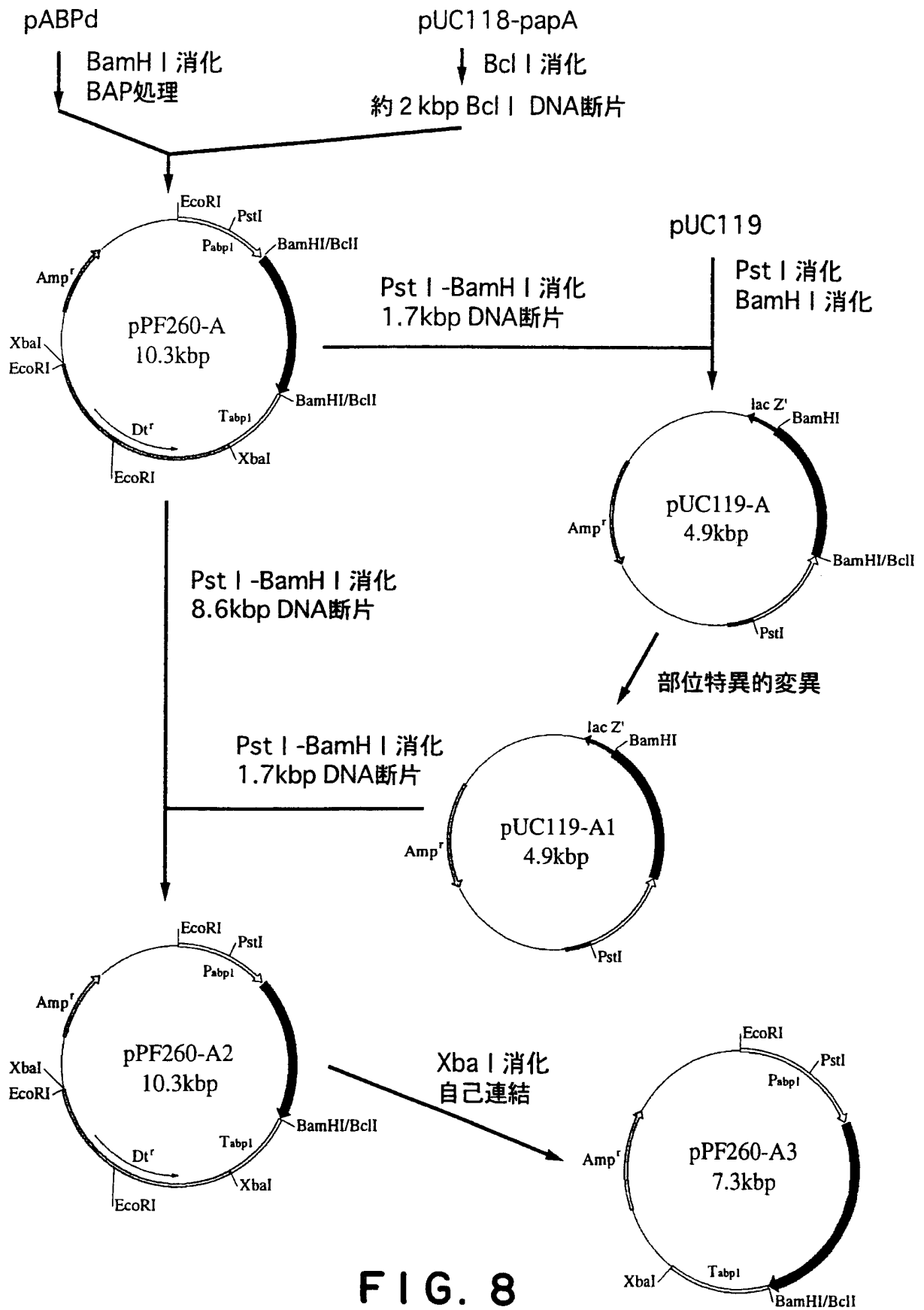


FIG. 8

9/12

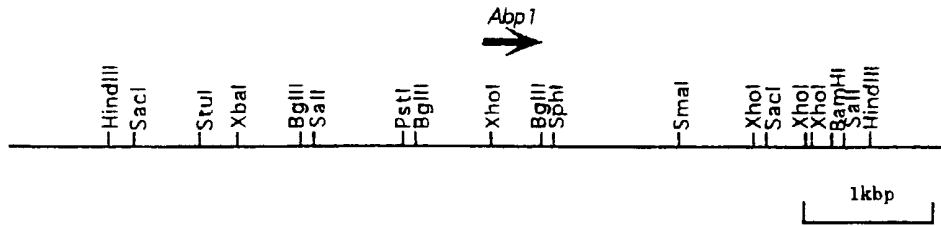


FIG. 9

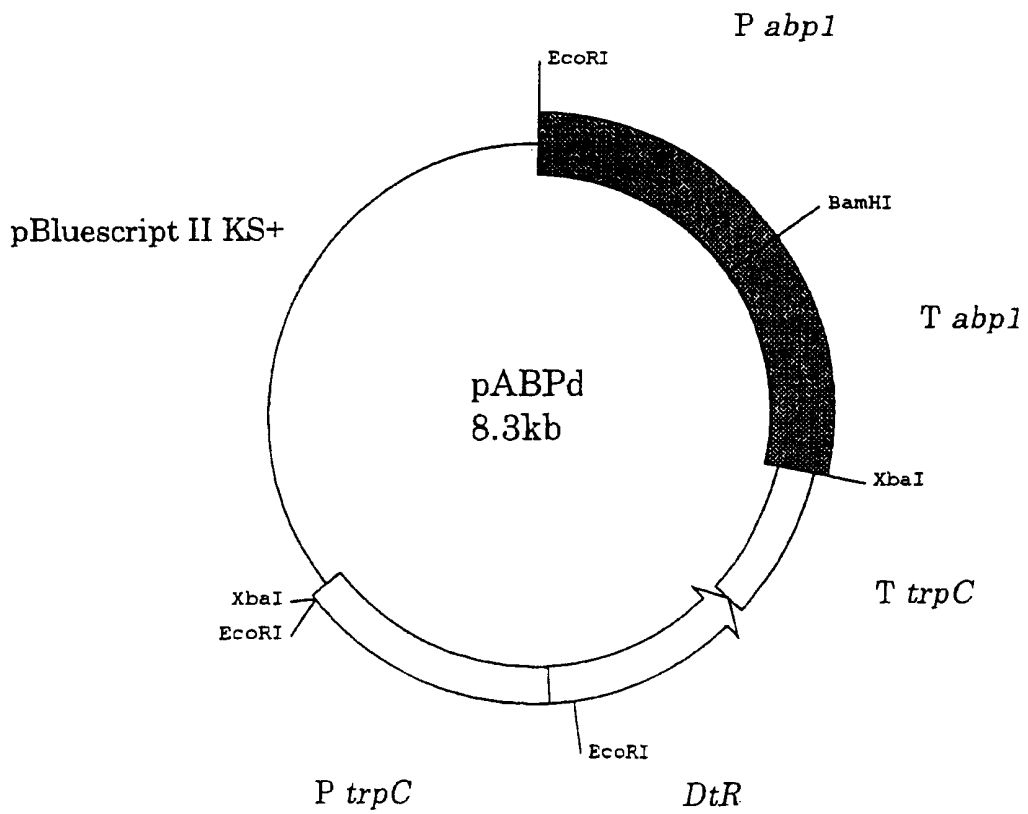


FIG. 10

10/12

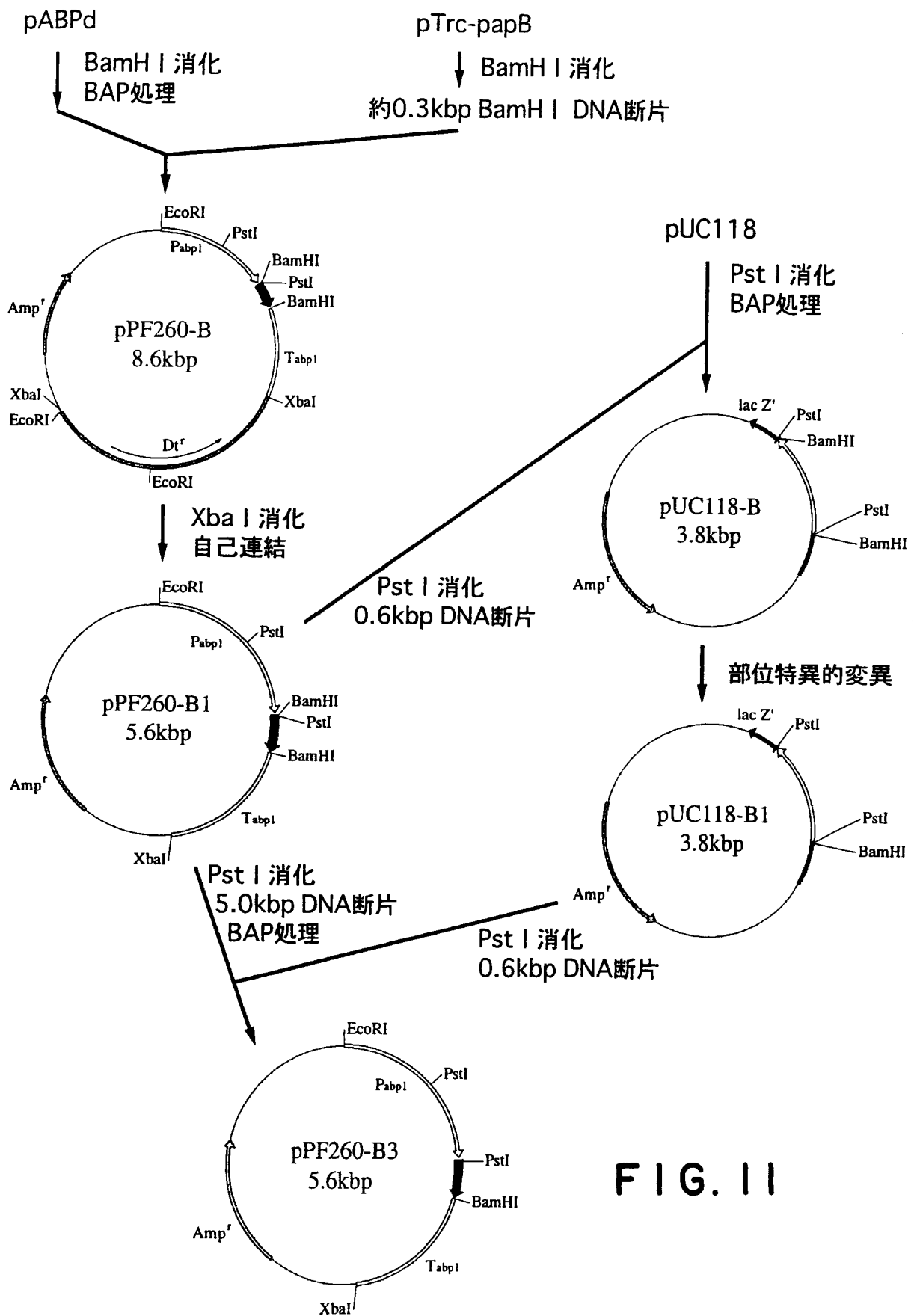


FIG. 11

11 / 12

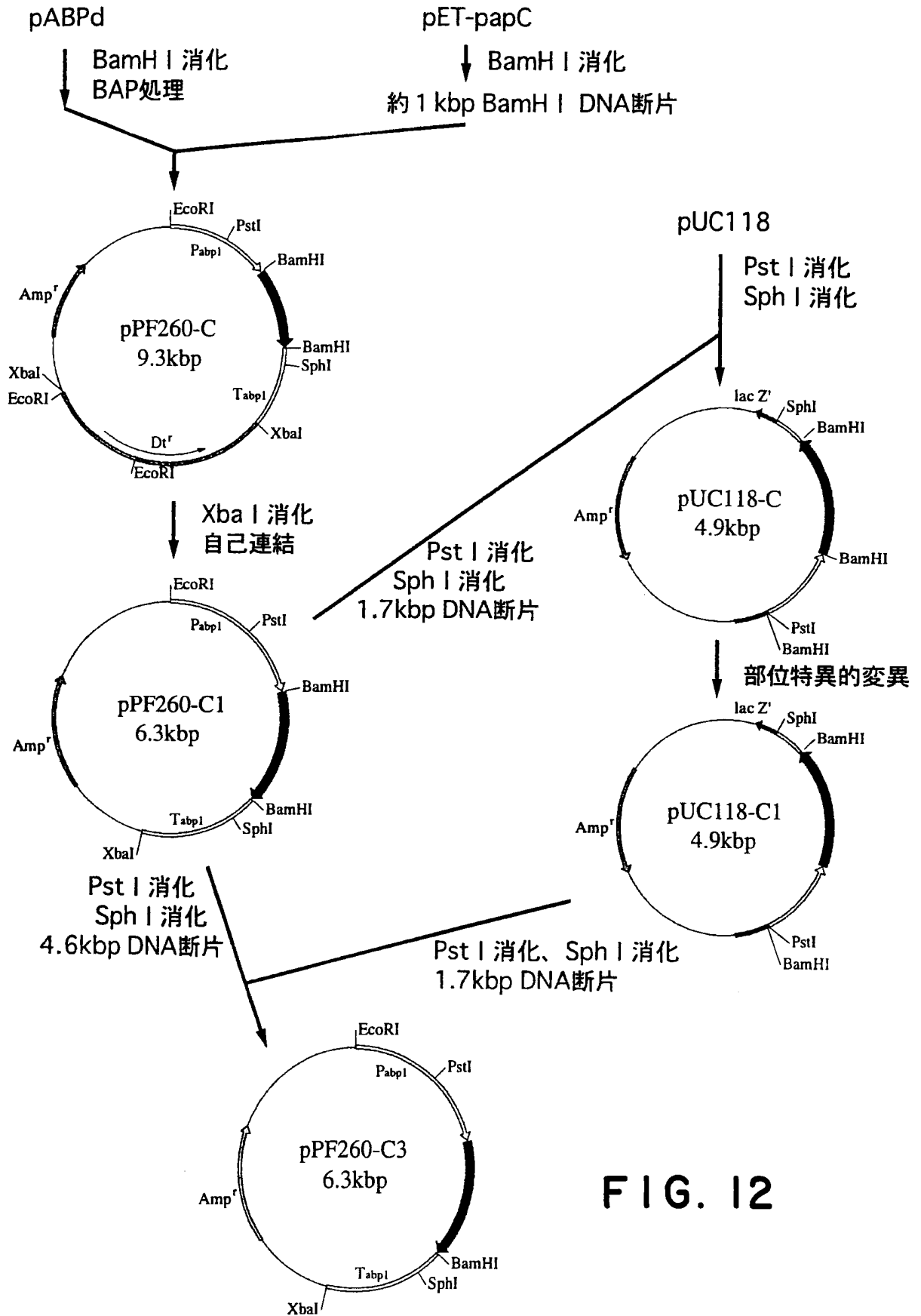
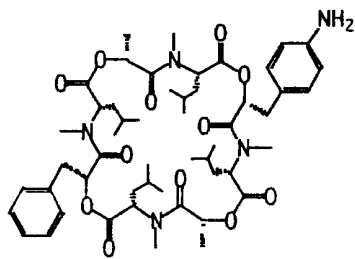
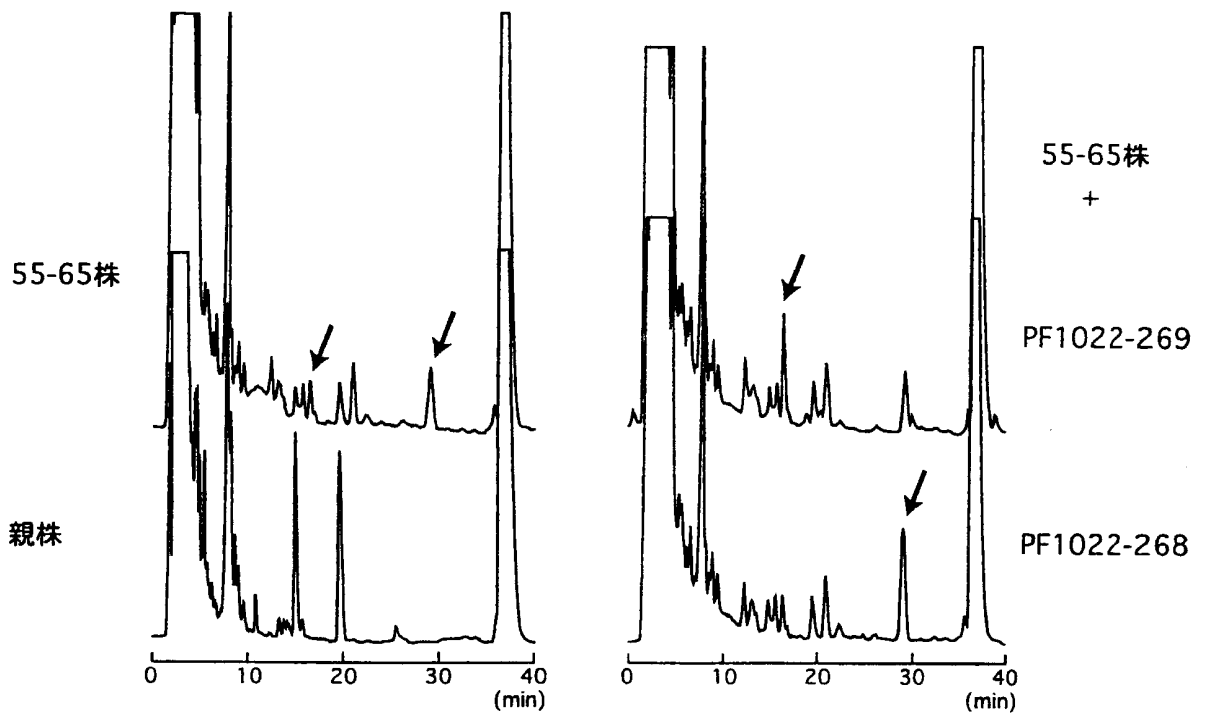
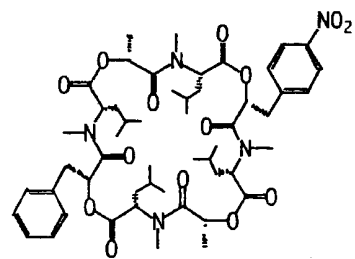


FIG. 12

12 / 12



PF1022-269



PF1022-268

FIG. 13

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Transformants that produce secondary metabolites
modified by a functional group(s) and novel
biosynthesis genes

<130> 127185PX

<140>

<141>

<150> 276314/1999

<151> 1999-09-29

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2061

<212> DNA

<213> Streptomyces venezuelae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2058)

<400> 1

atg cgc acg ctt ctg atc gac aac tac gac tcg ttc acc cac aac ctg 48

Met Arg Thr Leu Leu Ile Asp Asn Tyr Asp Ser Phe Thr His Asn Leu

1 5 10 15

ttc cag tac atc ggc gag gcc acc ggg caa ccc ccc gtc gtc gtg ccc 96

Phe Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Thr Gly Gln Pro Pro Val Val Val Pro

20 25 30

aac gac gcc gac tgg tcg cgg ctg ccc gtc gag gac ttc gac gcg atc 144

Asn Asp Ala Asp Trp Ser Arg Leu Pro Val Glu Asp Phe Asp Ala Ile

35 40 45

gtc gtg tcc ccg ggc ccc ggc agc ccc gac cgg gaa cgg gac ttc gga 192

Val Val Ser Pro Gly Pro Gly Ser Pro Asp Arg Glu Arg Asp Phe Gly

50 55 60

atc agc cgc cgg gcg atc acc gac agc ggc ctg ccc gtc ctc ggc gtc 240

Ile Ser Arg Arg Ala Ile Thr Asp Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Val

65 70 75 80

tgc ctc ggc cac cag ggc atc gcc cag ctc ttc ggc gga acc gtc ggc 288

Cys Leu Gly His Gln Gly Ile Ala Gln Leu Phe Gly Gly Thr Val Gly

85 90 95

ctc gcc ccg gaa ccc atg cac ggc cgg gtc tcc gag gtg cgg cac acc 336

Leu Ala Pro Glu Pro Met His Gly Arg Val Ser Glu Val Arg His Thr

100 105 110

ggc gag gac gtc ttc cgg ggc ctc ccc tcg ccg ttc acc gcc gtg cgc 384
 Gly Glu Asp Val Phe Arg Gly Leu Pro Ser Pro Phe Thr Ala Val Arg
 115 120 125

tac cac tcc ctg gcc gcc acc gac ctc ccc gac gag ctc gaa ccc ctc 432
 Tyr His Ser Leu Ala Ala Thr Asp Leu Pro Asp Glu Leu Glu Pro Leu
 130 135 140

gcc tgg agc gac gac ggg gtc gtc atg ggc ctg ccg cac cgc gag aag 480
 Ala Trp Ser Asp Asp Gly Val Val Met Gly Leu Arg His Arg Glu Lys
 145 150 155 160

ccg ctg tgg ggc gtc cag ttc cac ccg gag tcc atc ggc agc gac ttc 528
 Pro Leu Trp Gly Val Gln Phe His Pro Glu Ser Ile Gly Ser Asp Phe
 165 170 175

ggc cgg gag atc atg gcc aac ttc cgc gac ctc gcc ctc gcc cac cac 576
 Gly Arg Glu Ile Met Ala Asn Phe Arg Asp Leu Ala Leu Ala His His
 180 185 190

cgg gca cgg cgc cac ggg gcc gac tcc ccg tac gaa ctc cac gtg cgc 624
 Arg Ala Arg Arg His Gly Ala Asp Ser Pro Tyr Glu Leu His Val Arg
 195 200 205

cgc gtc gac gtg ctg ccg gac gcc gaa gag gta cgc cgc ggc tgc ctg 672
 Arg Val Asp Val Leu Pro Asp Ala Glu Glu Val Arg Arg Gly Cys Leu
 210 215 220

ccc ggc gag ggc acc acg ttc tgg ctg gac agc agc tcc gtc ctc gaa 720

Pro Gly Glu Gly Thr Thr Phe Trp Leu Asp Ser Ser Ser Val Leu Glu
 225 230 235 240

ggc gcc tcg cgc ttc tcc ttc ctc ggc gac gac cgc ggc ccg ctc gcc 768
 Gly Ala Ser Arg Phe Ser Phe Leu Gly Asp Asp Arg Gly Pro Leu Ala
 245 250 255

gag tac ctc acc tac cgc gtc gcc gac ggc gtc gtc tcc gtc cgc ggc 816
 Glu Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ala Asp Gly Val Val Ser Val Arg Gly
 260 265 270

tcc gac ggc acc acg acc cgg acg cgg cgc ccc ttc ttc aac tac ctg 864
 Ser Asp Gly Thr Thr Thr Arg Thr Arg Arg Pro Phe Phe Asn Tyr Leu
 275 280 285

gag gag cag ctc gaa cgc cga cgg gtc ccc gtc gcc ccc gaa ctg ccc 912
 Glu Glu Gln Leu Glu Arg Arg Arg Val Pro Val Ala Pro Glu Leu Pro
 290 295 300

ttc gag ttc aac ctc ggc tac gtc ggc tac ctc ggc tac gag ctg aag 960
 Phe Glu Phe Asn Leu Gly Tyr Val Gly Tyr Leu Gly Tyr Glu Leu Lys
 305 310 315 320

gcg gag acc acc ggc gac ccc gcg cac cgg tcc ccg cac ccc gac gcc 1008
 Ala Glu Thr Thr Gly Asp Pro Ala His Arg Ser Pro His Pro Asp Ala
 325 330 335

gcg ttc ctc ttc gcc gac cgc gcc atc gcc ctc gac cac cag gaa ggc 1056
 Ala Phe Leu Phe Ala Asp Arg Ala Ile Ala Leu Asp His Gln Glu Gly

340

345

350

tgc tgc tac ctg ctg gcc ctc gac cgc cgg ggc cac gac gac ggc gcc 1104

Cys Cys Tyr Leu Leu Ala Leu Asp Arg Arg Gly His Asp Asp Gly Ala

355

360

365

cgc gcc tgg ctg cgg gag acg gcc gag acc ctc acc ggc ctg gcc gtc 1152

Arg Ala Trp Leu Arg Glu Thr Ala Glu Thr Leu Thr Gly Leu Ala Val

370

375

380

cgc gcc ccg gcc gag ccg acc ccc gcc atg gtc ttc ggg atc ccc gag 1200

Arg Ala Pro Ala Glu Pro Thr Pro Ala Met Val Phe Gly Ile Pro Glu

385

390

395

400

gcg gcg gcc ggc ttc ggc ccc ctg gcc cgc gcg cgc cac gac aag gac 1248

Ala Ala Ala Gly Phe Gly Pro Leu Ala Arg Ala Arg His Asp Lys Asp

405

410

415

gcc tac ctc aag cgc atc gac gag tgc ctc aag gag atc cgc aac ggc 1296

Ala Tyr Leu Lys Arg Ile Asp Glu Cys Leu Lys Glu Ile Arg Asn Gly

420

425

430

gag tcg tac gag atc tgc ctg acc aac atg gtc acc gcg ccg acc gag 1344

Glu Ser Tyr Glu Ile Cys Leu Thr Asn Met Val Thr Ala Pro Thr Glu

435

440

445

gcg acg gcc ctg ccg ctc tac tcc gcg ctg cgc gcc atc agc ccc gtc 1392

Ala Thr Ala Leu Pro Leu Tyr Ser Ala Leu Arg Ala Ile Ser Pro Val

450

455

460

ccg tac ggc gcc ctg ctc gag ttc ccc gaa ctg tcg gtg ctg agc gcc 1440
 Pro Tyr Gly Ala Leu Leu Glu Phe Pro Glu Leu Ser Val Leu Ser Ala
 465 470 475 480

tcg ccc gag cgg ttc ctc acg atc ggc gcc gac ggc ggc gtc gag tcc 1488
 Ser Pro Glu Arg Phe Leu Thr Ile Gly Ala Asp Gly Gly Val Glu Ser
 485 490 495

aag ccc atc aag ggg acc cgc ccc cgg ggc ggc acc gcg gag gag gac 1536
 Lys Pro Ile Lys Gly Thr Arg Pro Arg Gly Gly Thr Ala Glu Glu Asp
 500 505 510

gag cgg ctc cgc gcc gac ctg gcc ggc cgg gag aag gac cgg gcc gag 1584
 Glu Arg Leu Arg Ala Asp Leu Ala Gly Arg Glu Lys Asp Arg Ala Glu
 515 520 525

aac ctg atg atc gtc gac ctg gtc cgc aac gac ctc aac agc gtc tgc 1632
 Asn Leu Met Ile Val Asp Leu Val Arg Asn Asp Leu Asn Ser Val Cys
 530 535 540

gcg atc ggc tcc gtc cac gtg ccc cgg ctc ttc gag gtg gag acc tac 1680
 Ala Ile Gly Ser Val His Val Pro Arg Leu Phe Glu Val Glu Thr Tyr
 545 550 555 560

gcg ccc gtg cac cag ctg gtg tcg acc atc cgg gga cgg ctg cgg ccc 1728
 Ala Pro Val His Gln Leu Val Ser Thr Ile Arg Gly Arg Leu Arg Pro
 565 570 575

ggc acc agc acc gcc gcc igc gta cgc gcc gcc ttc ccc ggc ggc tcc 1776
 Gly Thr Ser Thr Ala Ala Cys Val Arg Ala Ala Phe Pro Gly Gly Ser
 580 585 590

atg acc ggc gcg ccc aag aag cgc acc atg gag atc atc gac cgc ctg 1824
 Met Thr Gly Ala Pro Lys Lys Arg Thr Met Glu Ile Ile Asp Arg Leu
 595 600 605

gag gaa ggc ccc cgg ggc gtc tac tcc ggg gcg ctc gga tgg ttc gcc 1872
 Glu Glu Gly Pro Arg Gly Val Tyr Ser Gly Ala Leu Gly Trp Phe Ala
 610 615 620

ctc agc ggc gcc gcc gac ctc agc atc gtc atc cgc acc atc gtg ctg 1920
 Leu Ser Gly Ala Ala Asp Leu Ser Ile Val Ile Arg Thr Ile Val Leu
 625 630 635 640

gcc gac ggc cag gcg gag ttc ggc gtc ggc ggg gcg atc gtg tcc ctc 1968
 Ala Asp Gly Gln Ala Glu Phe Gly Val Gly Gly Ala Ile Val Ser Leu
 645 650 655

tcc gac cag gag gag gag ttc acc gag acc gtg gta aag gcc cgc gcc 2016
 Ser Asp Gln Glu Glu Glu Phe Thr Glu Thr Val Val Lys Ala Arg Ala
 660 665 670

atg gtc acc gcc ctc gac ggc agc gcc gtg gcg ggc gcc cga tga 2061
 Met Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Ala Val Ala Gly Ala Arg
 675 680 685

<210> 2

<211> 686

<212> PRT

<213> Streptomyces venezuelae

<400> 2

Met Arg Thr Leu Leu Ile Asp Asn Tyr Asp Ser Phe Thr His Asn Leu

1

5

10

15

Phe Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Thr Gly Gln Pro Pro Val Val Val Pro

20

25

30

Asn Asp Ala Asp Trp Ser Arg Leu Pro Val Glu Asp Phe Asp Ala Ile

35

40

45

Val Val Ser Pro Gly Pro Gly Ser Pro Asp Arg Glu Arg Asp Phe Gly

50

55

60

Ile Ser Arg Arg Ala Ile Thr Asp Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Val

65

70

75

80

Cys Leu Gly His Gln Gly Ile Ala Gln Leu Phe Gly Gly Thr Val Gly

85

90

95

Leu Ala Pro Glu Pro Met His Gly Arg Val Ser Glu Val Arg His Thr

100

105

110

Gly Glu Asp Val Phe Arg Gly Leu Pro Ser Pro Phe Thr Ala Val Arg

115

120

125

Tyr His Ser Leu Ala Ala Thr Asp Leu Pro Asp Glu Leu Glu Pro Leu
130 135 140

Ala Trp Ser Asp Asp Gly Val Val Met Gly Leu Arg His Arg Glu Lys
145 150 155 160

Pro Leu Trp Gly Val Gln Phe His Pro Glu Ser Ile Gly Ser Asp Phe
165 170 175

Gly Arg Glu Ile Met Ala Asn Phe Arg Asp Leu Ala Leu Ala His His
180 185 190

Arg Ala Arg Arg His Gly Ala Asp Ser Pro Tyr Glu Leu His Val Arg
195 200 205

Arg Val Asp Val Leu Pro Asp Ala Glu Glu Val Arg Arg Gly Cys Leu
210 215 220

Pro Gly Glu Gly Thr Thr Phe Trp Leu Asp Ser Ser Ser Val Leu Glu
225 230 235 240

Gly Ala Ser Arg Phe Ser Phe Leu Gly Asp Asp Arg Gly Pro Leu Ala
245 250 255

Glu Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ala Asp Gly Val Val Ser Val Arg Gly
260 265 270

Ser Asp Gly Thr Thr Thr Arg Thr Arg Arg Pro Phe Phe Asn Tyr Leu

275

280

285

Glu Glu Gln Leu Glu Arg Arg Arg Val Pro Val Ala Pro Glu Leu Pro

290

295

300

Phe Glu Phe Asn Leu Gly Tyr Val Gly Tyr Leu Gly Tyr Glu Leu Lys

305

310

315

320

Ala Glu Thr Thr Gly Asp Pro Ala His Arg Ser Pro His Pro Asp Ala

325

330

335

Ala Phe Leu Phe Ala Asp Arg Ala Ile Ala Leu Asp His Gln Glu Gly

340

345

350

Cys Cys Tyr Leu Leu Ala Leu Asp Arg Arg Gly His Asp Asp Gly Ala

355

360

365

Arg Ala Trp Leu Arg Glu Thr Ala Glu Thr Leu Thr Gly Leu Ala Val

370

375

380

Arg Ala Pro Ala Glu Pro Thr Pro Ala Met Val Phe Gly Ile Pro Glu

385

390

395

400

Ala Ala Ala Gly Phe Gly Pro Leu Ala Arg Ala Arg His Asp Lys Asp

405

410

415

Ala Tyr Leu Lys Arg Ile Asp Glu Cys Leu Lys Glu Ile Arg Asn Gly

420

425

430

Glu Ser Tyr Glu Ile Cys Leu Thr Asn Met Val Thr Ala Pro Thr Glu
435 440 445

Ala Thr Ala Leu Pro Leu Tyr Ser Ala Leu Arg Ala Ile Ser Pro Val
450 455 460

Pro Tyr Gly Ala Leu Leu Glu Phe Pro Glu Leu Ser Val Leu Ser Ala
465 470 475 480

Ser Pro Glu Arg Phe Leu Thr Ile Gly Ala Asp Gly Gly Val Glu Ser
485 490 495

Lys Pro Ile Lys Gly Thr Arg Pro Arg Gly Gly Thr Ala Glu Glu Asp
500 505 510

Glu Arg Leu Arg Ala Asp Leu Ala Gly Arg Glu Lys Asp Arg Ala Glu
515 520 525

Asn Leu Met Ile Val Asp Leu Val Arg Asn Asp Leu Asn Ser Val Cys
530 535 540

Ala Ile Gly Ser Val His Val Pro Arg Leu Phe Glu Val Glu Thr Tyr
545 550 555 560

Ala Pro Val His Gln Leu Val Ser Thr Ile Arg Gly Arg Leu Arg Pro
565 570 575

Gly Thr Ser Thr Ala Ala Cys Val Arg Ala Ala Phe Pro Gly Gly Ser
580 585 590

Met Thr Gly Ala Pro Lys Lys Arg Thr Met Glu Ile Ile Asp Arg Leu
595 600 605

Glu Glu Gly Pro Arg Gly Val Tyr Ser Gly Ala Leu Gly Trp Phe Ala
610 615 620

Leu Ser Gly Ala Ala Asp Leu Ser Ile Val Ile Arg Thr Ile Val Leu
625 630 635 640

Ala Asp Gly Gln Ala Glu Phe Gly Val Gly Gly Ala Ile Val Ser Leu
645 650 655

Ser Asp Gln Glu Glu Glu Phe Thr Glu Thr Val Val Lys Ala Arg Ala
660 665 670

Met Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Ala Val Ala Gly Ala Arg
675 680 685

<210> 3

<211> 312

<212> DNA

<213> Streptomyces venezuelae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (309)

<400> 3

atg acc gag cag aac gag ctg cag cgg ctg cgc gcg gag ctc gac gcc 48

Met Thr Glu Gln Asn Glu Leu Gln Arg Leu Arg Ala Glu Leu Asp Ala

1

5

10

15

ctc gac ggg acg ctc ctg gac acg gtg cgg cgc cgc atc gac ctc ggt 96

Leu Asp Gly Thr Leu Leu Asp Thr Val Arg Arg Arg Ile Asp Leu Gly

20

25

30

gtc cgc atc gcg cgg tac aag tcc cgg cac ggc gtc ccg atg atg cag 144

Val Arg Ile Ala Arg Tyr Lys Ser Arg His Gly Val Pro Met Met Gln

35

40

45

ccc ggc cgg gtc agc ctg gtc aag gac agg gcc gcc cgc tac gcc gcc 192

Pro Gly Arg Val Ser Leu Val Lys Asp Arg Ala Ala Arg Tyr Ala Ala

50

55

60

gac cac ggc ctc gac gaa tgc ttc ctg gtg aac ctc tac gac gtg atc 240

Asp His Gly Leu Asp Glu Ser Phe Leu Val Asn Leu Tyr Asp Val Ile

65

70

75

80

atc acg gag atg tgc cgc gtc gag gac ctg gtg atg agc cgg gag agc 288

Ile Thr Glu Met Cys Arg Val Glu Asp Leu Val Met Ser Arg Glu Ser

85

90

95

ctg acg gcc gag gac cgg cgg tga 312

Leu Thr Ala Glu Asp Arg Arg

100

<210> 4

<211> 103

<212> PRT

<213> Streptomyces venezuelae

<400> 4

Met Thr Glu Gln Asn Glu Leu Gln Arg Leu Arg Ala Glu Leu Asp Ala

1 5 10 15

Leu Asp Gly Thr Leu Leu Asp Thr Val Arg Arg Arg Ile Asp Leu Gly

20 25 30

Val Arg Ile Ala Arg Tyr Lys Ser Arg His Gly Val Pro Met Met Gln

35 40 45

Pro Gly Arg Val Ser Leu Val Lys Asp Arg Ala Ala Arg Tyr Ala Ala

50 55 60

Asp His Gly Leu Asp Glu Ser Phe Leu Val Asn Leu Tyr Asp Val Ile

65 70 75 80

Ile Thr Glu Met Cys Arg Val Glu Asp Leu Val Met Ser Arg Glu Ser

85 90 95

Leu Thr Ala Glu Asp Arg Arg

100

<210> 5

<211> 969

<212> DNA

<213> Streptomyces venezuelae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (966)

<400> 5

atg agc ggc ttc ccc cgc agc gtc gtc gtc ggc ggc agc ggg gcg gtg 48

Met Ser Gly Phe Pro Arg Ser Val Val Val Gly Gly Ser Gly Ala Val

1 5 10 15

ggc ggc atg ttc gcc ggg ctg ctg cgg gag gcg ggc agc cgc acg ctc 96

Gly Gly Met Phe Ala Gly Leu Leu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Thr Leu

20 25 30

gtc gtc gac ctc gta ccg ccg ccg gga cgg ccg gac gcc tgc ctg gtc 144

Val Val Asp Leu Val Pro Pro Pro Gly Arg Pro Asp Ala Cys Leu Val

35 40 45

ggc gac gtc acc gcg ccg ggg ccc gaa ctc gcg gcc gcc ctc cgg gac 192

Gly Asp Val Thr Ala Pro Gly Pro Glu Leu Ala Ala Ala Leu Arg Asp

50 55 60

gcg gac ctc gtc ctg ctc gcc gta cac gag gac gtg gcc ctc aag gcc 240

Ala Asp Leu Val Leu Leu Ala Val His Glu Asp Val Ala Leu Lys Ala
 65 70 75 80

 gtg gcg ccc gtg acc cgg ctc atg cgg ccg ggc gcg ctg ctc gcc gac 288
 Val Ala Pro Val Thr Arg Leu Met Arg Pro Gly Ala Leu Leu Ala Asp
 85 90 95

 acc ctg tcc gtc cgg acg ggc atg gcc gcg gag ctc gcg gcc cac gcc 336
 Thr Leu Ser Val Arg Thr Gly Met Ala Ala Glu Leu Ala Ala His Ala
 100 105 110

 ccc ggc gtc cag cac gtg ggc ctc aac ccg atg ttc gcc ccc gcc gcc 384
 Pro Gly Val Gln His Val Gly Leu Asn Pro Met Phe Ala Pro Ala Ala
 115 120 125

 ggc atg acc ggc cga ccc gtg gcc gcc gtg gtc acc agg gac ggg ccg 432
 Gly Met Thr Gly Arg Pro Val Ala Ala Val Val Thr Arg Asp Gly Pro
 130 135 140

 ggc gtc acg gcc ctg ctg cgg ctc gtc gag ggc ggc ggc ggc agg ccc 480
 Gly Val Thr Ala Leu Leu Arg Leu Val Glu Gly Gly Gly Gly Arg Pro
 145 150 155 160

 gta cgg ctc acg gcg gag gag cac gac cgg acg acg gcg gcc acc cag 528
 Val Arg Leu Thr Ala Glu Glu His Asp Arg Thr Thr Ala Ala Thr Gln
 165 170 175

 gcc ctg acg cac gcc gtg ctc ctc tcc ttc ggg ctc gcc ctc gcc cgc 576
 Ala Leu Thr His Ala Val Leu Leu Ser Phe Gly Leu Ala Leu Ala Arg

180	185	190	
ctc ggc gtc gac gtc cgg gcc ctg gcg gcg acg gca ccg ccg ccc cac 624			
Leu Gly Val Asp Val Arg Ala Leu Ala Ala Thr Ala Pro Pro Pro His			
195	200	205	
cag gtg ctg ctc gcc ctc ctg gcc cgt gtg ctc ggc ggc agc ccc gag 672			
Gln Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Arg Val Leu Gly Gly Ser Pro Glu			
210	215	220	
gtg tac ggg gac atc cag cgg tcc aac ccc cgg gcg gcg tcc gcg cgc 720			
Val Tyr Gly Asp Ile Gln Arg Ser Asn Pro Arg Ala Ala Ser Ala Arg			
225	230	235	240
cgg gcg ctc gcc gag gcc ctg cgc tcc ttc gcc gcg ctg gtc ggc gac 768			
Arg Ala Leu Ala Glu Ala Leu Arg Ser Phe Ala Ala Leu Val Gly Asp			
245	250	255	
gac ccg gac cgt gcc gac gcc ccc ggg cgc gcc gac gcc ccc ggc cat 816			
Asp Pro Asp Arg Ala Asp Ala Pro Gly Arg Ala Asp Ala Pro Gly His			
260	265	270	
ccc ggg gga tgc gac ggc gcc ggg aac ctc gac ggc gtc ttc ggg gaa 864			
Pro Gly Gly Cys Asp Gly Ala Gly Asn Leu Asp Gly Val Phe Gly Glu			
275	280	285	
ctc cgc cgg ctc atg gga ccg gag ctc gcg gcg ggc cag gac cac tgc 912			
Leu Arg Arg Leu Met Gly Pro Glu Leu Ala Ala Gly Gln Asp His Cys			
290	295	300	

cag gag ctg ttc cgc acc ctc cac cgc acc gac gac gaa ggc gag aag 960
 Gln Glu Leu Phe Arg Thr Leu His Arg Thr Asp Asp Glu Gly Glu Lys
 305 310 315 320

gac cga tga 969
 Asp Arg

<210> 6

<211> 322

<212> PRT

<213> Streptomyces venezuelae

<400> 6

Met Ser Gly Phe Pro Arg Ser Val Val Val Gly Gly Ser Gly Ala Val
 1 5 10 15

Gly Gly Met Phe Ala Gly Leu Leu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Thr Leu
 20 25 30

Val Val Asp Leu Val Pro Pro Pro Gly Arg Pro Asp Ala Cys Leu Val
 35 40 45

Gly Asp Val Thr Ala Pro Gly Pro Glu Leu Ala Ala Ala Leu Arg Asp
 50 55 60

Ala Asp Leu Val Leu Leu Ala Val His Glu Asp Val Ala Leu Lys Ala
 65 70 75 80

21/28

the pabAB gene

<400> 7

gggggatcc tatgcgcacg cttctgatcg ac

32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the pabAB gene

<400> 8

gggggatcc tcacgggcg cccgccactg cg

32

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the papA gene

<400> 9

ggatgatcata tgcgcacgct tctgatcgac

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the papA gene

<400> 10

ggatgatcatc atcgggcgcc cgccactgcg

30

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the papB gene

<400> 11

gcggaiccat atgaccgagc agaacgagct g

31

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the papB gene

<400> 12

gcggatcctc accgceggtc ctcgge

26

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the papC gene

<400> 13

gcggatccat atgagcggct tccccgca

29

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the papC gene

<400> 14

gcggatcctc atcggtcctt ctgccttc

29

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the Abp1 gene

<400> 15

ctcaaaccag gaactctttc t

21

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25/28

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the Abp1 gene

<400> 16

rgacatgtgg aaaccacatt ttg

23

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the Abp1 gene

<400> 17

abncggggaa ttcgtgggtg gtgatatcat ggcv

34

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the Abp1 gene

<400> 18

abnbamgggg gatccttgat gggttttggg w

31

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the Abp1 gene

<400> 19

abcbamgggg gatcctaaac tcccatctat agc

33

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the Abp1 gene

<400> 20

abcbaggggc tagacgactc attgcagtga gtgg

34

<210> 21

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
site-directed mutagenesis

<400> 21

gatcagaagc gtgcgcattg ttaggttgat tgatgggttt tgggaattg

49

<210> 22

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
site-directed mutagenesis

<400> 22

ctcgttctgc tcggtcattg ttaggttgat tgatgggttt tgggaattg

49

<210> 23

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
site-directed mutagenesis

<400> 23

cgggggaagc cgctcattgt taggttgatt gatgggtttt gggaattg

48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06783

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C07K11/00// (C12P21/02, C12R1:645)												
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.Cl ⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C07K11/00												
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) MEDLINE (STN) , Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	Veronique Blanc et al.,	1-5, 8, 9, 18										
Y	"Identification and analysis of genes from Streptomyces pristinaespiralis encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I" Molecular Microbiology, 23 (2), 191-202, (1997)	6, 7, 10-17, 19-31										
Y	WO, 97/20945, A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT), 12 June, 1997 (12.06.97) & DE, 19545639, A & EP, 865498, A & CN, 1208439, A & NZ, 322929, A & BR, 9611928, A & AU, 705762, B	6, 7, 19-25										
Y	J. DOULL et al., "Isolation and Characterization of Streptomyces venezuelae Mutants Blocked in Chloramphenicol Biosynthesis", J. Gen. Microbiol., 131, 97-104, (1985)	10-17, 26-31										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 18 December, 2000 (18.12.00)		Date of mailing of the international search report 26 December, 2000 (26.12.00)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C07K11/00// (C12P21/02, C12R1:645)

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. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C07K11/00

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

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 MEDLINE (STN)、Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq、BIOSIS (DIALOG)

C. 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
X Y	Veronique Blanc et al., "Identification and analysis of genes from Streptomyces pristinaespiralis encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I" Molecular Microbiology, 23(2), 191-202, (1997)	1~5, 8, 9, 18 6, 7, 10~17, 19~31
Y	WO, 97/20945, A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 12. 6月. 1997 (12. 06. 97) &DE, 19545639, A &EP, 865498, A &CN, 1208439, A &NZ, 322929, A &BR, 9611928, A &AU, 705762, B	6, 7, 19~25

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。

* 引用文献のカテゴリー
 「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」 国際出願日前の出願または特許であるが、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 18. 12. 00

国際調査報告の発送日 26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 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)
 甲斐 順子 印
 4 N 9 6 4 1
 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y	J. DOULL et al., "Isolation and Characterization of Streptomyces venezuelae Mutants Blocked in Chloramphenicol Biosynthesis" J. Gen. Microbiol., 131, 97-104, (1985)	10~17, 26~ 31