

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4251554号  
(P4251554)

(45) 発行日 平成21年4月8日(2009.4.8)

(24) 登録日 平成21年1月30日(2009.1.30)

(51) Int. Cl.		F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/00</b> <b>Z N A A</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/22</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 P</b>	<b>7/22</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/42</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 P</b>	<b>7/42</b>

請求項の数 12 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2003-584320 (P2003-584320)	(73) 特許権者	000001915 メルシャン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
(86) (22) 出願日	平成15年4月11日(2003.4.11)	(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/004609	(74) 代理人	100094293 弁理士 藤井 幸喜
(87) 国際公開番号	W02003/087381	(72) 発明者	有澤 章 静岡県磐田市中泉1797ひかりハイツ3 13
(87) 国際公開日	平成15年10月23日(2003.10.23)	(72) 発明者	久米田 綾子 東京都品川区東大井1-3-19-201
審査請求日	平成17年12月8日(2005.12.8)	審査官	齋藤 真由美
(31) 優先権主張番号	特願2002-110311 (P2002-110311)		
(32) 優先日	平成14年4月12日(2002.4.12)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸菌における放線菌由来チトクロームP-450遺伝子の発現系

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

放線菌 (actinomycete) 由来チトクロームP-450遺伝子を発現する大腸菌 (Escherichia coli) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクロームP-450遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換えDNA分子を担持し、かつ、該フェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子がシュードモナス プチダ (Pseudomonas putida) 由来のプチダレドキシン遺伝子 (camB) およびプチダレドキシン還元酵素遺伝子 (camA) である、ことを特徴とする上記大腸菌。

## 【請求項2】

請求項1に記載の大腸菌であって、放線菌由来のチトクロームP-450遺伝子と同一の遺伝子クラスターに由来するフェレドキシン遺伝子をさらに含んでなる、上記大腸菌。

## 【請求項3】

放線菌 (actinomycete) 由来チトクロームP-450遺伝子を発現する大腸菌 (Escherichia coli) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクロームP-450遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換えDNA分子を担持し、かつ、放線菌由来チトクロームP-450遺伝子およびフェレドキシン遺伝子がマイクロテトラスポーラ レクチカテナ (Microtetraspora recticatenata) 由来のコンパクチン水酸化酵素遺伝子 (moxA) および該moxAの下流に隣接して存在するフェレドキシン遺伝子 (m

10

20

o x B) である、ことを特徴とする上記大腸菌。

【請求項 4】

放線菌 (actinomyce te) 由来チトクローム P - 4 5 0 遺伝子を発現する大腸菌 (Escherichia coli) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、放線菌由来のチトクローム P - 4 5 0 遺伝子およびフェレドキシン遺伝子がマイクロテトラスポーラ レクチカテナ (Microtetraspora recticaten a) 由来のコンパクチン水酸化酵素遺伝子 (mox A) および mox A の下流に隣接して存在するフェレドキシン遺伝子 (mox B) であり、フェレドキシン還元酵素遺伝子がストレプトミセス セリカラー (Streptomyces coelicolor) 由来のフェレドキシン還元酵素遺伝子 fdr - 1 または fdr - 2 である、ことを特徴とする上記大腸菌。

10

【請求項 5】

放線菌 (actinomyce te) 由来チトクローム P - 4 5 0 遺伝子を発現する大腸菌 (Escherichia coli) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、放線菌由来のチトクローム P - 4 5 0 遺伝子およびフェレドキシン遺伝子がマイクロテトラスポーラ レクチカテナ (Microtetraspora recticaten a) 由来のコンパクチン水酸化酵素遺伝子 (mox A) および mox A の下流に隣接して存在するフェレドキシン遺伝子 (mox B) であり、さらなるフェレドキシン遺伝子としてシュードモナス プチダ (Pseudomonas putida) 由来のプチダレドキシン遺伝子 (cam B) を含み、かつ、フェレドキシン還元酵素遺伝子がシュードモナス プチダ (Pseudomonas putida) 由来のプチダレドキシン還元酵素遺伝子 (cam A) である、ことを特徴とする上記大腸菌。

20

【請求項 6】

チトクローム P - 4 5 0 遺伝子の発現の誘導が 2 0 ~ 2 4 で都合よく行うことができる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の大腸菌。

【請求項 7】

放線菌 (actinomyce te) 由来チトクローム P - 4 5 0 遺伝子を発現する大腸菌 (Escherichia coli) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子が、配列番号 1 における塩基 3 1 3 ~ 塩基 1 5 3 3 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 8 0 % の配列同一性を有し、かつ該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、および配列番号 2 における塩基 5 4 4 ~ 塩基 1 7 5 8 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 8 0 % の配列同一性を有し、かつ該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチドからなる群より選ばれるポリヌクレオチドを含んでなる、ことを特徴とする上記大腸菌。

30

40

【請求項 8】

放線菌 (actinomyce te) 由来チトクローム P - 4 5 0 遺伝子を発現する大腸菌 (Escherichia coli) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 4 5 0 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、該フェレドキシン遺伝子が、配列番号 1 における塩基 1 5 4 7 ~ 塩基 1 7 4 1 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 8 0 % の配列同一性を有し、かつ該フェレドキシン遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、および配列番号 2 における塩基 1 7 8 2 ~ 塩基 1 9 7 0 の連続するヌクレオ

50

チド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 80% の配列同一性を有し、かつ該フェレドキシン遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチドからなる群より選ばれるポリヌクレオチドを含んでなる、ことを特徴とする上記大腸菌。

【請求項 9】

放線菌 (*actinomyce te*) 由来チトクローム P - 450 遺伝子を発現する大腸菌 (*Escherichia coli*) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 450 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、該フェレドキシン還元酵素遺伝子が、配列番号 5 における塩基 118 ~ 塩基 1377 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 80% の配列同一性を有し、かつ該フェレドキシン還元酵素遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、および配列番号 8 における塩基 34 ~ 塩基 1296 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 80% の配列同一性を有し、かつ該フェレドキシン還元酵素遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチドからなる群より選ばれる、ことを特徴とする上記大腸菌。

10

【請求項 10】

放線菌 (*actinomyce te*) 由来チトクローム P - 450 遺伝子を発現する大腸菌 (*Escherichia coli*) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 450 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、該フェレドキシン遺伝子が、配列番号 16 の塩基 1439 ~ 塩基 1759 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 80% の配列同一性を有し、かつ該フェレドキシン遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、ことを特徴とする上記大腸菌。

20

【請求項 11】

放線菌 (*actinomyce te*) 由来チトクローム P - 450 遺伝子を発現する大腸菌 (*Escherichia coli*) であって、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 450 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持し、かつ、該フェレドキシン還元酵素遺伝子が、配列番号 16 における塩基 115 ~ 塩基 1380 の連続するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたは該ヌクレオチド配列に最低 80% の配列同一性を有し、かつ該フェレドキシン還元酵素遺伝子がコードする蛋白質と同じ酵素反応を触媒する蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、ことを特徴とする上記大腸菌。

30

【請求項 12】

請求項 4 または 5 記載の大腸菌を用いてコンパクトン (*compactin*) の 6 位に水酸基を導入する方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、宿主大腸菌 (*Escherichia coli*) における放線菌 (*actinomyce te*) 由来チトクローム P - 450 遺伝子の発現系に関する。

40

背景技術

チトクローム P - 450 遺伝子がコードするチトクローム P - 450 酵素 (以下、単に P - 450 ともいう) は、還元型で一酸化炭素を結合して 450 nm 付近にソーレー吸収帯 (*soret band*) を示す一群のプロトヘム含有蛋白質の総称である。P - 450 は多くの動植物組織、カビ、酵母のミクロソーム、一部の動物組織のミトコンドリアの内膜に結合しているほか、ある種の細菌、カビでは可溶性の形で存在している。

P - 450 は様々な基質特異性を有し、多種多様な有機化合物を基質とし得る異常に広い基質特異性を示す酵素がある一方で、比較的限られた種類の有機化合物としか反応しない

50

基質特異性のかなり厳密な酵素も存在する。また反応部位に対する立体特異性 (stereo-specificity) や位置特異性 (regio-specificity) にも優れた特性を示す。そして、P - 450 の具体的な機能としては、該 P - 450 を発現する細胞の生体内異物 (xenobiotic) の水酸化反応、エポキシ化反応、脱アルキル化反応、脱窒素反応などの様々な反応を触媒することが知られている。例えば、ヒトに対して用いられる薬物の多くは多様なまたは特定の P - 450 のもつ作用、例えば水酸化などにより体内で代謝・不活性化されたり、逆にその薬理効果が向上したり、あるいは副作用が増強されたりするため、P - 450 は、薬物の代謝研究やプロドラッグ開発の観点から極めて高い医学的重要性を有する。

したがって、ヒトを含む高等生物の薬物代謝機能をもつ P - 450 は多岐にわたって長年研究されてきている。該酵素は高等生物の肝臓のミクロゾーム画分から得ることができるが単一のアイソザイムに精製することは難しい。そのため単一のアイソザイムをコードする遺伝子を大腸菌または酵母などの宿主において機能的に発現させて、簡便にその酵素がもつ代謝的役割を調べる技術が開発されている。

しかし、かかる薬物代謝機能をもつ高等生物の P - 450 を利用して工業的レベルで物質生産に結びつけた例はない。高等生物の P - 450 は大腸菌または酵母などの宿主にて機能的に発現させても細菌のもつ P - 450 に比べて生産性が低いことや副反応が多いことから利用が限られている。

他方、微生物由来の、例えば、カビまたは細菌においては工業的に有用な物質の生産に役立つ P - 450 の例が知られており、一部は実際に有用薬物の工業生産に利用されている。代表的な例は、放線菌 ストレプトミセス カルボフィラス (Streptomyces carbophilus) によりコンパクトン (compactin) の 6 位を水酸化し、生成物として高脂血症の治療薬であるプラバスタチンを得るものである (Watanabe et al., Gene, 163 (1995) 81 - 85、特開平 6 - 70780 号公報)。また、放線菌 シュードノカルジア オートトロフィカ (Pseudonocardia autotrophica) を利用してビタミン D<sub>3</sub> の 1 位と 25 位を水酸化して活性型ビタミン D<sub>3</sub> を生産する方法も実用化されている。

このような放線菌由来のチトクローム P - 450 酵素を用いた薬物の微生物変換はその酵素を発現している放線菌の培養液または菌体を用いて行われてきた。放線菌由来の P - 450 をコードする遺伝子を同じ放線菌であり、かつ、宿主として適した ストレプトミセス リビダンス (Streptomyces lividans) に導入してその酵素活性を発現させた培養液も用いられている。このような遺伝子をもつ放線菌による基質化合物の微生物変換は、その放線菌の培養および基質化合物の目的生成物への変換にかなりの時間を要する。また、酵素によっては効果的に酵素発現量を増やすための発現誘導条件の検討が必要である。さらに、基質や目的生成物の代謝および分解系が変換に用いる放線菌に存在する場合があります、このことが副産物の生成や基質および目的生成物の減少などを引き起こし、目的生成物の生産性を低下させることがある。

また、上述の高等生物由来の P - 450 の単一アイソザイムをコードする遺伝子を大腸菌などの微生物宿主において機能的に発現させる例に習い、ストレプトミセス グリセウス (Streptomyces griseus) 由来チトクローム P - 450 遺伝子である CYP105D1 遺伝子を大腸菌で機能的に発現した報告がある (Taylor et al., Biochemical and biophysical Research Communications (1999) 263: 838 - 842)。この発現系では、P - 450 に対する大腸菌のペリプラズム中の適当な電子供与体が P - 450 と協同して炭化水素の水酸化を行っているようである (Kaderbhai et al., Applied and Environmental Microbiology, 67 (2001) 2136 - 2138)。このような P - 450 遺伝子の発現系は、宿主大腸菌が放線菌等に比べて培養時間を短縮できる利点がある。

#### 発明の開示

上述の P - 450 をもつ微生物による有機化合物の変換系は、例えば、生物触媒への応用

10

20

30

40

50

および薬物の代謝研究での使用が企図されている。殊に、生物触媒への応用を考慮すると、より効率のよい生物変換を達成することが望まれるであろう。また、産業上重要な所望の放線菌由来 P - 450 酵素を効率良くスクリーニングするには、ハイスルプットスクリーニング (high throughput screening) などにおけるロボットを用いて自動化された酵素アッセイ操作あるいはその他の簡便かつ迅速な酵素アッセイ操作の対象として好適な遺伝子ライブラリーが必要である。具体的には微生物、好ましくは、取扱いが簡便で生育の速い微生物を宿主とし、個々の構成クローンが、その宿主で発現が可能である放線菌由来の異なるチトクローム P - 450 遺伝子をもつライブラリー (放線菌チトクローム P - 450 発現ライブラリー) の提供が望まれる。

上述の課題の一つの解決策としては、少なくとも培養に要する時間が比較的短く、しかも、放線菌 P - 450 を用いる変換に係る基質化合物および該化合物からの生成物の代謝および分解系が少ないとみなせる大腸菌を宿主として使用することが挙げられる。ところが、大腸菌を宿主とする上記 Taylor et al. のごとく単に放線菌由来の P - 450 遺伝子を宿主大腸菌に組み込み培養するだけでは、他の放線菌由来の多種多様な P - 450 遺伝子の多くは機能的に発現できない (すなわち、P - 450 の所期の酵素活性が生じない。) ことが確認された。したがって、本発明者らは、放線菌由来の多種多様な P - 450 遺伝子を確実に、高酵素活性を伴って機能的に発現できる系の構築について検討してきた。その結果、大腸菌にとっては異種の細菌に由来する特定の電子伝達系を P - 450 遺伝子と共に組み込み、そして共発現すると多種多様な放線菌のチトクローム P - 450 遺伝子が機能的に発現できることを見出した。

本発明は、かような知見に基づくものであり、宿主大腸菌 (Escherichia coli) における放線菌 (actinomycete) 由来チトクローム P - 450 遺伝子の発現系であって、該大腸菌が、異種微生物由来のフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子と該チトクローム P - 450 遺伝子とを操作可能な形態で含んでなる組換え DNA 分子を担持する発現系を提供する。

かような発現系は、上記 Taylor et al. に記載されるような大腸菌 (E. coli) の生来の電子伝達系と共役することのできない放線菌由来のチトクローム P - 450 をコードする遺伝子でも機能的に発現することができる。換言すれば、本発明に従う発現系は、大腸菌生来の電子伝達系と共役するか、またはしないかに拘わりなく、P - 450 の所期の酵素活性を生じうる。かくして、本明細書にいう「機能的に発現する」とは、関心のある遺伝子が、そのコードする蛋白質を活性を示す形態で発現されることを意味する。

以下、本発明を詳細に説明する。

宿主大腸菌とは、プラスミドやファージ DNA などのベクターと挿入遺伝子の増殖に用いることのできる大腸菌をいい、例えば、宿主 - ベクター系を用いる組換え DNA 実験において、外来の DNA を組込んだベクターが遺伝子導入後に複製可能な宿主であればいずれであってもよい。宿主 - ベクター系の宿主として、市販されている大腸菌を都合よく利用できる。

本発明にいう「放線菌 (actinomycete) 由来のチトクローム P - 450 遺伝子」とは、本発明の目的に沿う P - 450 遺伝子をいずれかの形態 (染色体またはプラスミド上、等) に有するものであれば、放線菌目 (Actinomycetales) に属するいかなる属の細菌由来のチトクローム P - 450 遺伝子をも包含する。そして、チトクローム P - 450 遺伝子とは、上述したとおりの蛋白質であって、本発明に従って、一原子酸素添加反応を触媒する活性を有しうる蛋白質をコードする遺伝子のすべてをいう。限定されるものでないが、本発明の発現系に組み入れることを企図している P - 450 遺伝子としては、かような機能を有し、既に、少なくとも一部の DNA の配列決定が行われており、各配列情報が遺伝子データベース (EMBL および GenBank) から入手できる以下に列挙する放線菌に由来し、かつ上記活性を有しうる蛋白質をコードするか、または下記の具体的なチトクローム P - 450 の機能を有するものを挙げるることができる。

放線菌名	チトクロームP-450の機能	
<u>Amycolatopsis orientalis</u>	機能不明	
<u>Actinomadura verrucosospora</u>	ベルコペプチン(vercopeptin)生合成	
<u>Amycolata autotrophica</u>	機能不明	
<u>Amycolatopsis mediterranei</u>	リファマイシン生合成	
<u>Amycolatopsis mediterranei</u>	バルヒマイシン生合成	10
<u>Kitasatospora griseospola</u>	テルペンテシン生合成	
<u>Micromonospora griseorubida</u>	マイシナマイシン生合成	
<u>Micromonospora inyoensis</u>	機能不明	
<u>Microtetraspora recticatena.</u>	コンパクチン水酸化	
<u>Mycobacterium smegmatis mc2155</u>	ピペリジン、ピロリジン分解	
<u>Mycobacterium sp. FM10</u>	機能不明	20
<u>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</u>	全ゲノムで22個のP-450遺伝子 (機能不明)	
<u>Myxococcus xanthus</u>	ポリケタイド抗生物質TA	
<u>Pseudonocardia autotrophica</u> (旧名 <u>Amycolata autotrophica</u> )	ビタミンD3水酸化	
<u>Rhodococcus erythropolis</u>	チオカルバメート系農薬分解	
<u>Rhodococcus fascians (D188)</u>	植物生理活性物質合成	30
<u>Rhodococcus ruber</u>	エチル-tert-ブチルエーテル分解	
<u>Saccharopolyspora erythraea</u>	エリスロマイシン水酸化	
<u>Streptoalloteichus hindustanus</u>	機能不明	
<u>Streptomyces acidiscabies</u>	サクストミン(thaxtomin A) 生合成	
<u>Streptomyces albus</u>	機能不明	
<u>Streptomyces ansochromogenes</u>	ニッコーマイシン生合成	40
<u>Streptomyces antibioticus</u>	オレアンドマイシン生合成	
<u>Streptomyces antibioticus</u>	シモサイクリノン生合成	

<u>Streptomyces aureofaciens Ren71</u>	機能不明	
<u>Streptomyces avermitilis</u>	エバーメクチン フラン環形成	
<u>Streptomyces avermitilis</u>	オリゴマイシン生合成	
<u>Streptomyces avermitilis</u>	ポリケタイド-4生合成	
<u>Streptomyces avermitilis</u>	ポリケタイド-9生合成	
<u>Streptomyces avermitilis</u>	other-type ポリケタイド生合成	10
<u>Streptomyces avermitilis</u>	ポリエンマクロライド生合成	
<u>Streptomyces avermitilis</u>	ペプチド-7生合成	
<u>Streptomyces carbophilus</u>	コンパクチン水酸化	
<u>Streptomyces clavuligerus</u>	クラブラン酸生合成	
<u>Streptomyces coelicolor A3(2)</u>	全ゲノムで18個のP-450遺伝子 (機能不明)	20
<u>Streptomyces fluvus</u>	コンパクチン水酸化	
<u>Streptomyces fradiae</u>	タイロシン生合成	
<u>Streptomyces glaucescens</u>	機能不明	
<u>Streptomyces griseolus</u>	スルフォニルウレア系農薬分解	
<u>Streptomyces griseolus</u>	スルフォニルウレア系農薬分解	
<u>Streptomyces griseus</u>	機能不明	
<u>Streptomyces hygroscopicus</u>	ラパマイシン生合成	30
<u>Streptomyces hygroscopicus var.</u> <u>ascomyceticus</u>	FK520 生合成	
<u>Streptomyces lavendulae</u>	マイトマイシン生合成	
<u>Streptomyces lavendulae</u>	コンプレスタチン生合成	
<u>Streptomyces lividans</u>	機能不明	
<u>Streptomyces maritimus</u>	エンテロシン生合成	40
<u>Streptomyces natalensis</u>	ピマリシン生合成	
<u>Streptomyces nodosus</u>	アンフォテリシン生合成	
<u>Streptomyces nogalater</u>	ノガラマイシン生合成	
<u>Streptomyces noursei</u>	ナイスタチン生合成	

<u>Streptomyces peucetius</u>	ダウノルビシン水酸化	
<u>Streptomyces peucetius subsp. caesius</u>	ダウノマイシン水酸化	
<u>Streptomyces rishiriensis strain DSM 40489</u>	クママイシン A1(coumermycin A1) 生合成	
<u>Streptomyces sclerotialus</u>	機能不明	10
<u>Streptomyces sp.</u>	FK-506水酸化	
<u>Streptomyces sp.</u>	機能不明	
<u>Streptomyces spheroides</u>	ノボピオシン生合成	
<u>Streptomyces tendae</u>	ニッコーマイシン(nikkomycin)生合成	
<u>Streptomyces thermotolerans</u>	カルボマイシン エポキシ化	
<u>Streptomyces venezuelae</u>	ピクロマイシン、メチマイシン生合成	20

また、本発明で用いることのできる放線菌由来 P - 4 5 0 遺伝子を記載し、殊に、これらの遺伝子を調製するのに参照できる文献記載のものとしては、それぞれ以下に記載のものを挙げる事ができる：

ストレプトミセス カルボフィラス (Streptomyces carbophilus) 由来のコンパクチンの水酸化酵素 (P - 4 5 0<sub>sca</sub>-2)、Watanabe et al., Gene 163 (1995) 81-85 または特開平 6 - 7 0 7 8 0 号公報；

マイクロテトラスポーラ レクチカテナ (Microtetraspora recticata)、特開 2 0 0 1 - 2 8 6 2 9 3 号公報；および

アミコラータ エスピー (Amycolata sp.)、ビタミン D<sub>3</sub> の水酸化 Sasaki et al., Applied Microbiology and Biotechnology (1992) 38: 152-157。

また、公知の文献において遺伝子配列は記載されていないものの、P - 4 5 0 酵素の機能や生化学的性質が詳細に決定され、その情報をもとにその P - 4 5 0 酵素をコードする遺伝子を容易に調製することができるものとして、ストレプトミセス ロゼオクロモゲネス (Streptomyces roseochromogenes) 由来のプロゲステロン水酸化酵素 (Berrie et al., Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 77 (2001) 87-96) が挙げられる。

本発明にいう、チトクローム P - 4 5 0 をコードする遺伝子 (または P - 4 5 0 遺伝子) とは、上述した放線菌の全 DNA から単離できるか、あるいはそれらのヌクレオチド配列情報を基に、後述するような PCR 反応を利用して増幅することができ、かつ、本発明に従う P - 4 5 0 遺伝子の発現系において、機能的に発現できるものであればいずれも包含される。さらに、上記遺伝子 (生来の遺伝子ともいう) と機能的に等価のポリヌクレオチドであって、本発明に従う発現系で対応する基質に対して一原子酸素添加反応を触媒する活性を生じるものも、本発明にいう P - 4 5 0 遺伝子に包含される。このような等価のポリヌクレオチドは、それらの相補物が、通常、対応する生来の遺伝子と、一定のハイブリダイゼーション条件下、例えば、60 で 2 × SSC (標準クエン酸食塩水) 中、好ましくは 60 で 0.5 × SSC 中、特に好ましくは 60 で 0.2 × SSC 中のストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する、ポリヌクレオチドであらう。さ

10

20

30

40

50



らに、かようなポリヌクレオチドは、対応する生来の遺伝子のヌクレオチド配列とを整理させて比較した場合、最低80%、好ましくは90%、そして最も好ましくは約95%以上の同一性を有するであろう。このような「%同一性」は、2つの配列を最適の態様で整理させた場合に、2つの配列間で共有する一致したヌクレオチドの百分率を意味する[すなわち、%同一性 = (一致した位置の数 / 位置の全数) × 100で算出でき、市販されているアルゴリズムを用いて計算することができる。また、このようなアルゴリズムは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990) 403 - 410に記載されるNBLASTおよびXBLASTプログラム中に組込まれている。]

本発明の発現系に含められるフェレドキシン遺伝子は、宿主大腸菌にとって異種微生物(または細菌)に由来するDNA分子である。一般にフェレドキシン遺伝子は、分子量が6,000~14,000程度の電子伝達体として機能する蛋白質をコードする。フェレドキシン遺伝子は、上記放線菌由来のP-450遺伝子と、さらに後述するフェレドキシン還元酵素遺伝子とも共発現することによって、P-450遺伝子を機能的に発現するのに関与するものであれば、大腸菌以外のいかなる細菌に由来するものであってもよい。細菌の具体例としては、限定されるものでないが、上述したP-450遺伝子の起源と同一もしくは異なる放線菌であることができる。

また、P-450遺伝子の起源たる放線菌とは異なる属に属する、例えば、シュードモナス(Pseudomonas)属に属する細菌に由来するフェレドキシン遺伝子を用いることもできる。このようなフェレドキシン遺伝子の例としては、Peterson et al., The Journal of Biological Chemistry、265 (1990) 6066 - 6073に記載されているプチダレドキシン(Putidaredoxin)遺伝子(またはcamBとも称する)であることもできる。

フェレドキシン遺伝子がP-450遺伝子と同一の放線菌に由来する場合、P-450遺伝子とフェレドキシン遺伝子は、全DNA上で隣接して存在する遺伝子クラスターを構成する場合がある。かような場合には、両遺伝子を含むDNA断片を本発明に従う発現系で利用することもできる。本発明の発現系では、フェレドキシン遺伝子は重複して存在していてもよい。このような例で好ましいものとしては、放線菌に由来するフェレドキシン遺伝子とシュードモナス プチダ(Pseudomonas putida)に由来する上記camBとの組み合わせ使用を挙げることができる。かような遺伝子も、上述したP-450遺伝子と同様に特定できる、機能的に等価のポリヌクレオチドを包含する。

本発明に従う発現系に必須の要素として含められるフェレドキシン還元酵素遺伝子は、宿主大腸菌とは異種であり、さらにP-450遺伝子の起源とも場合によって異種であってもよい細菌に由来するものであることができる。具体的には、上述のP-450遺伝子およびフェレドキシン遺伝子と共発現することができ、かつ、かような発現によりP-450遺伝子産物たるP-450酵素の所期の活性を示す、すなわち、基質に一原子酸素添加反応を触媒する、ことのできるフェレドキシン還元酵素をコードするものであれば、いかなる細菌に由来するフェレドキシン還元酵素遺伝子であっても本発明で使用できる。限定されるものでないが、放線菌に属するものとして、ストレプトミセス セリカラー(Streptomyces coelicolor)に由来するフェレドキシン還元酵素遺伝子(以下、本明細書ではfdr-1またはfdr-2という場合あり)、または上述のシュードモナス プチダ(Pseudomonas putida)に由来するプチダレドキシン還元酵素遺伝子(またはcamAとも称する)を本発明で好ましく使用できる。また、かかる遺伝子も、上述したP-450遺伝子と同様に特定できる、機能的に等価のポリヌクレオチドを包含する。

本発明の発現系では、上記P-450遺伝子、フェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子が操作可能な形態で宿主大腸菌に含まれる。「操作可能な形態」とは、上記すべての遺伝子が機能的に発現できるような状態で宿主内に存在していることを意味する。かような状態の典型的な例は、上述のすべての遺伝子が、大腸菌で自律複製できるプラスミド中に、自律複製配列、プロモーター配列、ターミネーター配列、薬剤耐性遺伝子等とともに、適当な順序で組込まれて宿主中に存在しているか、あるいは染色体DNA組

10

20

30

40

50

込み型ベクターを介して、機能的に発現しうる状態で宿主大腸菌の染色体中に組込まれている場合を意味する。上記 P - 4 5 0 遺伝子、フェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺伝子は、上記プラスミド中でいかなる順序で配置されていてもよいが、通常、P - 4 5 0 遺伝子を最も上流に配置するのが好ましい。特に、P - 4 5 0 遺伝子とフェレドキシン遺伝子が同一の起源の遺伝子クラスター断片として利用される場合には、例えば、P - 4 5 0 遺伝子 - フェレドキシン遺伝子 - フェレドキシン還元酵素遺伝子の順、P - 4 5 0 遺伝子 - フェレドキシン遺伝子 - プチダレドキシン還元酵素遺伝子 - プチダレドキシン遺伝子の順、または P - 4 5 0 遺伝子 - プチダレドキシン還元酵素遺伝子 - プチダレドキシン遺伝子の順に配置されていることができる。

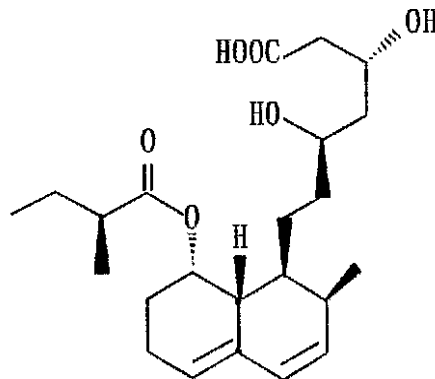
上記発現系で用いることのできるプラスミドまたはベクターは、大腸菌で、安定に自律複製できるか、大腸菌の染色体に外来の遺伝子を組込むことのできる組込み型ベクターであることができる。いずれも市販されているものをそのまま、あるいは必要により改変して用いればよい。これらのプラスミドとしては、遺伝子転写のための強力なプロモーターを備えたものが都合よく使用でき、かようなプラスミドとしては、例えば、p E T 1 1 および p U C 1 8 として市販されているものを挙げるができる。

こうして提供される本発明の放線菌由来チトクローム P - 4 5 0 遺伝子の発現系は、各種薬物の改変または前駆体から目的薬物への生物変換等に適する P - 4 5 0 酵素のスクリーニングに利用することができ、さらには前駆体から目的薬物の製造に利用することもできる。

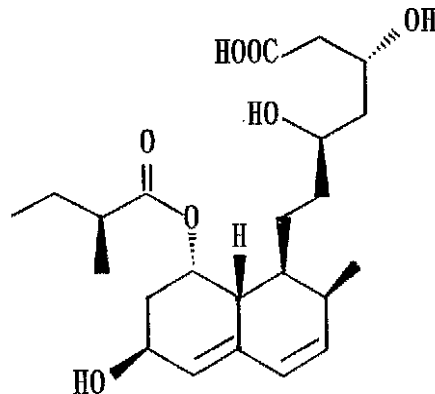
以下に実施例をあげて、本発明を具体的に説明する。

#### 発明を実施するための最良の形態

次式



で表されるコンパクトン (compactin) (また、上式の対応する  $\beta$ -ラクトン体としても存在する) またはその塩の一原子酸素添加反応により、次式



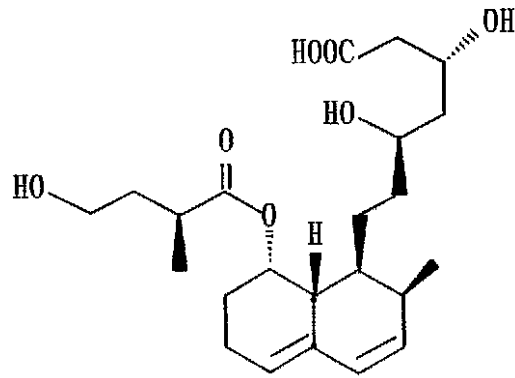
で表されるプラバスタチン (pravastatin)、ならびに次式

10

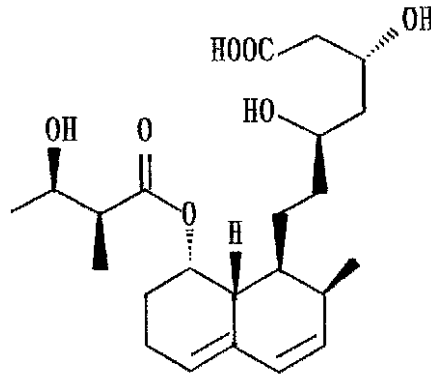
20

30

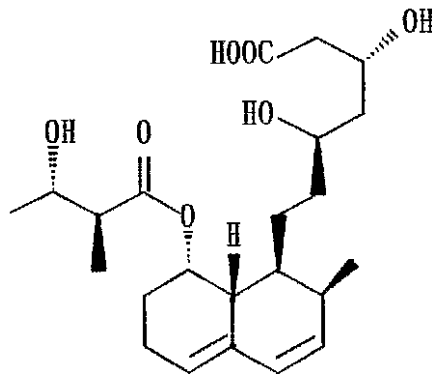
40



10



20



30

で、それぞれ表される異性体混合物（本明細書では「RT-5.8物質」という）を生成するP-450遺伝子発現系の構築例を参照しながら、本発明をさらに説明する。

なお、プラバスタチンナトリウムは高脂血症の治療剤として临床上重要な医薬である。

コンパクチン[またはメバスタチン(mevastatin)とも称されている]水酸化酵素活性を有する放線菌は、上記一覧表にも示したように、ストレプトミセス(Streptomyces)属に属するもの(例えば、特開昭57-50894号、特許第2672551号)やマイクロテトラスポーラ(Microtetraspora)属に属するものがある。後者は本発明者らの一部が確認したものであるが、例えば、以下の手順に従って、P-450遺伝子を含むDNA断片を調製できる。

40

マイクロテトラスポーラ レクチカテナ(Microtetraspora recticatenata) IFO 14525からのP-450遺伝子の取得:

該遺伝子は、多くのP-450水酸化酵素ファミリーにおいて高い確率でアミノ酸配列が保存されていることが知られている(J. Bacteriol. 172、3335-3345(1990)、J. Biol. Chem. 260、16122-16130(1985)等)領域のアミノ酸配列を参考にデザインしたプライマーを用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法により得ることができる。例えば、一定の培養条件下で、IFO 14525株を培養し、得られた菌体を破碎して染色体DNAを得る。得られた染色体DNAに対して、P-450水酸化酵素ファミリーに共通して存在する酸素結

50

合領域とヘム結合領域のアミノ酸配列から設計したプライマーを用いてPCR反応を行う。PCR反応で増幅されたDNA断片を取得し、これを基にさらにPCR反応を行い、最初のPCR反応で増幅されたDNA断片の両外側の周辺領域を取得する（下流には、フェレドキシンをコードする遺伝子が存在していた。）これらの操作はいずれも、当該技術分野で周知の方法で実施することができる。これらの操作全体についての詳細は、本出願人による特願2001-47664明細書に記載されている（該明細書の内容は引用することにより本明細書に組み入れられる。）。こうして取得されたP-450遺伝子の周辺領域を含むヌクレオチド配列（コード配列におけるアミノ酸配列）を配列表の配列番号1に示す。この配列の塩基313～塩基1533までの連続するヌクレオチド配列がP-450遺伝子（*moxA*）に相当し、そして塩基1547～塩基1741までの連続するヌクレオチド配列がフェレドキシン遺伝子（*moxB*）に相当する。

10

ストレプトミセス エスピー (*Streptomyces* sp.) TM-6 または TM-7 からの P-450 遺伝子の取得：

本出願人は、日本国内の土壌より分離した多数のストレプトミセス (*Streptomyces*) に属する微生物について、コンパクチンを基質とし、プラバスタチンに生物変換しうる微生物として、上記TM-6およびTM-7株を同定した。そして、これらの菌株は茨城県つくば市東1-1-1中央第6独立行政法人産業技術総合研究所の特許生物寄託センターに平成13年4月25日付で寄託され、それぞれ受託番号FERM P-18311およびFERM P-18312で受託されている。

その後、これらの菌株TM-6およびTM-7は、所謂、ブダベスト条約の規定上の国際寄託当局でもある前記の特許生物寄託センターに、該条約に基づく寄託への移管請求を行い、それぞれ受託番号FERM BP-8002およびFERM BP-8003で受領された。

20

TM-7株について、上記IFO 14525株と同様に目的遺伝子領域をPCRで増幅し、目的遺伝子とその周辺領域のDNA断片について配列決定した結果を配列番号2に示す。この配列における塩基544～塩基1758までの連続するヌクレオチド配列がP-450遺伝子（*boxA*）に相当し、そして塩基1782～1970までの連続するヌクレオチド配列がフェレドキシン遺伝子（*boxB*）に相当する。これらの遺伝子の取得操作は、本出願人による特願2001-166412明細書に詳細に記載されている（該明細書の内容は引用することにより本明細書に組み入れられる。）

30

なお、上記*boxA*のヌクレオチド配列は、例えば、特許第2672551号公報に記載されているストレプトミセス カルボフィラス (*Streptomyces carbophilus*) SANK 62585株 (FERM BP-1145) のP-450遺伝子についてシーケンス決定を行い、対比したところ約75%の相同性があり、上記*moxA*とは約46%の相同性があり、その他、ストレプトミセス リビダンス (*Streptomyces lividans*) の水酸化酵素遺伝子とは約75%の相同性があり、ストレプトミセス テンダエ (*Streptomyces tendae*) Tji 901株のニコマイシン (*nikkomycin*) 生合成経路にあるピリジルホモスレオニンモノオキシゲナーゼ (*pyridylhomothreonine monooxygenase*) をコードする遺伝子との相同性は約46%であった。

40

以上の説明または後述する実施例の説明、さらには当該技術分野に周知の技法または遺伝子データベースの情報に従えば、当業者は、一原子酸素添加を行うべく基質を用いて、該基質の生物変換について既知の〔例えば、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション (ATCC) から発行されているタイプカルチャーのカタログ等に記載の〕放線菌をスクリーニングし、所期の酵素活性を有する菌株を同定した後、上述と同様にPCR操作等を実施することにより、多種多様のP-450遺伝子を取得できるであろう。したがって、本発明という放線菌由来チトクロームP-450遺伝子には、それら自体既知のもののみならず、当業者が取得することのできる放線菌由来チトクロームP-450遺伝子のすべてが包含される。

本発明に従う発現系に含められるフェレドキシン遺伝子およびフェレドキシン還元酵素遺

50

伝子の取得、また、これらとP-450遺伝子との操作可能な連結による発現系の構築も、上記P-450遺伝子と同様に、または文献記載の方法(Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd edition (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)に加え、後述の実施例に記載の方法を参照すれば、当業者にとって極めて容易であろう。

こうして、構築されたP-450遺伝子の発現系は、大腸菌を増殖させる条件下でP-450遺伝子を機能的に発現させることができる、かような発現系にP-450遺伝子産物の酵素の基質を共存させて適当な条件下でインキュベート(または発現系たる形質転換体を培養)することにより、基質に一原子酸素が添加した生成物を得ることができる。

通常、培養は大腸菌の栄養培地となり得、さらに基質の生物変換に悪影響を及ぼさない培地で行う。このような培地は、適当な炭素源、窒素源、無機塩および天然有機栄養物等により成り立っている。炭素源としては、グルコース、フラクトース、グリセロール、ソルビトール、有機酸類等を単独に用いるかもしくは併用でき、その使用濃度は特に限定されず、おおよそ1~10%が適当である。窒素源としてはアンモニア、尿素、硫酸、硝酸、酢安等の化合物を一種または二種以上使用することができる。無機塩としては、燐酸一カリウム、燐酸二カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄などの塩類を使用することができる。さらに使用菌の生育促進効果を持つ有機栄養源としては、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸などが用いられ、さらにビタミン類、核酸類を少量培地に含有せしめることもできる。

本発明の発現系では、宿主大腸菌を大腸菌の増殖に適する温度、例えば28~40で培養した後、約25以下、好ましくは20~24の温度下でP-450酵素を誘導すると、高力価で所期の活性を生じるP-450酵素を得ることができる。

以下、放線菌由来チトクロームP-450酵素としてコンパクチンの水酸化酵素をコードするマイクロテトラスポラレクチカテナ(*Microtetraspora recticatenata*) IFO 14525由来の遺伝子moxAを例として、その発現系の構築例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれらの例に何ら制限されるものではない。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)：

以下の実施例で行うPCRの条件は、それぞれ以下のとおりである。

(1) ゲノムDNAを鋳型とする場合の条件

(反応液組成)

滅菌精製水	15 $\mu$ l
2倍濃縮GC緩衝液I(宝酒造)	25 $\mu$ l
dNTP混合溶液(dATP, dGTP, dTTP, dCTP各2.5 mM)	8 $\mu$ l
前進プライマー(100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
逆行プライマー(100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
ゲノムDNA(10 ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
LA Taq(5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)	0.5 $\mu$ l

(温度条件)

94 3分

(98 20秒、63 30秒、68 2分) 30サイクル

72 5分

(2) プラスミドDNA(pMoxAB-fdr1)を鋳型とする場合の条件

## (反応液組成)

滅菌精製水	15 $\mu$ l	
2倍濃縮GC緩衝液I(宝酒造)	25 $\mu$ l	
dNTP混合溶液(dATP, dGTP, dTTP, dCTP各2.5 mM)	8 $\mu$ l	
Mo x-3Fプライマー(100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
Mo x-5Rプライマー(100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	10
プラスミドDNA(1 ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
LA Taq(5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)	0.5 $\mu$ l	

(温度条件)

94 3分

(98 20秒、63 30秒、68 2分) 25サイクル

72 5分。

## 実施例1 プラスミドの構築

(1) pT7-fdr1

ストレプトミセス セリカラー (Streptomyces coelicolor) A3 (2) [John Innes Institute (Norwich, UK) より分譲された。] のゲノムDNAを鋳型にしてプライマーFDR1-1F (5' - GCCATATGACTAGTGCGCCTCACAGACTGGAAACGGGAATCTCATG - 3') (配列番号3参照) とFDR1-2R (5' - GCGAATTCTGTCTCGGTCAGGCCTGGTCTCCCGTCGGCCG - 3') (配列番号4参照) を用いてPCRを行い、1.3 kbのフェレドキシン還元酵素に相同性を有する蛋白をコードする遺伝子(以下fdr-1と表記する。配列番号5参照)断片を増幅した。この断片を制限酵素Nde IおよびBam HIで処理したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したfdr-1遺伝子断片を含むゲル切片から同断片をSUPREC-01(宝酒造)を用いて回収・精製した。この断片を大腸菌プラスミドベクターpET11a(Stratagene社)のNde I部位およびBamHI部位にT4 DNAリガーゼにより連結して、大腸菌DH5 に形質転換して、プラスミドpT7-fdr1を構築した。

(2) pT7-fdr2

同じ条件にて上記Streptomyces coelicolor A3 (2) のゲノムDNAよりプライマーFDR2-3F (5' - CGACTAGTGACGAGGAGGCAGACAAATGGTCGACGCGGATCAG - 3') (配列番号6参照) とFDR2-4R (5' - CGGGATCCGACAACCTATGCGACGAGGCTTTCGAGGG - 3') (配列番号7参照) を用いてPCRを行い、fdr-1とは異なる1.3 kbのフェレドキシン還元酵素に相同性を有する蛋白ををコードする遺伝子(以下fdr-2と表記する。配列番号8参照)断片を増幅した。この断片を制限酵素Bam HIおよびSpe Iで処理したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したfdr-1遺伝子断片を含むゲル切片から同断片をSUPREC-01(宝酒造)を用いて回収・精製した。一方でプラスミドpT7-fdr1をBam HIおよびSpe Iで処理したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したpET11aベクター断片を含むゲル切片から同断片をSUPREC-01(宝酒造)を用いて回収・精製した。このベクター断片と前述のfdr-1遺伝子断片をT4 DNAリガーゼにより連結して、大腸菌DH5 に形質転換して、プラスミドpT7-fdr2を構築した。

(3) pT7-camAB

10

20

30

40

50

シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) ATCC 17453 のゲノムDNAを鋳型にしてプライマーPRR-1F (5'-GCCCCCCATATG AACGCAAACGACAACGTGGTCATC-3') (配列番号9参照)とPRR-2R (5'-GCGGATCCTCAGGCACTACTCAGTTTCAGCTTTGGC-3') (配列番号10参照)を用いてPCRを行い、のプチダレドキシ還元酵素遺伝子 (camA) およびその遺伝子すぐ下流のプチダレドキシ還元酵素遺伝子 (camB) を含む1.65 kbの断片 (camAB断片、配列番号16参照)を増幅した。この断片を制限酵素Nde IおよびBam HIで処理したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したcamAB断片を含むゲル切片から同断片をSUPREC-01 (宝酒造)を用いて回収・精製した。この断片を大腸菌プラスミドベクターpET11a (Stratagene社)のNde I部位およびBamHI部位にT4 DNAリガーゼにより連結して、大腸菌DH5 に形質転換して、プラスミドpT7-camABを構築した。

10

#### (4) pMoxAB

IFO14525株のゲノムDNAを鋳型にしてプライマーMox-1F (5'-GCCCCCCATATGACGAAGAACGTCGCCGACGAAGCTG-3') (配列番号11参照)とMox-12R (5'-GCAGATCTAGTGGCTTTCAGGC GTCCCGCAGGATGG-3') (配列番号12参照)を用いてPCRを行い、1.4 kbのコンパクチン水酸化酵素をコードする遺伝子 (moxA) およびその遺伝子の下流に隣接するフェレドキシ還元酵素遺伝子 (moxB) の断片 (moxAB断片)を増幅した。この断片を制限酵素Nde IおよびBgl IIで処理したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したmoxAB断片を含むゲル切片から同断片をSUPREC-01 (宝酒造)を用いて回収・精製した。この断片を前述のプラスミドpET11aのNde I部位およびBam HI部位にT4 DNAリガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌DH5 を形質転換して、プラスミドpMoxABを構築した。pMoxABの構造図を図1に示した。

20

#### (5) pMoxAB-fdr1およびpMoxAB-fdr2

IFO14525株のゲノムDNAを鋳型にしてプライマーMox-1F (5'-GCCCCCCATATGACGAAGAACGTCGCCGACGAAGCTG-3') (上記参照)とMox-2R (5'-CGACTAGTGGCTTTCAGGCGTCCCGCAGGATGG-3') (配列番号13参照)を用いてPCRを行い、コンパクチン水酸化酵素をコードする遺伝子 (moxA) およびその遺伝子の下流に隣接するフェレドキシ還元酵素遺伝子 (moxB) を含む1.4 kbの断片 (moxAB断片)を増幅した。この断片を制限酵素Nde IおよびSpe Iで処理したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したmoxAB断片を含むゲル切片から同断片をSUPREC-01 (宝酒造)を用いて回収・精製した。この断片を前述のプラスミドpT7-fdr1のNde I部位およびSpe I部位にT4 DNAリガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌DH5 を形質転換して、プラスミドpMoxAB-fdr1を構築した。pMoxAB-fdr1の構造図を図2に示した。

30

また同じ挿入断片を別のプラスミドpT7-fdr2のNde I部位およびSpe I部位にT4 DNAリガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌DH5 を形質転換して、プラスミドpMoxAB-fdr2を構築した。pMoxAB-fdr2の構造図を図3に示した。

40

#### (6) pMoxAB-camAB

pMoxAB-fdr1のDNAを鋳型にしてプライマーMox-3F (5'-GGAGATATACATATGACGAAGAAC-3') (配列番号14参照)とMox-5R (5'-GCCCCCCATATGACGCACTCCTAGTGGCTTTCAGGC GTCCCG-3') (配列番号15参照)を用いてPCRを行い、1.5 kbのコンパクチン水酸化活性をもつチトクロームP450酵素をコードする遺伝子およびその遺伝子の下流に隣接するフェレドキシ還元酵素遺伝子 (moxAB断片)の断片を増幅した。この断

50

片をプラスミド pT7-camAB の Nde I 部位に T4 DNA リガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌 DH5 を形質転換して、プラスミド pMoxAB-camAB を構築した。pMoxAB-camAB の構造図を図 4 に示した。

#### 実施例 2 放線菌由来チトクローム P450 酵素活性を発現する組換え体の調製

3つのプラスミドすなわち pMoxAB-fdr1、pMoxAB-fdr2、pMoxAB-camAB で大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して各々のプラスミドの形質転換株を得た。これらの株は、その単一のコロニーを LB 培地 2 ml に接種し、28 °C で 16 時間 220 rpm で振とう培養し、培養液 200 µl を等量 (200 µl) の 40% グリセロール (滅菌済み) と混合して調製されるグリセロールカルチャーとして、使用時まで -80 °C で保存した。一方で pMoxAB およびベクターとして使用した pET11a も同様にして大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して各々のプラスミドの形質転換株を得た。これらの形質転換株は対照として使用した。

10

#### 実施例 3 コンパクチンからプラバスタチンおよび水酸化類縁体の生産

##### (1) 静菌体を用いた生産方法

前述の実施例 2 で得られた BL21 (DE3) 形質転換株のグリセロールカルチャー 10 µl を、アンピシリン 50 µg/ml (終濃度) を添加した LB 培地 2 ml に加え、28 °C で 16 時間 220 rpm で振とう培養した。この培養液 250 µl を、アンピシリン 50 µg/ml (終濃度) を添加した NZCYM 培地 2.5 ml に加え、37 °C で 2.5 時間振とう培養後、100 mM IPTG を 25 µl、80 mg/ml 5-アミノレブリン酸を 25 µl 順次添加し、18-28 °C (この温度を「誘導温度」とする。)、120 rpm で 16 時間振とう培養した。この培養液 10 ml から遠心分離により回収した菌体を変換緩衝液 -2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 10% グリセロール, [pH 7.3]) で 1 回洗浄し、次に菌体を 1 ml の同緩衝液に懸濁し、静菌体懸濁液とした。この静菌体懸濁液にコンパクチンナトリウム塩 (終濃度 250 µg/ml) および NADPH (終濃度 1 mM) を添加し、振とう条件下 (220 rpm)、32 °C で 24-48 時間インキュベートした (この時間を「変換時間」とする。)。その後、この反応液 100 µl にアセトニトリル 100 µl を加えて、1 分間室温でボルテックスした後、エッペンドルフ遠心機で 16,000 rpm で 10 分間遠心することにより得られた上清を HPLC で分析し、基質のコンパクチンが水酸化されることにより生成したプラバスタチンおよびその他の水酸化体を検出した。HPLC の詳しい条件を以下に示す。

20

30

分析装置: Shimadzu C-4RA Chromatopac

カラム: J'sphere ODS-H80 (YMC, Inc.), 7.5 mm x 4.6 mm I.D.

移動相: A; イオン交換水 / 酢酸 / トリエチルアミン = 998 : 1 : 1

B; メタノール / 酢酸 / トリエチルアミン = 998 : 1 : 1

グラジエント時間設定: 0 分 移動相 A / B = 50 : 50

3.00 分 移動相 A / B = 10 : 90

3.50 分 移動相 A / B = 10 : 90

3.51 分 移動相 A / B = 50 : 50

6.00 分 終了

流速: 2.0 ml / 分

検出: UV 237 nm

インジェクション容量: 10 µl

カラム温度: 40

分析時間: 6 分

保持時間: コンパクチン 4.2 分

プラバスタチン 2.7 分

RT-5.8 物質 3.6 分

(2) フェドバッチ (Fed-batch) 法による生産方法

40

50



BL21(DE3)形質転換株のグリセロールカルチャー10 $\mu$ lを、アンピシリン50 $\mu$ g/ml(終濃度)を添加したLB培地2mlに加え、28 $^{\circ}$ Cで16時間220rpmで振とう培養した。この培養液250 $\mu$ lを、アンピシリン50 $\mu$ g/ml(終濃度)を添加したM9-プラス培地(M9塩, 0.4%グルコース0.5%カザミノ酸、100 $\mu$ g/mlチアミン、20 $\mu$ l/mlチミン、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>)25mlに加え、37 $^{\circ}$ Cで2.5時間振とう培養後、100mM IPTGを25 $\mu$ l、80mg/ml 5-アミノレブリン酸を25 $\mu$ l順次添加し、22 $^{\circ}$ C、120rpmで16時間振とう培養した。この培養液に2.5mlの変換混合物(2.5mg/mlコンパクチンナトリウム塩、1mg/ml FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、10mM NADPH、50%グリセロール)を添加し、さらに22 $^{\circ}$ Cで96時間培養を継続した。ここで変換混合物を添加してからの時間を「培養時間」とした。この培養液100 $\mu$ lにアセトニトリル100 $\mu$ lを加えて、1分間室温でボルテックスした後、エッペンドルフ遠心機で16,000rpmで10分間遠心することにより得られた上清を前述と同じ条件でHPLCで分析し、基質のコンパクチンが水酸化されることにより生成したプラバスタチンおよびその他の水酸化体を検出した。

実施例3(1)に記載した大腸菌形質転換株を用いた18-28 $^{\circ}$ Cの蛋白質誘導条件下で、変換時間を48時間としたときの静菌体によるプラバスタチンおよびRT-5.8物質の生産量の測定結果を表1に示す。

表1

誘導温度	18 $^{\circ}$ C		22 $^{\circ}$ C		25 $^{\circ}$ C		28 $^{\circ}$ C	
コンパクチン水酸化体( $\mu$ g/ml)	プラバスタチン	RT-5.8物質	プラバスタチン	RT-5.8物質	プラバスタチン	RT-5.8物質	プラバスタチン	R-5.8物質
BL21(DE3)/pET11a	0	0	0	0	0	0	0	0
BL21(DE3)/pMoxAB	0	0.18	0	0	0	0	0	0.3
BL21(DE3)/pMoxAB-fdr1	0.24	1.24	1.72	8.48	0.43	1.92	0	0.61
BL21(DE3)/pMoxAB-fdr2	0.25	1.31	2.15	10.21	0	0.84	0.35	1.65
BL21(DE3)/pMoxAB-camAB	3.84	22.07	6.09	33.55	4.05	16.53	0.97	5.49

誘導温度は22 $^{\circ}$ Cの 때가最も生産性が高く、その条件では *Streptomyces coelicolor* A3(2)由来のフェレドキシン還元酵素(fdr-1およびfdr-2)を共発現させた株はいずれも培地中に1.7 $\mu$ g/ml~2.1 $\mu$ g/mlのプラバスタチンおよび8.4 $\mu$ g/ml~10.2 $\mu$ g/mlのRT-5.8物質を蓄積した。camABを共発現させた株はさらに高い生産性を示し、培地中に6.09 $\mu$ g/mlのプラバスタチンおよび33.55 $\mu$ g/mlのRT-5.8物質を蓄積した。対照としてベクターのみ(BL21(DE3)/pET11a)、あるいはフェレドキシン還元酵素を含まない株(BL21(DE3)/pMoxAB)ではプラバスタチンおよびRT-5.8物質はほとんど検出されなかった。

実施例4(2)に記載したフェドバッチ法によるプラバスタチンの生産試験の結果を表2に示す。

表2

培養時間	4時間		24時間		48時間		96時間	
	プラバ スタチン	RT-5.8 物質	プラバ スタチン	RT-5.8 物質	プラバ スタチン	RT-5.8 物質	プラバ スタチン	R-5.8 物質
BL21(DE3)/pET11a	0	0	0	0	0	0	0	0
BL21(DE3)/pMoxAB	0	0	0	0	0	0	0	0
BL21(DE3)/pMoxAB- fdr1	0	0	0	0	0	0.87	0	0.61
BL21(DE3)/pMoxAB- fdr2	0	0	0	0	0	0.29	0	0.28
BL21(DE3)/pMoxAB- camAB	0	0	0.28	2.82	0.64	7.74	0.95	12.44

培養時間96時間の結果で見ると、*Streptomyces coelicolor* A3(2)由来のフェレドキシン還元酵素(fdr-1およびfdr-2)を共発現させた株はいずれも培地中に0.28 $\mu$ g/ml~0.61 $\mu$ g/mlのRT-5.8物質を蓄積したが、プラバスタチンの蓄積は検出されなかった。一方、camABを共発現させた株は高い生産性を示し、培地中に0.95 $\mu$ g/mlのプラバスタチンおよび12.44 $\mu$ g/mlのRT-5.8物質を蓄積した。対照としてベクターのみ(BL21(DE3)/pET11a)、あるいはフェレドキシン還元酵素を含まない株(BL21(DE3)/pMoxAB)ではプラバスタチンおよびRT-5.8物質は検出されなかった。camABを共発現させた株、すなわちpMoxAB-camABを導入した大腸菌においてその導入遺伝子のうちmoxB(フェレドキシン遺伝子)とcamB(プチダレドキシン遺伝子)の機能が重複している。そこでpMoxAB-camABに含まれる構成遺伝子のうち活性発現に関与に必須な遺伝子を検証するため、構成遺伝子のうち1つないし2つの遺伝子を欠失したプラスミドを構築し、大腸菌に導入した。これらの株の静菌体を用いて、変換時間を24時間としたときのコンパクチンの水酸化体の生産量を結果を表3に示す。

表3

	構成遺伝子 (+:あり -:なし)				コンパクチン水酸化体 ( $\mu$ g/ml)	
	moxA	moxB	camA	camB	プラバ スタチン	RT-5.8 物質
BL21(DE3)/pET11a	-	-	-	-	0	0
BL21(DE3)/pMoxAB	+	+	-	-	0	0
BL21(DE3)/pMoxAB-camA	+	+	+	-	0.17	0.82
BL21(DE3)/pMoxA-camAB	+	-	+	+	0	0
BL21(DE3)/pMoxAB-camAB	+	+	+	+	1.67	9.96

以上より、活性の発現には少なくとも *moxA*、*moxB*、*camA* の 3 遺伝子が必須であるが、これに *camB* を加えることで、極めて高い活性の上昇が認められ、コンパクチン水酸化体の生産量で約 10 倍増加した。

#### 実施例 5 プラスミドの構築

(1) *pT7NS-camAB*

*Pseudomonas putida* ATCC 17453 のゲノム DNA を鋳型にしてプライマー PRR-1F (5' - GCCCCCCCATATGACGCAAAACGACAAACGTGGTCATC - 3') (配列番号 9 参照) と PRR-2R (5' - GCGGATCCTCAGGCACTACTCAGTTTCAGCTTTGGC - 3') (配列番号 10 参照) を用いて下記の条件で PCR を行った。

(反応液組成)

滅菌精製水	15 $\mu$ l
2 倍濃縮 GC 緩衝液 I (宝酒造)	25 $\mu$ l
dNTP 混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2.5 mM)	8 $\mu$ l
PRR-1F プライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
PRR-2R プライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17453	
ゲノム DNA (10 ng / $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
LA Taq (5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)	0.5 $\mu$ l

(温度条件)

95 3分

(98 20秒、63 30秒、68 2分) 30 サイクル

72 5分

*putidaredoxin reductase* 遺伝子 (*camA*) およびその遺伝子すぐ下流の *putidaredoxin* 遺伝子 (*camB*) を含む 1.5 kb の増幅された断片 (*camAB* 断片) を制限酵素 *Nde* I および *Bam* HI で処理したのち、0.8% アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出した *camAB* 断片を含むゲル切片から同断片を SUPREC-01 (宝酒造) を用いて回収・精製した。この断片を大腸菌プラスミドベクター *pET11a* (Stratagene 社) の *Nde* I 部位および *Bam* HI 部位に T4 DNA リガーゼにより連結した後、大腸菌 DH5 に形質転換して、プラスミド *pT7-camAB* を構築した。次に 2 種の合成オリゴ DNA SP-1 (5' - TATGCGTCACTAGTTCGGGAGTGC GTTA - 3') (配列番号 17 参照) および SP-2 (5' - TATAACGCACTCCCGACTAGTGACGCA - 3') (配列番号 18 参照) をアニールして得られるリンカー 1 分子をこのプラスミドの *Nde* I 部位に T4 DNA リガーゼにより連結し、大腸菌 DH5 に形質転換して、プラスミド *pT7NS-camAB* を構築した。*pT7NS-camAB* の構造図を図 5 に示した。

(2) *pCBM-camAB*

カルボマイシン (*carbomycin*) 生産菌 *Streptomyces thermotolerans* ATCC 11416 の全 DNA を鋳型にしてプライマー CB-4F (5' - GCCCCCCCATATGACAGCTTTGAATCTGATG - 3') (配列番号 19 参照) および CB-5R (5' - GCACTAGTCAAGAGACGGACC GGCAAGAC - 3') (配列番号 20 参照) を用いて下記の条件で PCR を行うことで 1.25 kb の ORF-A (カルボマイシン B の 12, 13 位のエポキシ化酵素をコードする シトクロム P450 遺伝子) 断片を得た (ORF-A の遺伝子配列および機能につい

10

20

30

40

50

ては *Bioscience Biotechnology Biochemistry* vol. 59, 582-588, 1995 に記載されている ; 引用することによりこの文献の内容は本明細書に組み入れられる。 )。

(反応液組成)

滅菌精製水	61 $\mu$ l	
10倍濃縮緩衝液 (宝酒造)	10 $\mu$ l	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l	
dNTP混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各2.5 mM)	16 $\mu$ l	10
CB-4Fプライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
CB-5Rプライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	

*Streptomyces thermotolerans* ATCC11416

の全DNA (100 ng / $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq (5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)	1 $\mu$ l	

(温度条件)

95 3分

(98 20秒、63 30秒、68 2分) 30サイクル

72 5分

この遺伝子断片を *Nde* I および *Spe* I で消化したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出した ORF - A 断片を含むゲル切片から同断片を同断片を SUPREC - 01 (宝酒造) を用いて回収・精製した。この断片を pT7NS - camAB の *Nde* I - *Spe* I 部位へ T4 DNA リガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌 DH5 を形質転換して、プラスミド pCBM - camAB を構築した。pCBM - camAB の構造図を図6に示した。

(3) pSC154A1 - camAB

*Streptomyces coelicolor* A3(2) (John Innes Institute, Norwich, UK より分譲) の全DNA を *Bam* HI および *Pst* I で分解し、100 ng /  $\mu$ l の TE (10 mM Tris - HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) 溶液とした。このDNA を鋳型にしてプライマー 154A1 - 1F (5' - GCCCCCCATATGGCGACCCAGCAGCCCGCCCTC - 3') (配列番号21参照) および 154A1 - 2R (5' - GCACTAGTCA GCCGGCGTG CAGCAGGACCGG - 3') (配列番号22参照) を用いて下記の条件でPCRを行うことで1.2 kb の CYP154A1 をコードする遺伝子断片を得た (*Streptomyces coelicolor* A3(2) 由来 CYP154A1 をコードする遺伝子のDNA配列は遺伝子データベース、例えば GenBank に遺伝子名 SCE6.21 として公開されている)。

10

20

30

40

## (反応液組成)

滅菌精製水	61 $\mu$ l	
10倍濃縮緩衝液 (宝酒造)	10 $\mu$ l	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l	
dNTP混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各2.5 mM)	16 $\mu$ l	
154A1-1Fプライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	10
154A1-2Rプライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
<u>Streptomyces coelicolor</u> A3(2)		
全DNAのBam HI-Pst I分解物 (100 ng / $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq (5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)	1 $\mu$ l	

(温度条件)

95 3分

(98 20秒、63 30秒、68 2分) 30サイクル

72 5分

この遺伝子断片をNde IおよびSpe Iで消化したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出したCYP154A1遺伝子断片を含むゲル切片から同断片を同断片をSUPREC-01 (宝酒造)を用いて回収・精製した。この断片をpT7NS-camABのNde I-Spe I部位へT4 DNAリガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換して、プラスミドpSC154A1-camABを構築した。pSC154A1-camABの構造図を図7に示した。

(4) pDoxA1-camAB

ダウノマイシン (daunomycin) 生産菌 Streptomyces peuce  
ticus ATCC 29050の全DNAを鋳型にしてプライマーDoxA-1F (5'-GCCCCCATATGGCCGTCGACCCGTTTCGCGTG-3') (配列番号23参照) およびDoxA-2R (5'-GCACTAGTCAGCGCAGCCAGACGGGCAGTTC-3') (配列番号24参照)を用いて下記の条件でPCRを行うことで1.2kbのdoxA (ダウノマイシンの生合成に参与するシトクロムP450遺伝子)断片を得た。doxA遺伝子のDNA配列はJournal of Bacteriology vol. 181, No. 1, 305-318, 1999 (引用することにより、この文献の内容は本明細書に組み入れられる。)に記載されている。

10

20

30

## (反応液組成)

滅菌精製水	61 $\mu$ l	
10倍濃縮緩衝液 (宝酒造)	10 $\mu$ l	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l	
dNTP混合溶液 (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各2.5 mM)	16 $\mu$ l	
DoxA-1Fプライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	10
DoxA-2Rプライマー (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	

Streptomyces peuceticus ATCC 29050

の全DNAの全DNA (100 ng / $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
LA Taq (5 units/ $\mu$ l, 宝酒造)	1 $\mu$ l	

(温度条件)

95 3分

(98 20秒、63 30秒、68 2分) 30サイクル

72 5分

この遺伝子断片を Nde I および Spe I で消化したのち、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後、このゲルから切り出した doxA 断片を含むゲル切片から同断片を同断片を SUPREC-01 (宝酒造) を用いて回収・精製した。この断片を pT7NS-camAB の Nde I - Spe I 部位へ T4 DNA リガーゼにより連結した。この反応液で大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換して、プラスミド pDoxA1-camAB を構築した。pDoxA1-camAB の構造図を図8に示した。

実施例6 チトクローム P450 を発現させた大腸菌組換え体を用いた微生物変換

(1) カルボマイシンAの生産

前述の実施例5で得られたプラスミドのうち pCBM-camAB で大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して得られた株のグリセロールカルチャー 10  $\mu$ l を、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml (終濃度) を添加した LB 培地 2 ml に加え、28 $^{\circ}$ C で 16 時間 220 rpm で振とう培養した。この培養液 250  $\mu$ l を、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml を添加した NZCYM 培地 2.5 ml に加え、37 $^{\circ}$ C で 2.5 時間振とう培養後、100 mM IPTG を 25  $\mu$ l、80 mg/ml -aminolevulinic acid を 25  $\mu$ l 順次添加し、22 $^{\circ}$ C、120 rpm で 16 時間振とう培養した。この培養液から遠心分離により回収した菌体を変換用緩衝液-2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 10% グリセロール, [pH 7.3]) で 1 回洗浄し、次に菌体を 3 ml の同緩衝液に懸濁し、静菌体懸濁液とした。この静菌体懸濁液 600  $\mu$ l にカルボマイシンBメタノール溶液 (100 mg/ml) 3  $\mu$ l を加えて、しんとう (220 rpm) しながら 28 $^{\circ}$ C で 5 時間インキュベートした。その後、この反応液に 100  $\mu$ l の 50% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8.5)、100  $\mu$ l の酢酸エチルを加えて、ボルテックスした後、エッペンドルフ遠心機で 16,000 rpm で 5 分間遠心した。得られた酢酸エチル相のうち 10  $\mu$ l を TLC プレートにスポットして酢酸エチル:ジエチルアミン (100:2) で展開した。このプレートに 10% 硫酸を噴霧後 100 $^{\circ}$ C で 10 分加熱した。発色したスポットの発色強度を 2 波長クロマトスキャナー CS-930 (島津製作所) で波長 600 nm で分析することで、基質のカルボマイシンB (TLC における RF 値: 0.71) がエポキシ化されることにより生成したカルボマイシンA (TLC における RF 値: 0.64) の生成量を評価した。その結果、カルボマイシンAの生成が確認され、その生産量は 90  $\mu$ g/ml であった。一方、対照株 BL21 (DE3) (pET11a) を用いて同じ条件で基質変換反応および分析を行った時、カルボマイシンAの生成は検出

10

20

30

40

50

されなかった。

#### (2) 7-エトキシクマリンの脱エチル化

前述の実施例5で得られたプラスミドのうちpSC154A1-camABで大腸菌BL21(DE3)を形質転換して得られた株のグリセロールカルチャー10 $\mu$ lを、アンピシリン50 $\mu$ g/ml(終濃度)を添加したLB培地2mlに加え、28 $^{\circ}$ Cで16時間220rpmで振とう培養した。この培養液250 $\mu$ lを、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを添加したNZCYM培地25mlに加え、37 $^{\circ}$ Cで2.5時間振とう培養後、100mM IPTGを25 $\mu$ l、80mg/ml *-aminolevulinic acid*を25 $\mu$ l順次添加し、22 $^{\circ}$ C、120rpmで16時間振とう培養した。この培養液から遠心分離により回収した菌体を変換用緩衝液-2(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 0.2mM DTT, 10%グリセロール, [pH7.3])で1回洗浄し、次に菌体を6mlの同緩衝液に懸濁し、静菌体懸濁液とした。この静菌体懸濁液1mlに、7-エトキシクマリンのDMSO溶液(50mM)を5 $\mu$ lを加えて、しんとう(220rpm)しながら28 $^{\circ}$ Cで20時間インキュベートした。その後、この反応液に200 $\mu$ lの酢酸エチルを加えて、ボルテックスした後、エペンドルフ遠心機で16,000rpmで5分間遠心した。得られた酢酸エチル相のうち100 $\mu$ lを減圧下で乾固した。乾固物を100mM磷酸カリウム緩衝液(pH7.4)1mlに溶解した。この溶液を80倍に希釈してF-2000型分光蛍光光度計(日立サイエンスシステムズ)にて励起波長380nmにおける蛍光(波長460nm)を測定することで、基質の7-エトキシクマリが脱エチル化されることにより生成した7-ヒドロキシクマリンの生成量を評価した。その結果、蛍光強度は2770を示し、7-ヒドロキシクマリンの生成が確認された。一方、対照株BL21(DE3)(pET11a)を用いて同条件で基質変換反応および分析を行った時の蛍光強度は3以下であった。

#### (3) 13-ジヒドロダウノマイシンの脱水素化

前述の実施例5で得られたプラスミドのうちpDoxA1-camABで大腸菌BL21(DE3)を形質転換して得られた株のグリセロールカルチャー10 $\mu$ lを、アンピシリン50 $\mu$ g/ml(終濃度)を添加したLB培地2mlに加え、28 $^{\circ}$ Cで16時間220rpmで振とう培養した。この培養液250 $\mu$ lを、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを添加したNZCYM培地25mlに加え、37 $^{\circ}$ Cで2.5時間振とう培養後、100mM IPTGを25 $\mu$ l、80mg/ml *-aminolevulinic acid*を25 $\mu$ l順次添加し、22 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。この培養液から遠心分離により回収した菌体を変換用緩衝液-2(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 0.2mM DTT, 10%グリセロール, [pH7.3])で1回洗浄し、次に菌体を4mlの同緩衝液に懸濁し、静菌体懸濁液とした。この静菌体懸濁液1mlに13-ジヒドロダウノマイシンのメタノール溶液(10mg/ml)を10 $\mu$ l加えて、しんとう(220rpm)しながら28 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。その後、この反応液400 $\mu$ lに1.2mlのアセトンを加えてボルテックス後、300 $\mu$ lのクロロホルムで抽出した。この抽出液を減圧条件下で乾固させたのち、500 $\mu$ lの0.3M塩酸で溶解し、80 $^{\circ}$ Cで30分加熱した。この液を100 $\mu$ lのクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧条件下で乾固させた。乾固物をメタノール100 $\mu$ lに溶解後、次の条件下HPLCで基質の13-ジヒドロダウノマイシが脱水素化されることにより生成したダウノマイシンを検出した。

(HPLCの分析条件)

分析装置: Shimadzu島津LC10 Chromatopac(島津製作所)

カラム: ZORBAX TMS(5 $\mu$ ) 4.6mID x 250mm

移動相: 水:アセトニトリル:メタノール:リン酸=540:290:170:2(容積比)の混合液にラウリル硫酸ナトリウム1.0gを加えて溶かし、2N-NaOHを加えてpHを3.6に調整したもの。

流速: 1.5ml/min

検出波長: 254nm

10

20

30

40

50

インジェクション容量：20  $\mu$ l

カラム温度：40

分析時間：20 min

保持時間：13 - ジヒドロダウノマイシン 4.8 min

ダウノマイシン 5.9 min

分析の結果、3.7  $\mu$ g/mlのダウノマイシンを検出した。一方、対照株BL21 (DE3) (pET11a)を用いて同じ条件で基質変換反応および分析を行った時、ダウノマイシンの生成は検出されなかった。

#### 産業上の利用可能性

放線菌由来チトクロームP-450遺伝子を、大腸菌を宿主として構築した組換え体を用いて基質有機化合物の一原子酸素添加反応を効率良く製造することができる。

一方で産業上重要な所望の放線菌由来P450酵素を効率良くスクリーニングするためのハイスループットスクリーニング (high throughput screening) あるいはその他の簡便かつ迅速な酵素アッセイスクリーニングの対象として好適な遺伝子ライブラリーを提供することができる。

【配列表】



## SEQUENCE LISTING

<110> Mercian Corporation

<120> 大腸菌における放線菌由来のチトクロームP-450遺伝子の発現系

<130> K-43Mercian

10

<150> JP2002/110311

<151> 2002-04-12

<160> 24

20

<210> 1

<211> 2696

<212> DNA

<213> *Microtetraspora recticatena* IF014525

<220>

30

<221> CDS

<222> (313)..(1533)

<220>

<221> CDS

<222> (1547)..(1741)

40

<400> 1

tgcgctccac cgcgttcttc gacggccgag gggccaccca ctccgtcadc gtcctgctcg 60

cctggctcac gctcgggtgc gtgctgtgcg tggccagcgg cctgcgcgcg cgccgtgccg 120  
 ccaccgtcgc cgcgggactt gtgaggacgc cggcagcacc ggcccctacg acgttcgcaa 180  
 ccccagagagg ctgaccgcat cgctgcccac gaagcggcgg cgcgacagcc acctgaccag 240  
 gcaccgcttc tggcctcacc atccgaacag cccagaacga attcagccag atctctcacc 300  
 aggaggttat tc atg acg aag aac gtc gcc gac gaa ctg gcc ggc ctg gaa 351

Met Thr Lys Asn Val Ala Asp Glu Leu Ala Gly Leu Glu

10

1 5 10

ctg ccg gtc gag cgg ggc tgc ccg ttc gcc ccg ccc gcc gcc tac gag 399  
 Leu Pro Val Glu Arg Gly Cys Pro Phe Ala Pro Pro Ala Ala Tyr Glu

15 20 25

cgg ctg cgc gag cgg gcg ccg atc aac aag gtc cgc ctg acc agc ggc 447  
 Arg Leu Arg Glu Arg Ala Pro Ile Asn Lys Val Arg Leu Thr Ser Gly

20

30 35 40 45

ggc cag gcg tgg tgg gtg tcc ggg cac gag gag gcc cgt gcc gtc ctc 495  
 Gly Gln Ala Trp Trp Val Ser Gly His Glu Glu Ala Arg Ala Val Leu

50 55 60

gcc gac ggc cgc ttc tcc tcc gac aag cgc aag gac ggc ttc ccg ctc 543  
 Ala Asp Gly Arg Phe Ser Ser Asp Lys Arg Lys Asp Gly Phe Pro Leu

30

65 70 75

ttc acc ctc gac gcg gcg acc ctg cag cag ctc cgc agc cag ccg ccg 591  
 Phe Thr Leu Asp Ala Ala Thr Leu Gln Gln Leu Arg Ser Gln Pro Pro

80 85 90

ttg atg ctc ggc atg gac ggc gcg gaa cac tcc gcg gcc cgc cgt ccg 639  
 Leu Met Leu Gly Met Asp Gly Ala Glu His Ser Ala Ala Arg Arg Pro

95 100 105

40

gtg atc ggc gag ttc acc gtg aag cgg ctg gcc gcg ctg cgc ccg agg 687  
 Val Ile Gly Glu Phe Thr Val Lys Arg Leu Ala Ala Leu Arg Pro Arg

110 115 120 125

atc cag gac atc gtc gac cac ttc atc gac gac atg ctc gcc acc gac 735

Ile Gln Asp Ile Val Asp His Phe Ile Asp Asp Met Leu Ala Thr Asp		
130	135	140
cag cgc ccg gtc gac ctg gtg cag gcg ctg tcc ctg ccg gtg ccc tca		783
Gln Arg Pro Val Asp Leu Val Gln Ala Leu Ser Leu Pro Val Pro Ser		
145	150	155
ctg gtg atc tgc gaa ctg ctc ggc gtc ccc tac acc gac cac gac ttc		831
Leu Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Pro Tyr Thr Asp His Asp Phe		10
160	165	170
ttc cag agc cgc acc acc atg atg gtg agc cgg acc tcg atg gaa gac		879
Phe Gln Ser Arg Thr Thr Met Met Val Ser Arg Thr Ser Met Glu Asp		
175	180	185
cgc cgg cga gcc ttc gcc gaa ctg cgc gcc tac atc gac gac ctg atc		927
Arg Arg Arg Ala Phe Ala Glu Leu Arg Ala Tyr Ile Asp Asp Leu Ile		20
190	195	200
205		
acc cgc aag gag tcc gaa ccc ggc gac gac ctg ttc agc cga cag atc		975
Thr Arg Lys Glu Ser Glu Pro Gly Asp Asp Leu Phe Ser Arg Gln Ile		
210	215	220
gcc cgg caa cgc cag gag ggc acc ctc gac cat gcg ggc ctg gtg agc		1023
Ala Arg Gln Arg Gln Glu Gly Thr Leu Asp His Ala Gly Leu Val Ser		30
225	230	235
ctc gcc ttc ctg ctg ctg acc gcc gga cac gag acc acc gcg aac atg		1071
Leu Ala Phe Leu Leu Leu Thr Ala Gly His Glu Thr Thr Ala Asn Met		
240	245	250
atc tcg ctc ggc gtg gtc ggg ctg ctc tct cac ccg gag caa ctg acc		1119
Ile Ser Leu Gly Val Val Gly Leu Leu Ser His Pro Glu Gln Leu Thr		40
255	260	265
gtg gtc aag gcc aac ccg ggc aga acg ccc atg gcc gtg gag gaa ctg		1167
Val Val Lys Ala Asn Pro Gly Arg Thr Pro Met Ala Val Glu Glu Leu		
270	275	280
285		

ctg cgc tac ttc acc atc gcc gac ggg gtc acc tcc cgg ctg gcc acc	1215	
Leu Arg Tyr Phe Thr Ile Ala Asp Gly Val Thr Ser Arg Leu Ala Thr		
290                                295                                300		
gaa gac gtg gag atc gcc ggg gtg agc atc aag gcc ggt gag gcc gtc	1263	
Glu Asp Val Glu Ile Gly Gly Val Ser Ile Lys Ala Gly Glu Gly Val		
305                                310                                315		
atc gtc tcg atg ctg tcg gcc aac tgg gac ccg gcg gtg ttc aag gac	1311	10
Ile Val Ser Met Leu Ser Ala Asn Trp Asp Pro Ala Val Phe Lys Asp		
320                                325                                330		
ccg gcc gtg ctg gat gtc gag cgc ggg gcc cgt cac cac ctc gcc ttc	1359	
Pro Ala Val Leu Asp Val Glu Arg Gly Ala Arg His His Leu Ala Phe		
335                                340                                345		
ggc ttc gcc ccg cac cag tgc ctc ggc cag aac ctg gcc cgg atg gag	1407	20
Gly Phe Gly Pro His Gln Cys Leu Gly Gln Asn Leu Ala Arg Met Glu		
350                                355                                360                                365		
ctg cag atc gtc ttc gac acg ctg ttc cgc cgt atc cct tcc ctg cgg	1455	
Leu Gln Ile Val Phe Asp Thr Leu Phe Arg Arg Ile Pro Ser Leu Arg		
370                                375                                380		
ctc gcc gta ccg atg gag gac gtg ccg ttc aag ggg gac tcc gtc atc	1503	30
Leu Ala Val Pro Met Glu Asp Val Pro Phe Lys Gly Asp Ser Val Ile		
385                                390                                395		
tac ggc gtt cac gaa ctc ccg gtc acc tgg tga gcgggacatg atg cgg atc	1555	
Tyr Gly Val His Glu Leu Pro Val Thr Trp                                Met Arg Ile		
400                                405                                1		
aaa gcg gaa acc ggg ctc tgc gtc gcc tcc gcc cag tgc gtc ctg acc	1603	40
Lys Ala Glu Thr Gly Leu Cys Val Gly Ser Gly Gln Cys Val Leu Thr		
5                                10                                15		
gaa ccg gcc gtc ttc gac cag gac gac gac gcc atc gtg gcc ctg ctg	1651	
Glu Pro Ala Val Phe Asp Gln Asp Asp Asp Gly Ile Val Ala Leu Leu		

20	25	30	35	
acc gac cac ccc gac gac cag agc gcc gca cag gtg cgc cac gcc gtc				1699
Thr Asp His Pro Asp Asp Gln Ser Ala Ala Gln Val Arg His Ala Val				
	40	45	50	
acc ctg tgc ccg tcc cgc gcg ctg tcc atc ctg cgg gac gcc tga agc				1747
Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ala Leu Ser Ile Leu Arg Asp Ala				
	55	60	65	
cac tga ctccggtggt ctccctgctca ccgaggcctc ggcccccggt cgactcggcc gt				1805
accagctcg acgtcagcgt acgttctggt tccgctgcgc ttcggcctcc atgtccgacc				1865
ccgtgtcgc gagggagacg agcaggcggc gcaggagcac cgggatctgg tcgcggtcgg				1925
cggagctcag gccctccagg agcccgct cgttggcgac gtgatgctcg acgagcctgt				1985
tgaccaggct cagccccctga tcggtgaggg agatcaggac gcggcgccgg tgggccggat				2045
cgacggcgcg gtccaccagg cccctttct cagctggtc gatgcggtg gtcggggcgg				2105
ccgagctgac catcgccgcc gtgctcagtt cgcggcgct gaggacgtg ggcggcccgg				2165
agcgcagcag ggtagccagc acatcgaact cccagggctc gatgccgtgc agggagaagt				2225
ggtccctgat ggcgcgttc aggaggcggg agaccggga caggcgaccg atgatctcca				2285
tcggtgagca gtccagatcg gggcgcgcc tctgccactg gctgatgat acgtccactc				2345
cgctgtgggg ttcgtcggtc gtcctcgtgt gtctgtcct gagcgtgggc tgtgcacaga				2405
gactaacact tagacgtcga agggtttgac tctggcgaac atcgtggtct aagttttcga				2465
catcgaatt ttcgagagga gactttgatg aagatcctgc ttatcgggtc cggcggttac				2525
ctcggctcgg cggtcgcgga ccacctggac gaggccggac accacatcgt cgaactgacc				2585
cgcgccaccg acgaccgcc ggagaacggg cgccaagcag ccgtgtcggc gaccttgacc				2645
gatcccgct tcgcttaacc ccgggcggtg accccccgac attgaccgc c				2696

10

20

30

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1992

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptomyces sp. TM-7

40

<220>

<221> CDS

<222> (544)..(1758)

<220>

<221> CDS

<222> (1782)..(1970)

10

<400> 2

tcgccgggcc cggcgggtgtg gaccgttcgc ggaccagccg ggcgaaatcg gggtcgtgca 60

tgacctcggg gagcaggccg cggagtatgt ccgccgtgcg aggcggccaa cctggcggag 120

agtcgccgta gcgcgggtgat gacatcgggtg cgcagggcgc cggtgtcggg caggtcggcg 180

tcggacagcc ggtgggcccgc gcaggcgtcg acgacgagtt cggcacggcc gggccacctc 240

cggtacaggg tggccttgcc ggtacgggcc cgtgcggcca cgcgctccat cgtcagtc 300 20

ggcgtagtcc gacctcggtc agtttctcgc agggtcgcgg ccaggatggc cctctccagt 360

tcctctctc ggccggcgag ggttttcga tggtcgcggg cgtccgggcc ggcgcgtccc 420

cgtgggttgg aggcattgact ccagccatt tgcgagcac cgttgtgag cgtcgggtgg 480

gtaagcctag ccttcggtta gagaactgac cgtttcttaa gcgtcgagtg catcgagga 540

cgc atg acc gag acc gtt acg acg ccc aca tca ggc gcc ccc gcc ttc 588

Met Thr Glu Thr Val Thr Thr Pro Thr Ser Gly Ala Pro Ala Phe

1 5 10 15 30

ccc agt gac cgc acc tgc ccc tac cac ctc ccc gac cgg tac aac gac 636

Pro Ser Asp Arg Thr Cys Pro Tyr His Leu Pro Asp Arg Tyr Asn Asp

20 25 30

ctc cgg gac cgg gag ggt tcg ctg cag cgg gtc acc ctc tac gac ggc 684

Leu Arg Asp Arg Glu Gly Ser Leu Gln Arg Val Thr Leu Tyr Asp Gly

35 40 45

cgg cag gca tgg ctg gtg acc ggg tac gac acg gca cgc aag ctg ctg 732 40

Arg Gln Ala Trp Leu Val Thr Gly Tyr Asp Thr Ala Arg Lys Leu Leu

50	55	60		
gcc gac ccc cgg ctc tcc gac cgg aca cac gcc gac ttc ccc gcc			780	
Ala Asp Pro Arg Leu Ser Ser Asp Arg Thr His Ala Asp Phe Pro Ala				
65	70	75		
acc tcc ggg cgg gtg gag agc ttc cgg gac cgc cgg ccg gcg ttc atc			828	
Thr Ser Gly Arg Val Glu Ser Phe Arg Asp Arg Arg Pro Ala Phe Ile				
80	85	90	95	10
agc ctg gac ccg ccc gag cac ggg ccg aaa cgg cgc cat gac cat cag			876	
Ser Leu Asp Pro Pro Glu His Gly Pro Lys Arg Arg His Asp His Gln				
100	105	110		
gag ttc acc gtc cgg cgc atc aag ggc atg cgg gcc gac gtc gag cag			924	
Glu Phe Thr Val Arg Arg Ile Lys Gly Met Arg Ala Asp Val Glu Gln				
115	120	125		
atc gtg cac ggc ttc ctg gac gag atg atc gca ggc ggc ccg ccc gcc			972	20
Ile Val His Gly Phe Leu Asp Glu Met Ile Ala Gly Gly Pro Pro Ala				
130	135	140		
gac ctg gtc agc cag ttc gcg ctg ccc gtc ccg tcc ctg gtg atc tgc			1020	
Asp Leu Val Ser Gln Phe Ala Leu Pro Val Pro Ser Leu Val Ile Cys				
145	150	155		
cgt ctg ctc ggt gtg ccc tac gcg gac cac gac ttc ttc cag gac gcc			1068	
Arg Leu Leu Gly Val Pro Tyr Ala Asp His Asp Phe Phe Gln Asp Ala				30
160	165	170	175	
agc gca cgg ctg atc cag tcc ccg gac gcg gcg ggt gcg cgt gcc gcc			1116	
Ser Ala Arg Leu Ile Gln Ser Pro Asp Ala Ala Gly Ala Arg Ala Ala				
180	185	190		
cgg gac gac ctg gag agc tat ctg ggc gct ctg gtg gac agc ctg cga			1164	
Arg Asp Asp Leu Glu Ser Tyr Leu Gly Ala Leu Val Asp Ser Leu Arg				
195	200	205		40
ggc gag tcc cgg ccg ggc ctg ctg agc acg ctc gtc agg gag cag ctg			1212	





ctc acg gcg ctg ttc gag cgg ctg ccc ggt ctg cgg ctg gcg gtg ccg	1692	
Leu Thr Ala Leu Phe Glu Arg Leu Pro Gly Leu Arg Leu Ala Val Pro		
370 375 380		
gtg gac egg ctg acc ctg cgc ccg ggc acg acg atc cag ggc gtg aac	1740	
Val Asp Arg Leu Thr Leu Arg Pro Gly Thr Thr Ile Gln Gly Val Asn		
385 390 395		
gaa ctc ccg gtc acc tgg tgaccgcggc gaaaggagca gcc atg cgt gtg acg	1793	10
Glu Leu Pro Val Thr Trp Met Arg Val Thr		
400 405		
gcc gac cgg gag gtc tgc gtg gga gcg ggc ctg tgc gcc ttg acg gcg	1841	
Ala Asp Arg Glu Val Cys Val Gly Ala Gly Leu Cys Ala Leu Thr Ala		
410 415 420 425		
ccg gag gtc ttc gac cag gac gac gac ggt gtg gtg acg gtg ctg gcc	1889	
Pro Glu Val Phe Asp Gln Asp Asp Asp Gly Val Val Thr Val Leu Ala		20
430 435 440		
gcg gaa ccc ggc gag gcc ggc cgt gcg gcg gca ctc gaa gcc ggc gtg	1937	
Ala Glu Pro Gly Glu Ala Gly Arg Ala Ala Ala Leu Glu Ala Gly Val		
445 450 455		
ctg tgc ccg tcc ggc gcg gta cgc gtc gtc gag taggggccgt gcggggccgt	1990	
Leu Cys Pro Ser Gly Ala Val Arg Val Val Glu		30
460 465		
ga	1992	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

40

&lt;220&gt;

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FDR1-1F Primer

10

<400> 3

gccatatgac tagtgcgcct cacagactgg aacgggaatc tcatg

45

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FDR1-2R Primer

<400> 4

gcgaattctg tcggtcaggc ctggtctccc gtcggccg

38

40

<210> 5

&lt;211&gt; 1439

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptomyces coelicolor A3(2)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (118)..(1377)

10

&lt;400&gt; 5

gatcacgggg gccgggtagg cccgtgccac ggtgtcaciaa cgcgtgtcgt cgcccgggtct 60

gaaggatgac cggaccactc ggtccgtgtg cgctcacag actggaacgg gaatctc atg 120

Met

1

ccg cgt gcg aag acg ttc gtg atc gtc ggg ggc ggc ctg gcc gcc ggc 168 20

Pro Arg Ala Lys Thr Phe Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ala Ala Gly

5

10

15

aag gcc gcg gag gaa ctg cgc gag cac ggc cac gac ggg ccg ctt ctc 216

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

20

25

30

gtg atc ggg gac gag cgg gaa cga ccg tac atc egg ccg ccg ctg tcc 264

Val Ile Gly Asp Glu Arg Glu Arg Pro Tyr Ile Arg Pro Pro Leu Ser

35

40

45

aag ggg tac ctg ctg ggc aag gag gac cgc gag tcc atc cac gtg cac 312

Lys Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Glu Asp Arg Glu Ser Ile His Val His

50

55

60

65

ccc gag agc tgg tac cgg gag cac gac gtc gat ctg ctc ctc ggc acg 360

Pro Glu Ser Trp Tyr Arg Glu His Asp Val Asp Leu Leu Leu Gly Thr

70

75

80

agc gtg acg tcc gtc gac gcg cgt ggc cgg gcg gtg acg ctg gac gac 408

40

Ser Val Thr Ser Val Asp Ala Arg Gly Arg Ala Val Thr Leu Asp Asp			
85	90	95	
ggc cgt cgc gtg ccc tac gcc ggt ctg ctg ctg gcc acc ggt tcc tcg			456
Gly Arg Arg Val Pro Tyr Ala Gly Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ser Ser			
100	105	110	
ccg cgc cgc ctg tcg gtg ccg ggc gcg gac ctg gag ggc gtg ctg tac			504
Pro Arg Arg Leu Ser Val Pro Gly Ala Asp Leu Glu Gly Val Leu Tyr			10
115	120	125	
ctg cgg cgc gtg ggc gac agc gag cgc ctc aag gag gcg ttc acc gaa			552
Leu Arg Arg Val Gly Asp Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala Phe Thr Glu			
130	135	140	145
gga gcc cgg atc gtg gtg gtc ggc ggc ggc tgg atc ggg ctg gag acg			600
Gly Ala Arg Ile Val Val Val Gly Gly Gly Trp Ile Gly Leu Glu Thr			
150	155	160	20
gcg gcg gcg gcc cgg gcg gcc ggc gcg gag gtg acc gtg ctg gag cgc			648
Ala Ala Ala Ala Arg Ala Ala Gly Ala Glu Val Thr Val Leu Glu Arg			
165	170	175	
ggt gag ctg ccc ctg ctg aag gtc ctg ggc cgc gag gcg gcc gag gtc			696
Gly Glu Leu Pro Leu Leu Lys Val Leu Gly Arg Glu Ala Ala Glu Val			
180	185	190	
ttc gcc ggt ctg cac cgg gac cac ggt gtg gac ctg cgt ccc cat gcc			744
Phe Ala Gly Leu His Arg Asp His Gly Val Asp Leu Arg Pro His Ala			30
195	200	205	
cgg atc gag gcc gtc acc ggc acc ggg ggc cgc gtc gac ggg gtc cgg			792
Arg Ile Glu Ala Val Thr Gly Thr Gly Gly Arg Val Asp Gly Val Arg			
210	215	220	225
ctc gcc gac ggc acc cac ctg ccc gcg gac gcc gtg gtc gtg ggg gtg			840
Leu Ala Asp Gly Thr His Leu Pro Ala Asp Ala Val Val Val Gly Val			40
230	235	240	

ggc atc acg ccc aac gtc cgc ctg gcc gag gag gcg ggc ctc gac gtg	888	
Gly Ile Thr Pro Asn Val Arg Leu Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asp Val		
245 250 255		
cgc aac ggc atc gtg acg gac gcc cgt ctg cgg acc tcc gcc gcc ggg	936	
Arg Asn Gly Ile Val Thr Asp Ala Arg Leu Arg Thr Ser Ala Ala Gly		
260 265 270		
gtc cac gcc gcc ggt gac gtc gcc aac gcc tac cac ccc cgg ctc ggc	984	10
Val His Ala Ala Gly Asp Val Ala Asn Ala Tyr His Pro Arg Leu Gly		
275 280 285		
cgg cac ctg cgc gtg gag cac tgg gcc aac gcg ctg cac cag ccc cgt	1032	
Arg His Leu Arg Val Glu His Trp Ala Asn Ala Leu His Gln Pro Arg		
290 295 300 305		
acc gcc gcg ctg agc atg ctc ggc cag gac gcg gtg tac gac cgg ctg	1080	
Thr Ala Ala Leu Ser Met Leu Gly Gln Asp Ala Val Tyr Asp Arg Leu		20
310 315 320		
ccg tac ttc tac acc gac cag tac gac ctc ggc atg gag tac acc ggg	1128	
Pro Tyr Phe Tyr Thr Asp Gln Tyr Asp Leu Gly Met Glu Tyr Thr Gly		
325 330 335		
tac gcc gaa ccg ggc ggc tac gac cgc gtc gtc ttc cgc ggg tcg cgc	1176	
Tyr Ala Glu Pro Gly Gly Tyr Asp Arg Val Val Phe Arg Gly Ser Arg		30
340 345 350		
gag gag cgg cgg ttc ctg gcg ttc tgg atg tcc ggc gac cgg gtg ctg	1224	
Glu Glu Arg Arg Phe Leu Ala Phe Trp Met Ser Gly Asp Arg Val Leu		
355 360 365		
gcg ggg atg agc gtc aac ctg tgg gac gtg atc ggg acg atc cgc gcc	1272	
Ala Gly Met Ser Val Asn Leu Trp Asp Val Ile Gly Thr Ile Arg Ala		
370 375 380 385		
ctg atc gag tcg ggc gcg gag acg gac gac gcc gcc ctg gcc gac ccc	1320	40
Leu Ile Glu Ser Gly Ala Glu Thr Asp Asp Ala Ala Leu Ala Asp Pro		

390 395 400  
 tcg gtc ccg ctg gag agc ctg ctt ccc ccg cac gcg cgg ccg acg gga 1368  
 Ser Val Pro Leu Glu Ser Leu Leu Pro Pro His Ala Arg Pro Thr Gly

405 410 415  
 gac cag gcg tga ccgacagcgc tcccgcgccg ctgcgctcga tgccggacga 1420  
 Asp Gln Ala

420 10  
 ctggcggcgg gccctggcc 1439

<210> 6

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FDR2-3F Primer

30

<400> 6

cgactagtga cgaggaggca gacaaatggt cgacgcggat cag 43

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FDR2-4R Primer

<400> 7

cgggatccga caactatgcg acgaggcttt cgaggg

36

20

<210> 8

<211> 1319

<212> DNA

<213> Streptomyces coelicolor A3(2)

30

<220>

<221> CDS

<222> (34)..(1296)

<400> 8

cacgtggcgg caccctgacg aggaggcaga caa gtg gtc gac gcg gat

48

40

Met Val Asp Ala Asp

1

5

cag aca ttc gtc atc gtc gga ggc ggc ctg gcg ggc gcg aaa gcg gcc

96

Gln Thr Phe Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ala Gly Ala Lys Ala Ala

	10	15	20		
	gag acg ctc cgc acg gag ggc ttc acc ggc cgg gtg atc ctc gtc tgc			144	
	Glu Thr Leu Arg Thr Glu Gly Phe Thr Gly Arg Val Ile Leu Val Cys				
	25	30	35		
	gac gaa cgc gac cac ccc tac gag cgc ccg ccg ctg tcc aag ggc tac			192	
	Asp Glu Arg Asp His Pro Tyr Glu Arg Pro Pro Leu Ser Lys Gly Tyr				
	40	45	50		10
	ctc ctg ggc aag gag gag cgc gac agc gtc ttc gtg cac gag ccc gcc			240	
	Leu Leu Gly Lys Glu Glu Arg Asp Ser Val Phe Val His Glu Pro Ala				
	55	60	65		
	tgg tac gcc cgg cac gac atc gag ctg cac ctc ggc cag acc gtc gtc			288	
	Trp Tyr Ala Arg His Asp Ile Glu Leu His Leu Gly Gln Thr Val Val				
	70	75	80	85	
	gcg atc gac cgc gcc gcc aag acc gtc cac tac ggc gac gac ggc acc			336	20
	Ala Ile Asp Arg Ala Ala Lys Thr Val His Tyr Gly Asp Asp Gly Thr				
	90	95	100		
	cac gtc agc tac gac aag ctg ctc atc gcg acc ggc gcc gag ccc cgc			384	
	His Val Ser Tyr Asp Lys Leu Leu Ile Ala Thr Gly Ala Glu Pro Arg				
	105	110	105		
	cgc ctg gac gtc ccc ggc acc ggc ctc gcg ggc gtc cac cac ctg cgc			432	
	Arg Leu Asp Val Pro Gly Thr Gly Leu Ala Gly Val His His Leu Arg				30
	110	115	120		
	cgc ctg gcg cac gcc gag cgc ctc aag ggc gtc ctc gcc acc ctc ggc			480	
	Arg Leu Ala His Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Leu Ala Thr Leu Gly				
	125	130	135		
	cgg gac aac gga cac ctg gtg atc gcc ggc gcg ggc tgg atc ggc ctg			528	
	Arg Asp Asn Gly His Leu Val Ile Ala Gly Ala Gly Trp Ile Gly Leu				40
	140	145	150	155	
	gag gtc gcg gcc gcg gcc cgc gag tac ggt gcg gag gtc acc gtc atc			576	



Glu Val Ala Ala Ala Ala Arg Glu Tyr Gly Ala Glu Val Thr Val Ile			
160	165	170	
gag ccc gcc ccg acc ccg ctg cac ggc gtc ctc ggt ccc gag ctg ggc		624	
Glu Pro Ala Pro Thr Pro Leu His Gly Val Leu Gly Pro Glu Leu Gly			
175	180	185	
gcc gtc ttc gcc gag ctg cac gag tcg cgc ggc gtc cgc ttc cgc ttc		672	
Ala Val Phe Ala Glu Leu His Glu Ser Arg Gly Val Arg Phe Arg Phe		10	
190	195	200	
ggc gtg aag ctg acc gag atc gtc ggc cag gac ggt gtg gtg ctg gcc		720	
Gly Val Lys Leu Thr Glu Ile Val Gly Gln Asp Gly Val Val Leu Ala			
205	210	205	
gcc cgc acc gac gac ggc gag gag cac ccc gcg cac gac gtg ctc gcc		768	
Ala Arg Thr Asp Asp Gly Glu Glu His Pro Ala His Asp Val Leu Ala		20	
210	215	220	225
gcg atc ggc gcc gcc ccg cgc acc gcg ctc gcc cag gcg gcc ggg ttg		816	
Ala Ile Gly Ala Ala Pro Arg Thr Ala Leu Ala Gln Ala Ala Gly Leu			
330	335	340	
gag atc gcc gac cgc gcg cac ggc ggc ggc atc gtc gtc gac gac cac		864	
Glu Ile Ala Asp Arg Ala His Gly Gly Gly Ile Val Val Asp Asp His		30	
345	350	355	
ctg cgc acc tcc gac ccc gac atc ttc gcg gcc ggc gac gtg gcc tcc		912	
Leu Arg Thr Ser Asp Pro Asp Ile Phe Ala Ala Gly Asp Val Ala Ser			
360	365	370	
ttc cac cac gcc ctc ttc gac acc agc ctg cgc gtg gag cac tgg gcc		960	
Phe His His Ala Leu Phe Asp Thr Ser Leu Arg Val Glu His Trp Ala		40	
375	380	385	
aac gcc ctg aac ggc ggt ccg gcc gcc gcc cgc gcg atg ctc ggc agg		1008	
Asn Ala Leu Asn Gly Gly Pro Ala Ala Ala Arg Ala MET Leu Gly Arg			
390	395	400	405

ggc ctc gcc cac gac cgc gtg ccc tac ttc ttc acc gac cag tac gac	1056	
Gly Leu Ala His Asp Arg Val Pro Tyr Phe Phe Thr Asp Gln Tyr Asp		
410 415 420		
ctg ggc atg gag tac tcc ggc tgg gcg ccg gcc ggc tcg tac gac cag	1104	
Leu Gly MET Glu Tyr Ser Gly Trp Ala Pro Ala Gly Ser Tyr Asp Gln		
425 430 435		
gtg gtg atc cgc ggg gac gcg gcg aag cgc gag ttc atc gcc ttc tgg	1152	10
Val Val Ile Arg Gly Asp Ala Ala Lys Arg Glu Phe Ile Ala Phe Trp		
440 445 450		
gtg aag gag ggc cgg gtg ctg gcc ggg atg aac gtc aac gtg tgg gac	1200	
Val Lys Glu Gly Arg Val Leu Ala Gly MET Asn Val Asn Val Trp Asp		
455 460 465		
gtc acg gag ccg atc cag cag ctg atc cgc tcg aag acc cgg gtg gac	1248	20
Val Thr Glu Pro Ile Gln Gln Leu Ile Arg Ser Lys Thr Arg Val Asp		
470 475 480 485		
acg gag gac ctg gcg aac ccg cac gta tcc ctc gaa agc ctc gtc gca	1296	
Thr Glu Asp Leu Ala Asn Pro His Val Ser Leu Glu Ser Leu Val Ala		
490 505 510		
tagttgtcgg tccgcccccg tag	1319	30

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; STRANDNESS:single

&lt;220&gt;

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PRR-1F Primer

<400> 9

gccccccata tgaacgcaaa cgacaacgtg gtcac

36

10

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PRR-2R Primer

30

<400> 10

gcggatcctc aggcactact cagttcaget ttggc

35

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Mox-1F Primer

10

<400> 11

gccccccata tgacgaagaa cgtcgccgac gaactg

36

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> STRANDNESS:single

30

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Mox-12R Primer

40

<400> 12

gcagatctag tggcttcagg cgtcccgcag gatgg

35

<210> 13  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> STRANDNESS:single 10

<220>  
<223> TOPOLOGY:linear

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Mox-2R Primer 20

<400> 13  
cgactagtgg cttcaggcgt cccgcaggat gg 32

<210> 14  
<211> 24 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> STRANDNESS:single 40

<220>  
<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Mox-3F Primer

<400> 14

ggagatatac atatgacgaa gaac

24

<210> 15

10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

20

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Mox-5R Primer

<400> 15

30

gcccccata tgacgcactc ctagtggtt caggogtccc g

41

<210> 16

<211> 1950

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida ATCC17453

40

<220>

<221> CDS

<222> (115)..(1380)

<220>

<221> CDS

<222> (1439)..(1759)

10

<400> 16

ccgggtgccc agattcagca caagagcggc atcgtcagcg gcgtcaggc actccctctg 60

gtctgggata cggcgactac caaagcggta taaacacatg ggagtgcgtg ctaa gtc aac 120

Met Asn

1

gca aac gac aac gtc gtc atc gtc ggt acc gga ctg gct ggc gtt gag 168

Ala Asn Asp Asn Val Val Ile Val Gly Thr Gly Leu Ala Gly Val Glu 20

5

10

15

gtc gcc ttc ggc ctg cgc gcc agc ggc tgg gaa ggc aat atc cgg ttg 216

Val Ala Phe Gly Leu Arg Ala Ser Gly Trp Glu Gly Asn Ile Arg Leu

20

25

30

gtg ggg gat gcg acg gta att ccc cat cac cta cca ccg cta tcc aaa 264

Val Gly Asp Ala Thr Val Ile Pro His His Leu Pro Pro Leu Ser Lys

35

40

45

50

30

gct tac ttg gcc ggc aaa gcc aca gcg gaa agc ctg tac ctg aga acc 312

Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Ala Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Leu Arg Thr

55

60

65

cca gat gcc tat gca gcg cag aac atc caa cta ctc gga ggc aca cag 360

Pro Asp Ala Tyr Ala Ala Gln Asn Ile Gln Leu Leu Gly Gly Thr Gln

70

75

80

gta acg gct atc aac cgc gac cga cag caa gta atc cta tcg gat ggc 408

40

Val Thr Ala Ile Asn Arg Asp Arg Gln Gln Val Ile Leu Ser Asp Gly

85	90	95		
cgg gca ctg gat tac gac cgg ctg gta ttg gct acc gga ggg cgt cca			456	
Arg Ala Leu Asp Tyr Asp Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Gly Arg Pro				
100	105	110		
aga ccc cta ccg gtg gcc agt ggc gca gtt gga aag gcg aac aac ttt			504	
Arg Pro Leu Pro Val Ala Ser Gly Ala Val Gly Lys Ala Asn Asn Phe				
115	120	125		10
cga tac ctg cgc aca ctc gag gac gcc gag tgc att cgc cgg cag ctg			552	
Arg Tyr Leu Arg Thr Leu Glu Asp Ala Glu Cys Ile Arg Arg Gln Leu				
	135	140		
att gcg gat aac cgt ctg gtg gtg att ggt ggc gcc tac att ggc ctt			600	
Ile Ala Asp Asn Arg Leu Val Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Leu				
	150	155		
gaa gtg gct gcc acc gcc atc aag gcg aac atg cac gtc acc ctg ctt			648	20
Glu Val Ala Ala Thr Ala Ile Lys Ala Asn Met His Val Thr Leu Leu				
	165	170		
gat acg gca gcc cgg gtt ctg gag cgg gtt acc gcc ccg ccg gta tcg			696	
Asp Thr Ala Ala Arg Val Leu Glu Arg Val Thr Ala Pro Pro Val Ser				
180	185	190		
gcc ttt tac gag cac cta cac cgc gaa gcc ggc gtt gac ata cga acc			744	
Ala Phe Tyr Glu His Leu His Arg Glu Ala Gly Val Asp Ile Arg Thr				30
195	200	205		
ggc acg cag gtg tgc ggg ttc gag atg tcg acc gac caa cag aag gtt			792	
Gly Thr Gln Val Cys Gly Phe Glu Met Ser Thr Asp Gln Gln Lys Val				
	215	220		
acc gcc gtc ctc tgc gag gac ggc aca agg ctg cca gcg gat ctg gta			840	
Thr Ala Val Leu Cys Glu Asp Gly Thr Arg Leu Pro Ala Asp Leu Val				40
	230	235		
atc gcc ggg att ggc ctg ata cca aac tgc gag ttg gcc agt gcg gcc			888	



Ile Ala Gly Ile Gly Leu Ile Pro Asn Cys Glu Leu Ala Ser Ala Ala		
245	250	255
ggc ctg cag gtt gat aac ggc atc gtg atc aac gaa cac atg cag acc		936
Gly Leu Gln Val Asp Asn Gly Ile Val Ile Asn Glu His Met Gln Thr		
260	265	270
tct gat ccc ttg atc atg gcc gtc ggc gac tgt gcc cga ttt cac agt		984
Ser Asp Pro Leu Ile Met Ala Val Gly Asp Cys Ala Arg Phe His Ser		10
275	280	285
cag ctc tat gac cgc tgg gtg cgt atc gaa tcg gtg ccc aat gcc ttg		1032
Gln Leu Tyr Asp Arg Trp Val Arg Ile Glu Ser Val Pro Asn Ala Leu		
295	300	305
gag cag gca cga aag atc gcc gcc atc ctc tgt ggc aag gtg cca cgc		1080
Glu Gln Ala Arg Lys Ile Ala Ala Ile Leu Cys Gly Lys Val Pro Arg		
310	315	320
gat gag gcg gcg ccc tgg ttc tgg tcc gat cag tat gag atc gga ttg		1128
Asp Glu Ala Ala Pro Trp Phe Trp Ser Asp Gln Tyr Glu Ile Gly Leu		
325	330	335
aag atg gtc gga ctg tcc gaa ggg tac gac cgg atc att gtc cgc ggc		1176
Lys Met Val Gly Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Arg Ile Ile Val Arg Gly		
340	345	350
tct ttg gcg caa ccc gac ttc agc gtt ttc tac ctg cag gga gac cgg		1224
Ser Leu Ala Gln Pro Asp Phe Ser Val Phe Tyr Leu Gln Gly Asp Arg		
355	360	365
gta ttg gcg gtc gat aca gtg aac cgt cca gtg gag ttc aac cag tca		1272
Val Leu Ala Val Asp Thr Val Asn Arg Pro Val Glu Phe Asn Gln Ser		
375	380	385
aaa caa ata atc acg gat cgt ttg ccg gtt gaa cca aac cta ctc ggt		1320
Lys Gln Ile Ile Thr Asp Arg Leu Pro Val Glu Pro Asn Leu Leu Gly		40
390	395	400

gac gaa agc gtg ccg tta aag gaa atc atc gcc gcc gcc aaa gct gaa	1368	
Asp Glu Ser Val Pro Leu Lys Glu Ile Ile Ala Ala Ala Lys Ala Glu		
405 410 415		
ctg agt agt gcc tgaatctat acccacaata aatcaccggtt ttgccccata	1420	
Leu Ser Ser Ala		
420		
gcgtgtgagg ataaacag atg tct aaa gta gtg tat gtg tca cat gat	1468	10
Met Ser Lys Val Val Tyr Val Ser His Asp		
425 430		
gga acg cgt cgc gaa ctg gat gtg gcg gat ggc gtc agc ctg atg cag	1516	
Gly Thr Arg Arg Glu Leu Asp Val Ala Asp Gly Val Ser Leu Met Gln		
435 440 445		
gct gca gtc tcc aat ggt atc tac gat att gtc ggt gat tgt ggc ggc	1564	
Ala Ala Val Ser Asn Gly Ile Tyr Asp Ile Val Gly Asp Cys Gly Gly		20
450 455 460		
agc gcc agc tgt gcc acc tgc cat gtc tat gtg aac gaa gcg ttc acg	1612	
Ser Ala Ser Cys Ala Thr Cys His Val Tyr Val Asn Glu Ala Phe Thr		
465 470 475 480		
gac aag gtg ccc gcc gcc aac gag cgg gaa atc ggc atg ctg gag tgc	1660	
Asp Lys Val Pro Ala Ala Asn Glu Arg Glu Ile Gly Met Leu Glu Cys		
485 490 495		30
gtc acg gcc gaa ctg aag ccg aac agc agg ctc tgc tgc cag atc atc	1708	
Val Thr Ala Glu Leu Lys Pro Asn Ser Arg Leu Cys Cys Gln Ile Ile		
500 505 510		
atg acg ccc gag ctg gat ggc atc gtg gtc gat gtt ccc gat agg caa	1756	
Met Thr Pro Glu Leu Asp Gly Ile Val Val Asp Val Pro Asp Arg Gln		
515 520 525		
tgg taaaccacaa tggtaaacca ctgcgagcca aaacagccga gcaggagcgc	1809	40
Trp		

agtccggcaa caccttatta agcacatgcc gaaccctatt tgcagcgctt catgcctgca 1869  
 aagtcccgat tgatgaaatc cgggctccaa gcaaggagcc cggaatctct caccgccacg 1929  
 aaatcaatgg ccaatcccgg g 1950

<210> 17

<211> 27

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

20

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP-1

<400> 17

30

tatgcgtcac tagtcgggag tgcgtta

27

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP-2

<400> 18

tataacgcac tcccgactag tgacgca

10

27

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CB-4F Primer

<400> 19

gccccccata tgacagcttt gaatctgatg

30

40

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CB-5R Primer

<400> 20

gcactagtca gagacggacc ggcagac

27

20

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:154A1-1F

<400> 21

gccccccata tggcgaccca gcagcccgcc etc

33

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> STRANDNESS:single

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:154A1-2R Primer

<400> 22

gcactagtca gccggcgtgc agcaggaccg g

31

30

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> STRANDNESS:single

40

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DoxA-1F Primer

<400> 23

gccccccata tggccgctga cccgttcgcg tg

32

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> STRANDNESS:single

20

<220>

<223> TOPOLOGY:linear

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DoxA-2R Primer

30

<400> 24

gcactagtca gcgagccag acgggcagtt c

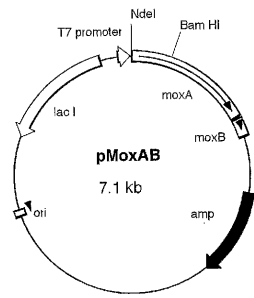
31

【図面の簡単な説明】

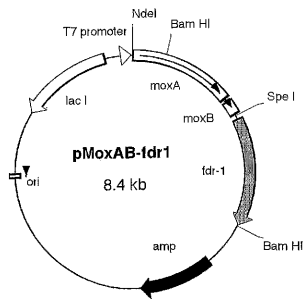
- 図 1 は、プラスミド p M o x A B の構造図である。
- 図 2 は、プラスミド p M o x A B - f d r 1 の構造図である。
- 図 3 は、プラスミド p M o x A B - f d r 2 の構造図である。
- 図 4 は、プラスミド p M o x A B - c a m A B の構造図である。
- 図 5 は、プラスミド p T 7 N S - c a m A B の構造図である。
- 図 6 は、プラスミド p C B M - c a m A B の構造図である。
- 図 7 は、プラスミド p S C 1 5 4 A 1 - c a m A B の構造図である。
- 図 8 は、プラスミド p D o x A 1 - c a m A B の構造図である。

40

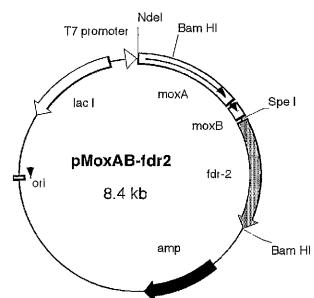
【 図 1 】  
Fig. 1



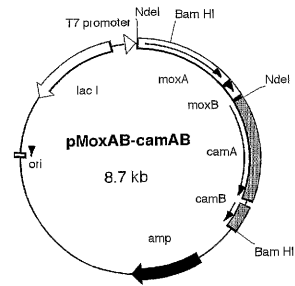
【 図 2 】  
Fig. 2



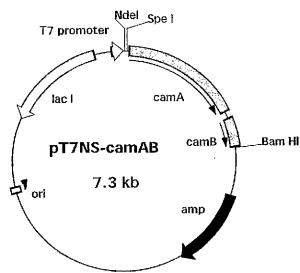
【 図 3 】  
Fig. 3



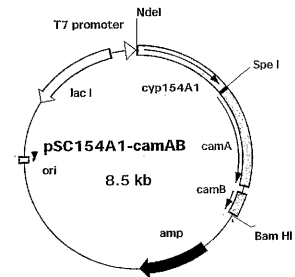
【 図 4 】  
Fig. 4



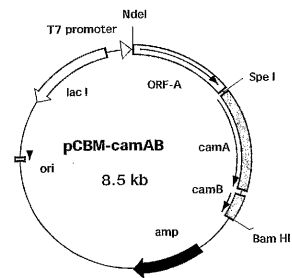
【 図 5 】  
Fig. 5



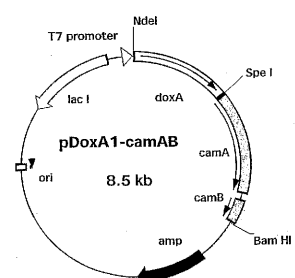
【 図 7 】  
Fig. 7



【 図 6 】  
Fig. 6



【 図 8 】  
Fig. 8





---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平07-067666(JP,A)  
特表平07-502650(JP,A)  
J. Biol. Chem., 1990年, Vol.265, No.11, p.6066-6073

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90  
C12N 1/00 9/99  
C12P 1/00-41/00  
C07K 14/00-19/00  
C12Q 1/00-70  
G01N 33/00-98  
A61K 31/00-48/00  
A61P 1/00-43/00  
PubMed、MEDLINE(STN)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq