(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3850557号

(P3850557)

(45)発行日　平成18年11月29日(2006.11.29)　(24)登録日　平成18年9月8日(2006.9.8)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02	
C12P 17/06	(2006.01)	C12P	17/06	
C12R 1/01	(2006.01)	C12R	1:01	

請求項の数 7　(全 24 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平10-203200
(22)出願日　平成10年7月17日(1998.7.17)
(65)公開番号　特開2000-32988(P2000-32988A)
(43)公開日　平成12年2月2日(2000.2.2)
審査請求日　平成15年11月28日(2003.11.28)

微生物の受託番号　FERM　BP-6748

(73)特許権者　000130189
株式会社コスモ総合研究所
東京都港区芝浦四丁目９番２５号
(73)特許権者　000105567
コスモ石油株式会社
東京都港区芝浦１丁目１番１号
(74)代理人　110000084
特許業務法人アルガ特許事務所
(74)代理人　100068700
弁理士　有賀　三幸
(74)代理人　100077562
弁理士　高野　登志雄
(74)代理人　100096736
弁理士　中嶋　俊夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規遺伝子及びその遺伝子を保有する形質転換細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号１又は３で示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ。

【請求項２】

配列番号１又は３で示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項３】

配列番号２又は４で示される塩基配列又は当該塩基配列の１若しくは２以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、又はこれらに相補的な塩基配列からなるものである請求項２記載の遺伝子。

【請求項４】

請求項２又は３記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項５】

請求項２又は３記載の遺伝子を保有する形質転換体細胞。

【請求項６】

請求項５記載の形質転換体細胞を培養し、該培養物からα－ヒドロキシ－γ－カルボキ

シムコン酸－ε－セミアルデヒド デヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする該酵素の製造法。

【請求項７】

α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドの存在下に、請求項５記載の形質転換体細胞を培養することを特徴とする２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明はα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドを２－ピロン－４，６－ジカルボン酸に変換する酵素であるα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター及び該遺伝子を保有する形質転換体細胞、並びに該形質転換体細胞を用いた当該酵素及び２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の製造法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼは、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドを２－ピロン－４，６－ジカルボン酸に変換する酵素であり、ポリマーの原料として用いられる２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の生産に重要な役割を果たしている。従って、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を見出し、該遺伝子にコードされるα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼを量産することは２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の生産に極めて重要である。

【０００３】

一方、酵素などのタンパク質の量産技術として組換えＤＮＡ技術の発展は近年めざましく、数多くの酵素、生理活性タンパク質等について組換えＤＮＡ技術を利用した量産化に成功している。しかしながら、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼに関しては、該酵素をコードする遺伝子は分離されていなかった。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、組換えＤＮＡ技術により、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子を分離して、該遺伝子がコードするα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を増強することにより２－ピロン－４，６－ジカルボン酸を量産する技術を提供することにある。

【０００５】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の微生物生産について鋭意研究を行った結果、組換えＤＮＡ技術を利用してα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドを２－ピロン－４，６－ジカルボン酸に変換するα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼを有する微生物より、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子を単離し、その塩基配列を明らかにすることに成功した。また、該遺伝子の組換えベクター及び遺伝子を保有する形質転換体細胞を作製し、当該酵素及び２－ピロン－４，６－ジカルボン酸を製造する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【０００６】

すなわち、本発明は配列番号１又は３で示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ、その遺

伝子、当該遺伝子を含有する組換えベクター及び当該遺伝子を保有する形質転換体細胞を提供するものである。

【０００７】

更に本発明は、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドの存在下に当該形質転換体細胞を培養することを特徴とする２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の製造法を提供するものである。

【０００８】

また、本発明は当該形質転換体細胞を培養し、該培養物からα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする当該酵素の製造法を提供するものである。

【０００９】

【発明の実施の形態】

本発明の遺伝子の分離手段は特に制限されないが、例えば微生物の宿主ベクター系を用いることができる。該遺伝子は、例えば組換えＤＮＡ技術を利用して次の如くして製造される。即ち、まずＤＮＡ供与体としてα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドを２－ピロン－４，６－ジカルボン酸に変換する能力を有する微生物を用い、該微生物からゲノムＤＮＡを抽出し、制限酵素などにより切断しＤＮＡ断片とする。一方、ファージ、プラスミド等のベクターＤＮＡを制限酵素等を用いて、ゲノムＤＮＡ断片が挿入可能な制限酵素末端を作製する。これらゲノムＤＮＡ断片と直鎖状にしたベクターＤＮＡをＤＮＡリガーゼを用いて結合させて、組換えベクターを得る。該組換えベクターを宿主細胞に移入し、目的の組換えベクターを保有する形質転換体細胞を選択し、該形質転換体細胞より目的の組換えベクターを分離することにより製造される。

【００１０】

本発明のＤＮＡ供与体としては、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドを２－ピロン－４，６－ジカルボン酸に変換する能力を有する微生物であれば特に制限されない。例えば、スフィンゴモナス属の微生物等が挙げられるが、特にスフィンゴモナス エスピーCR-0300100株やその変異株であるスフィンゴモナス エスピーCR-0310201株(FERM BP-6748)が好ましい。

【００１１】

該微生物からのゲノムＤＮＡの抽出は、該微生物の培養菌体を集菌し、例えばプロテアーゼＫにて菌体を溶菌した後、フェノール抽出による除タンパク質処理、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコールによるゲノムＤＮＡの沈澱、遠心分離などの方法を適宜組み合わせて行うのが好ましい。

【００１２】

分離されたゲノムＤＮＡを断片化するには、例えば該ゲノムＤＮＡの制限酵素の消化により行われる。

【００１３】

ベクターとしては、宿主微生物内で自立的に増殖し得るファージ又はプラスミドから組換えベクターを目的として構築されたものを用いるのが好ましい。プラスミドとしては、例えば大腸菌を宿主とするｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＵＣ１１８、ｐＵＣ１１９、ブルースクリプト、ｐＫＫ２２３－３、ｐＡＣＹＣ１７７、ＲＳＦ１０１０、ｐＫＴ２３０等が好ましい。これらのベクターは、例えば制限酵素を用いてＤＮＡ断片が挿入可能な制限酵素末端を作製し、必要に応じてその末端を脱リン酸処理した後に用いられる。

【００１４】

ゲノムＤＮＡ断片とベクターＤＮＡ断片の結合は、公知のＤＮＡリガーゼ、例えばＴ４ＤＮＡリガーゼ等を用いて行うのが好ましい。

【００１５】

得られた組換えベクターを移入させる宿主微生物としては、該組換えベクターが安定にかつ自立的に複製可能で、かつ外来性の遺伝子の形質が安定的に発現するものであれば良い

が、例えば大腸菌やシュードモナス　プチダを用いることができる。

【００１６】

宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば接合法、エレクトロポレーション法、コンピテントセル法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等のいずれの方法も用いることができる。

【００１７】

形質転換体の選択は、用いたベクターの選択マーカー、例えば形質転換体のＤＮＡ組換えにより獲得する薬剤耐性を指標とすることができる。これら形質転換体の中から目的の組換えベクターを含有する形質転換体の選択は、例えば遺伝子の部分的なＤＮＡ断片をプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーション法により行うのが好ましい。このプローブの標識としては、例えば放射性同位元素、ジゴキシゲニン、酵素等のいずれも用いることができる。

【００１８】

このようにして選択された形質転換体細胞から組換えベクターを抽出するには、常法により抽出すれば良く、例えばアルカリ溶菌法（Ｃｏｌｄ　ＳｐｒｉｎｇＨａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，　ＭｏｌｅｃｕｌａｒＣｌｏｎｉｎｇ　Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９））を用いることができる。

【００１９】

抽出される組換えベクターは、必要に応じて再び組換えＤＮＡ技術を利用して組換えることができる。得られる組換えベクターから、本発明の遺伝子を切り出すには、制限酵素などを用いることができる。

【００２０】

かくして得られる本発明遺伝子の塩基配列は、例えばダイデオキシ法で解読し、決定することができる。配列番号２及び４にα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の塩基配列を、配列番号１及び３に当該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、配列番号５に後記実施例で分離したＤＮＡ断片の塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す。

【００２１】

配列番号１は配列番号３の部分アミノ酸配列である。本発明により生産される酵素は、配列番号３のアミノ酸配列を有する酵素であっても、配列番号１のアミノ酸配列を有する酵素であっても同等の酵素活性を有する。また、配列番号１又は３記載のアミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子であっても、コードするポリペプチドがα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性を有する限り、本発明に包含される。

【００２２】

同様に配列番号２は配列番号４の部分塩基配列である。そして、また配列番号２又は４記載の塩基配列の１若しくは２以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であっても、本発明に包含される。

【００２３】

本発明遺伝子を発現させ、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼを生産するには、本発明遺伝子を保有する形質転換体細胞、例えば上記形質転換体細胞、本発明の遺伝子を強力なプロモーターを有する発現ベクターに組み込んだ組換えベクターの形質転換体細胞、本発明の遺伝子を細胞内でのコピー数の高いベクターに組み込んだ組換えベクターの形質転換体細胞、又は本発明の遺伝子を強力なプロモーターを有するコピー数の高い発現ベクターに組み込んだ組換えベクターの形質転換体細胞を培養し、その培養物から採取すればよい。この場合における培養は、用いる形質転換体細胞の性質に応じて行われ、例えば、ｐＨ５～８、２０～３７℃で炭素源、窒素源、ビタミン等を含有する培地で行われる。

【００２４】

また、本願形質転換体細胞を培養すれば、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼが高発現するので、当該形質転換体細胞をα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドの存在下に培養すれば、２－ピロン－４，６－ジカルボン酸が効率良く生産できる。ここで、酵素の基質であるα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドは、培地中に添加してもよいが、形質転換体細胞が例えば３，４－ジヒドロキシ安息香酸をα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドに変換する酵素も産生する場合には、３，４－ジヒドロキシ安息香酸を培地中に添加すれば、培養によりα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドが生成し、次いで２－ピロン－４，６－ジカルボン酸が生成する。当該２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の生産の条件は、用いる形質転換体細胞の性質に応じて行われる。

【００２５】

また、培養物からの２－ピロン－３，４－ジカルボン酸の採取は、例えば有機溶媒による抽出等により行われる。

【００２６】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら制限されるものではない。

【００２７】

参考例１

（１）２１mm試験管に０．２％のシリンガ酸を含む表１の組成の培地を１０ml調製し、土壌サンプルを０．５ｇずつ入れ、３０℃で３日間培養した。

【００２８】

【表１】

培　地　組　成		ｓｓｓ組成	
KH_2PO_4	０．８５ｇ	MgO	１０．７５ｇ
Na_2HPO_4	４．９ｇ	$CaCO_3$	２．０ｇ
$(NH_4)_2SO_4$	０．５ｇ	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	４．５ｇ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	０．１ｇ	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	１．４４ｇ
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	０．００５ｇ	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	１．１２ｇ
sss(stock salt sol)	０．１ml／ℓ	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	０．２５ｇ
		$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	０．２８ｇ
		H_3BO_3	０．０６ｇ
		conc HCℓ	５１．３ml／ℓ

【００２９】

（２）次に、上記を約５分間静置し、僅かに濁った上清０．１mlを（１）と同じ組成の新しい試験管に植え継ぎ、３０℃で３日間培養した。

（３）上記操作を１～２回繰り返し、最後の上清を滅菌した蒸留水に適当に希釈し、０．２％のシリンガ酸を含む表１の組成の寒天培地に展開し、３０℃で３日間培養し、コロニーを形成させた。

（４）上記コロニーを０．２％のバニリン酸を含む表１の組成の寒天培地に爪楊枝を用い

て接種して、生育してくる菌株を得た。
（５）バニリン酸で生育した菌株を再び、０．２％のシリンガ酸を含む表１の組成の培地を１０mlに植菌して、３０℃で３日間培養した。培養液を滅菌した蒸留水に適当に希釈し、ＬＢ寒天培地に展開し、３０℃で１日間培養し、コロニーを形成させた。
（６）生じたコロニーを同じコロニーについて、０．２％のバニリン酸及びシリンガ酸を含む表１の組成の２種の寒天培地に爪楊枝を用いて接種して、生育してくる菌株を得た。
（７）バニリン酸及びシリンガ酸を含む２種の寒天培地でともに生育可能な菌株１株を得た。本菌株をＣＲ－０３００１００とし、菌学的性質を調べたところ、以下の通りであった。

【００３０】

ａ、形態的特徴

・細胞の大きさ形　　０．５×１．１～１．３μｍ　桿菌
・胞子の有無　　なし
・鞭毛　　極鞭毛
・運動性　　＋

【００３１】

ｂ、寒天培地における生育状況

・表１の培地において　　円形のコロニー、光沢があり、黄色

【００３２】

ｃ、生理学的性質

・グラム染色性	－	
・硝酸塩の還元	－	
・ゼラチン溶解性	＋弱い	
・Ｏ－Ｆテスト	Ｏ；＋，Ｆ；－	
・生育の範囲	pH５．０から７．５、１０℃から４０℃	
・炭素源の利用性	グルコース	＋
	シュークロース	＋
	ラクトース	－
	グリセロール	－
	スターチ	－
	バニリン	＋
	バニリン酸	＋
	シリンガアルデヒド	＋
	シリンガ酸	＋
・シトクロームオキシダーゼ	＋	
・カタラーゼ	＋	

【００３３】

ｄ、化学分類学的性質

・ＤＮＡのＧ／Ｃ含量（モル％）　６８
・キノンタイプ　Ｑ－１０
・色素　＋（疎水性yellow pigment）
・細胞壁脂質　スフィンゴ脂質

ｅ、その他の特性
・３，４－ジヒドロキシ安息香酸酸化酵素　メタ開裂
【００３４】
上記の性質から、ＣＲ－０３００１００株はスフィンゴモナス（Sphingomonas）属と同定した。
【００３５】
参考例２
（１）参考例１で得られたスフィンゴモナス　エスピー．ＣＲ－０３００１００を１００mlのＬＢ培地（トリプトン１０ｇ、酵母エキス５ｇ、塩化ナトリウム５ｇ、グルコース１ｇ／Ｌ）を用いて３０℃で２４時間振とう培養した。遠心にて菌体集菌後、Ｍａｒｍｕｒの方法（Ｍａｒｍｕｒ，Ｊ．１９６１．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３：２０８－２１８）で全ＤＮＡを抽出し、常法により精製した。
（２）（１）で得たスフィンゴモナス　エスピー　ＣＲ－０３００１００全ＤＮＡを制限酵素ＸｈｏＩ及びＳｐｈＩで完全分解し、制限酵素ＳａｌＩ及びＳｐｈＩで完全に消化したベクタープラスミドｐＵＣ１９と混合しＴ４ＤＮＡリガーゼで処理して、ハイブリッドプラスミドを形成させた。
（３）（２）で得たハイブリッドプラスミドを大腸菌ＨＢ１０１株に形質転換し、１００mg／Ｌのアンピシリンを含むＬＢ培地に、プレート１枚あたり２００～３００コロニーが出現するように塗布し、３７℃で１８時間培養した。
（４）上記で得られたコロニーを１００mg／Ｌのアンピシリンを含むＬＢ培地に、プレート１枚あたり９６個ずつ継代し、これをマスタープレートとした。この操作で合計２０００株のコロニーを得た。それぞれを１００mg／Ｌのアンピシリンを含むＬＢ培地を０．２ml調製した９６穴マイクロプレートに植菌した。３７℃でマイクロプレートシェーカーを用いて振とう培養した。
（５）１８時間培養後、それぞれのウェルに最終濃度が５０μｇ／mlとなるようにリゾチームを添加して、３７℃で２時間インキュベートした。次に３，４－ジヒドロキシ安息香酸の２０mM溶液を各ウェルに２μｌずつ添加し、３０℃で５分間インキュベートした。
（６）上記の処理を行った各ウェルに２Ｍの水酸化ナトリウムを１０μｌずつ添加したところ、２０００株中１株において黄色の発色が見られた。
（７）黄色の発色のあった株からプラスミドを抽出し、いくつかの制限酵素について切断パターンを調べ、このプラスミドをｐＰＸ１５０と名付けた。
【００３６】
参考例３
（１）ｐＰＸ１５０を制限酵素ＡｐａＩで切断し、セルフライゲーションしたプラスミドｐＰＸ１５１を作成した。このプラスミドで形質転換した大腸菌ＨＢ１０１株及びｐＰＸ１５０で形質転換した大腸菌ＨＢ１０１株を１００mg／Ｌのアンピシリンを含むＬＢ培地１０mlで１８時間培養し、集菌した。菌体を５０mMのリン酸緩衝液１mlに懸濁し、超音波破砕機を用いて細胞を破砕した。これを５０００ｇで２０分間遠心して得られた上清２０μｌを０．２mMの３，４－ジヒドロキシ安息香酸を含むリン酸緩衝液１mlに添加した。５分間、３０℃でインキュベーションした後に、２Ｍの水酸化ナトリウムを０．１ml添加したところ、ｐＰＸ１５０で形質転換した大腸菌ＨＢ１０１株では黄色の発色が見られたが、ｐＰＸ１５１で形質転換した大腸菌ＨＢ１０１株では黄色の発色が見られなかった。
（２）プラスミドｐＵＣ４Ｋ（ファルマシア　バイオテク社）を制限酵素ＥｃｏＲＩで消化し、ｂｌｕｎｔｉｎｇ　ｋｉｔ（宝酒造社）を用いて平滑化し、１％アガロースゲル電気泳動によって分離した。
（３）１．３ｋｂｐの断片を上記ゲルから切り出し、フェノール抽出を３度行い、エタノール沈殿によりＤＮＡを精製した。
（４）ｐＰＸ１５１を制限酵素ＡｐａＩで切断し、ｂｌｕｎｔｉｎｇ　ｋｉｔ（宝酒造社）を用いて平滑化した。これと上記（３）で得られたＤＮＡを混合してｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社）を用いて連結反応を行い、大腸菌ＨＢ１０１株に形質転換した。形

質転換した大腸菌ＨＢ１０１株は、カナマイシンとアンピシリンに対して耐性な菌株を選抜し、その株の保有するプラスミドとしてｐＰＸ１５２を得た。

【００３７】

参考例４

（１）前実験で得られたプラスミドｐＰＸ１５２を制限酵素ＸｂａＩで消化し、１％アガロース電気泳動にて分離し、２．３ｋｂｐの断片を切り出した。次に凍結融解法によりＤＮＡを抽出し、十分にフェノール抽出を行いエタノール沈殿により精製した。

（２）スフィンゴモナス エスピー ＣＲ－０３００１００株をＬＢ液体培地（ナリジキシン酸２５mg／Ｌを含む）５００mlで２８℃、２３時間培養し氷中で１５分冷却した。

（３）４℃、１０分、１００００rpm で遠心集菌し、５００mlの０℃蒸留水で穏和に洗浄後再び、遠心集菌した。続いて２５０mlの０℃蒸留水で穏和に洗浄後、遠心集菌した。更に、１２５mlの０℃蒸留水で穏和に洗浄後、遠心集菌した。

（４）上記の菌体を１０％グリセロールを含む蒸留水に懸濁し０℃にて保持した。

（５）（１）のＤＮＡ約０．０５μｇを含む蒸留水４μｌを０．２cmのキュベットに入れ、（４）のコンピテントセル４０μｌを加え、（２５μＦ、２５００Ｖ、１２msec）の条件でエレクトロポレーションにかけた。

（６）上記処理した細胞全量を１０mlのＬＢ液体培地に接種し、３０℃で６時間培養した。培養後、遠心によって菌体を集め２５mg／Ｌのカナマイシンを含むＬＢ平板に展開し、３０℃で４８時間培養した。

（７）上記の条件で非常に強いカナマイシン耐性株、１株を得た。本菌株をスフィンゴモナス エスピー ＣＲ－０３１０２０１株と名付けた。

（８）スフィンゴモナス エスピー ＣＲ－０３１０２０１株及びＣＲ－０３００１００株をＬＢ培地１０mlで２４時間培養し、集菌した。菌体を５０mMのリン酸緩衝液１mlに懸濁し、超音波破砕機を用いて細胞を破砕した。これを５０００ｇで２０分間遠心して得られた上清１００μｌを０．２mMの３，４－ジヒドロキシ安息香酸を含むリン酸緩衝液１mlに添加した。５分間、３０℃でインキュベーションした後に、２Ｍの水酸化ナトリウムを０．１ml添加したところ、ＣＲ－０３００１００株では黄色の発色が見られたが、ＣＲ－０３１０２０１株では黄色の発色が全く見られなかった。ＣＲ－０３１０２０１株は上述の性質及びカナマイシンに耐性及びバリニン酸の資化性が欠損したことを除きＣＲ－０３００１００株と全く同一の菌学的性質を示した。本菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業研究所にＦＥＲＭ ＢＰ－６７４８として寄託した。

【００３８】

実施例１（α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列解析）

ＬＢ液体培地でスフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株を、３０℃にて２４時間、好気的条件下で培養し、遠心分離にて集菌した。この集菌した菌株について１５０Ｗ、１０分間の超音波破砕機による細胞破砕処理を行った後、１００，０００ｇにて３０分間の遠心分離を行った。

【００３９】

その上清を硫安分画し、硫安濃度３０～７０重量％の分画を回収して、弱アニオンイオン交換クロマトグラフィー（パーセプティブ社、ＰＩ（ポリエチルイミン）カラム）、強アニオン交換クロマトグラフィー（パーセプティブ社、ＨＱ（第４級ポリエチルイミン）から疎水クロマトグラフィー（ファルマシア社、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ－４Ｂ）及び吸着クロマトグラフィー（Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ）による酵素精製を行った。α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性のある分画を回収した。

カラム精製を行った該精製物は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果単一バンドであることを確認し、単一に精製したことを確認した。

【００４０】

この単離したα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドデヒドロゲ

ナーゼの部分的なアミノ酸配列をアミノ酸シークエンサー（アプライドバイオシステムズ社）により解析した。この決定した該酵素の部分的なアミノ酸配列を配列番号６、７に示す。

【００４１】

尚、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性は以下のように求めた。

【００４２】

（１）２ｇ／Ｌのパラヒドロキシ安息香酸を含む表１の培地でシュードモナステストステロニ　ＪＭＣ５８３２株を暗所３０℃で２４時間振とう培養した。

（２）菌体を遠心分離にて集め、pH７．５のリン酸カリウム緩衝液に懸濁し１５０Ｗ、１０分間の超音波破砕機による細胞破砕処理を行った後、１０，０００ｇにて３０分間の遠心分離を行った。

（３）上記のようにして得た上清に等量のエタノールを加え、１０，０００ｇにて１０分間遠心し、得られた上清にエタノール濃度が７０％（ｖ／ｖ）となるように加え、更に１０，０００ｇにて１０分間遠心した。

（４）上記で得られた沈殿を１０％のエタノールを含む５０mMリン酸カリウム緩衝液（pH７．５）で溶解し、１０％のエタノールを含む２００mMリン酸カリウム緩衝液（pH７．５）を用いてＤＥＡＥ－セルロースカラムにて３，４－ジヒドロキシ安息香酸のメタ開裂酵素画分を得た。

（５）以上のようにして得られた３，４－ジヒドロキシ安息香酸のメタ開裂酵素溶液を０．２mMの３，４－ジヒドロキシ安息香酸を含む５０mM－Ｔｒｉｓ－塩酸緩衝液（pH８．１）０．９mlに５０μｌを加え、３７℃インキュベートし、４１０nmの吸光度を分光光度計（島津、ＵＶ－２１００）でモニターした。吸光度が一定になったところにα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ酵素液５０μｌ（蛋白質量で１mg）を添加した。この操作で吸光度が変化しないことを確認し、２０μｌのＮＡＤＰ（１００mM溶液）を添加して４１０nmの吸光度減少を１００秒間モニターした。以上の操作によるＮＡＤＰ依存性のα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド減少量からα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を求めた。

【００４３】

実施例２　α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のクローニング

（１）遺伝子ライブラリーの調製

スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株を５ｇ／Ｌのグルコースを含むＬＢ培地（トリプトン；１０ｇ／Ｌ、酵母エキス；５ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ；５ｇ／Ｌ、pH７．０）へ接種し２８℃にて終夜培養し、前培養液を作製した。この前培養液をフラスコ内の新しく用意した前記と同様の培地に接種し２８℃にて再び終夜培養した。該培養液の遠心により集菌した。

該菌体をＴＥ（１０mMトリス塩酸、１mM　ＥＤＴＡ、pH８．０）に懸濁した後、最終濃度０．５％　ＳＤＳ及び最終濃度１００μｇ／mlプロテアーゼKにて３７℃、１時間処理し、１／６容の５M食塩を混合した。次いで、１０％　ＣＴＡＢ（Ｈｅｘａｄｅｃｙｌｔｒｉｍｅｔｈｙｌａｍｍｏｎｉｕｍ　ｂｒｏｍｉｄｅ）、０．７M食塩を１／１０容量加え、６５℃で１０分間静置した。等量のクロロホルム－イソアミルアルコール液にて抽出し、得られた水層を等量のフェノール－クロロホルム液にて抽出を行った。この水層に含まれるゲノムＤＮＡをエタノール沈殿にて取得し、減圧乾燥の後ＴＥを加え溶解した。

【００４４】

該ゲノムＤＮＡを制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社）により部分消化し、１％アガロースゲル（和光純薬工業社、アガロース１６００）にて電気泳動した。緩衝液としてＴＡＥ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９））を用いた。

電気泳動後のアガロースゲルは１μｇ／mlエチジウムブロマイドに１５分間浸せきした後水洗し、紫外線照射によりＤＮＡ断片の蛍光を確認した。サイズマーカーとしてλファージＤＮＡのＥｃｏＲＩ、ＨｉｎｄIII消化物（宝酒造社）を同時に電気泳動し、該ＤＮＡ断片の泳動距離からゲノムＤＮＡ消化物の分子量を求めた。

【００４５】

１－３ｋｂｐのゲノムＤＮＡのＥｃｏＲＩ部分消化物を含むアガロースゲルを切り出し、セシウムクロライドを用いた超遠心法にてＤＮＡ断片の精製を行った。

プラスミドベクターｐＵＣ１９ を制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社）により完全消化した。同反応液にアルカリホスファターゼ（Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ）（宝酒造社）を添加し、制限酵素にて消化したプラスミドベクターの末端の脱リン酸化を行った。

【００４６】

上記反応液に１／１０倍容量の３M酢酸ナトリウムpH５．２と２倍容量のエタノールを添加し－８０℃にて２時間冷却し、９，０００ｇにて１０分間遠心し、ベクターＤＮＡのペレットを得た。７０％エタノールを適量加え遠心管の壁面を２回リンスし、このリンス液を簡単に除去した後減圧乾燥した。乾燥したベクターＤＮＡをＴＥに溶解した。

【００４７】

前記スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株の１－３ｋｂｐのＤＮＡ断片及びベクターＤＮＡを、Ｔ４リガーゼ（宝酒造社）を用いて結合した。

【００４８】

大腸菌ＨＢ１０１のコンピテントセルを１００mMの塩化カルシウムを用いて調製し、上記Ｔ４リガーゼ反応液で形質転換した。該大腸菌は最終濃度が１００μｇ／mlになるようにアンピシリンを添加したＬＢ平板培地（ＬＢに寒天１５ｇ／ｌを添加して調製する）に塗布し、３７℃にて終夜培養した。出現したコロニーを、大腸菌ＨＢ１０１を宿主としたスフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株の遺伝子ライブラリーとした。

【００４９】

（２）α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子プローブの作製

スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株を試験管内の培地（ポリペプトン５ｇ／ｌ、酵母エキス０．５ｇ／ｌ、肉エキス５ｇ／ｌ、食塩２ｇ／ｌ、pH７．０）へ接種し２８℃にて終夜培養し、前培養液を作製した。この前培養液をフラスコ内の新しく用意した前記と同様の培地に接種し２８℃にて再び終夜培養した。該培養液の遠心により集菌した。

【００５０】

該菌体をＴＥ（１０mMトリス塩酸、１mM　ＥＤＴＡ、pH８．０）に懸濁した後、最終濃度０．５％　ＳＤＳ及び最終濃度１００μｇ／mlプロテアーゼＫにて３７℃、１時間処理し、１／６容の５M食塩を混合した。次いで、１０％　ＣＴＡＢ（Ｈｅｘａｄｅｃｙｌｔｒｉｍｅｔｈｙｌａｍｍｏｎｉｕｍ　ｂｒｏｍｉｄｅ）、０．７M食塩を１／１０容量加え、６５℃で１０分間静置した。等量のクロロホルム－イソアミルアルコール液にて抽出し、得られた水層を等量のフェノール－クロロホルム液にて抽出を行った。この水層に含まれるゲノムＤＮＡをエタノール沈殿にて取得し、減圧乾燥の後ＴＥを加え溶解した。

【００５１】

配列番号６、７に示すα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の部分的なアミノ酸配列を用いて、このアミノ酸配列をコードするα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子の部分的な塩基配列を逆翻訳した。これら知見から、該遺伝子をＰＣＲにより部分的に増幅することを目的として、配列番号８及び配列番号９に示す塩基配列を有する合成ヌクレオチドを化学合成により作製し、１対のＰＣＲプライマーとした。スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株のゲノムＤＮＡを鋳型ＤＮＡとして、該プライマーによりα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子の部分的なＤＮＡ断片をＰＣＲにて増幅した。

【００５２】
尚、このＰＣＲは次の如くして行った。まず、１０mMトリス塩酸pH８．３、５０mM塩化カリウム、１．５mM塩化マグネシウム、０．００１％（Ｗ／Ｖ）ゼラチン、２μＭ　ｄＮＴＰ混合液、４０ｎｇ／μｌゲノムＤＮＡ、１μＭ　ＰＣＲプライマー、を含む反応液を調製した。この反応液は９２℃にて５分間熱処理した後、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造社、ＴａＫａＲａ　Ｔａｑ）を０．０５Ｕ／μｌになるように加え、４０℃にて６分間放置した。続いて、サイクル反応（熱変性反応９４℃にて３０秒間、アニーリング反応４０℃にて２分間、伸長反応７２℃にて３０秒間）を４０回繰り返した後、７２℃にて５分間反応した。
【００５３】
この増幅した約６００ｂｐのＤＮＡ断片をプラスミドベクターｐＵＣ１９に連結したプラスミドｐＰＣＣＨ１を作成した。ｐＰＣＣＨ１を鋳型ＤＮＡとして、上記と同一のＰＣＲプライマーを用いたＰＣＲにて、再びα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子の部分的なＤＮＡ断片を増幅した。尚、この２回目のＰＣＲについては、ＰＣＲ　ＤＩＧプローブ合成キット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用い、サイクル反応（熱変性反応９４℃にて３０秒間、アニーリング反応４０℃にて２分間、伸長反応７２℃にて３０秒間）を４０回繰り返した後、７２℃にて５分間反応した。得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動にてジゴキシゲニンラベルした核酸を取り込むことによって分子量が増加した増幅ＤＮＡを分離し切り出したものをα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子プローブとした。
【００５４】
（３）α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子を含むプラスミドの取得
上記（１）にて取得したスフィンゴモナス　エスピーCR-0310201株のライブラリーを構成する大腸菌ＨＢ１０１およそ２０００株をアンピシリンを１００μｇ／ml含む培地に９ｃｍのシャーレ１枚当たり２００個程度爪楊枝を用いて植菌した。３７℃でおよそ６時間静置培養の後、コロニーをナイロンメンブレンにレプリカし、ＤＩＧディテクションキット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用い、上記（２）で得られたプローブとハイブリダイズするコロニーを選抜した。選抜した大腸菌は、プラスミドｐＣＨＭＳ０１を保有していた。
【００５５】
（４）組み換え体のα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性の測定
プラスミドｐＣＨＭＳ０１及び幾つかの制限酵素を用いてｐＣＨＭＳ０１から作成したプラスミドを保有する大腸菌のα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性の測定結果を図１に示した。その結果、ｐＣＨＭＳ０１、ｐＣＨＭＳ０２、ｐＣＨＭＳ０３にα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子が機能的に発現することを確認した。
【００５６】
上記形質転換体細胞の有するα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性の測定は次の如くして行った。アンピシリンとＩＰＴＧをそれぞれ最終濃度が１００μｇ／mlと１mMになるように添加したＬＢ液体培地５０mlへ、ｐＣＨＭＳ０１、ｐＣＨＭＳ０２、ｐＣＨＭＳ０３、ｐＣＨＭＳ０４を保有する大腸菌ＪＭ１０９を１００μｇ／mlのアンピシリンを含むＬＢ培地１００mlで２４時間振とう培養した。遠心集菌後、50mM－Tris－塩酸緩衝液（pH７．５）で２度洗浄し、50mM－Tris－塩酸緩衝液（pH７．５）５mlに懸濁した。１５０Ｗ、１０分間の超音波破砕機によって細胞破砕処理を行い、無細胞抽出を得た。この無細胞抽出を酵素液とし、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性測定を実施例１と同様に行った。反応液をＨＰＬＣ分析（BONDASPHEARE C18カラム、移動相：２％酢酸、２０％

メタノール、７８％蒸留水）し、２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の生成を確認した。

【００５７】

（５）α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列解析

次に該組み換えプラスミドｐＣＨＭＳ０２を用いて約１．４ｋｂｐのＤＮＡ挿入断片の塩基配列の解析を行った。塩基配列の解析は、Ｔ７シークエンシングキット（ファルマシアバイオテク社）を用いたＭ１３ダイデオキシ法（Ｓａｎｇｅｒ，Ｆ．，ｅｔｃ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，７４，５４６３－５４６７（１９７７））にてシークエンシング反応を行い、自動レーザー蛍光シークエンシング装置（ファルマシアバイオテク社）を用いた。塩基配列解析の結果、該ＤＮＡ断片上に９４５ｂｐの唯一のオープンリーディングフレームが見出された。

【００５８】

以上のようにして得られたα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の塩基配列を解析した。その塩基配列とコードされているアミノ酸配列を配列番号５に示した。

【００５９】

【発明の効果】

本発明の形質転換体細胞を用いれば、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼを多量に製造することができ、２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の工業的生産が可能となる。

【００６０】

【配列表】

配列番号：１

配列の長さ：２８０

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

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

```
            180                 185                 190
Asn Ala Val Gln Gly Pro Ile His Pro Glu Leu Gly Ile Ala Met Asp
        195                 200                 205
Met Ser Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr Gly Ala Ile Cys Thr Leu Ser
    210                 215                 220
Leu Ser Phe Asn Asn Asp Gly Pro Leu Gly Thr Phe Phe Arg Tyr Ile
225                 230                 235                 240
Cys Asp Asn Gly Thr Trp Ile Ala Arg Tyr Asp Asp Leu Val Thr Gly
                245                 250                 255
Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val Asp Val Ser Met Asn Gly
            260                 265                 270
Ile Glu Leu Gln Asp Arg Glu Phe
        275                 280
```

【００６１】

配列番号：２

配列の長さ：８４０

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ

起源

生物名：スフィンゴモナス

株名　：スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201

配列：

ATGAGAATAG CTCTCGCAGG CGCCGGCGCA TTCGGCGAAA AACATCTCGA CGGTCTCAAG 60
AATATCGACG GCGTCGAGAT CGTCTCGATC ATCAGCCGCA AGGCCGAGCA GGCCGCGGAA 120
GTCGCCGCGA AATATGGCGC GAAGCACAGC GGCACCGATC TTTCCGAAGC GCTTGCCCGT 180
GACGATGTCG ACGCGGTGAT CCTCTGCACC CCCACCCAGA TGCATGCCGA GCAGGCCATT 240
GCCTGCATGA ATGCCGGCAA GCATGTCCAG GTGGAAATCC CGCTGGCGGA CAGCTGGGCC 300
GATGCCGAAG CGGTGATGAA GAAGAGCCAG GAAACCGGCC TCGTCTGCAT GGTCGGCCAC 360
ACCCGCCGCT TCAACCCGAG CCACCAGTAT ATCCACAACA AGATCGTGGC CGGCGAGCTC 420
GCCATCCAGC AGATGGACGT GCAGACCTAT TTCTTCCGCC GCAAGAACAT GAACGCCAAG 480
GGCGAGCCGC GGTCCTGGAC GGACCATCTG CTCTGGCACC ATGCCGCGCA CACGGTGGAC 540
CTGTTCGCTT ATCAGGCCGG CAAGATCGTG CAGGCCAATG CCGTGCAGGG GCCGATCCAT 600
CCCGAGCTCG GCATCGCCAT GGACATGTCG ATCCAGCTCA AGAGCGAGAC GGGCGCGATC 660
TGCACCCTGT CCCTCTCGTT CAACAATGAC GGGCCGCTCG GCACCTTCTT CCGCTACATC 720
TGCGACAACG GCACCTGGAT CGCGCGCTAC GACGATCTGG TGACCGGCAA GGAAGAACCC 780
GTGGACGTCA GCAAGGTCGA CGTGTCGATG AACGGGATCG AGCTGCAGGA TCGGGAATTC 840

【００６２】

配列番号：３
配列の長さ：３１５
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
配列：

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

```
            180                 185                 190
Asn Ala Val Gln Gly Pro Ile His Pro Glu Leu Gly Ile Ala Met Asp
        195                 200                 205
Met Ser Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr Gly Ala Ile Cys Thr Leu Ser
    210                 215                 220
Leu Ser Phe Asn Asn Asp Gly Pro Leu Gly Thr Phe Phe Arg Tyr Ile
225                 230                 235                 240
Cys Asp Asn Gly Thr Trp Ile Ala Arg Tyr Asp Asp Leu Val Thr Gly
                245                 250                 255
Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val Asp Val Ser Met Asn Gly
            260                 265                 270
Ile Glu Leu Gln Asp Arg Glu Phe Ile Ala Ala Ile Arg Glu Gly Arg
        275                 280                 285
Glu Pro Asn Ser Ser Val Ala Arg Val Leu Asp Cys Tyr Arg Val Leu
    290                 295                 300
Gly Glu Leu Glu Val Gln Leu Glu Lys Gln Gly
305                 310                 315
```

【００６３】

配列番号：４

配列の長さ：９４５

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ

起源

生物名：スフィンゴモナス

株名　：スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201

配列：

ATGAGAATAG CTCTCGCAGG CGCCGGCGCA TTCGGCGAAA AACATCTCGA CGGTCTCAAG 60
AATATCGACG GCGTCGAGAT CGTCTCGATC ATCAGCCGCA AGGCCGAGCA GGCCGCGGAA 120
GTCGCCGCGA AATATGGCGC GAAGCACAGC GGCACCGATC TTTCCGAAGC GCTTGCCCGT 180
GACGATGTCG ACGCGGTGAT CCTCTGCACC CCCACCCAGA TGCATGCCGA GCAGGCCATT 240
GCCTGCATGA ATGCCGGCAA GCATGTCCAG GTGGAAATCC CGCTGGCGGA CAGCTGGGCC 300
GATGCCGAAG CGGTGATGAA GAAGAGCCAG GAAACCGGCC TCGTCTGCAT GGTCGGCCAC 360
ACCCGCCGCT TCAACCCGAG CCACCAGTAT ATCCACAACA AGATCGTGGC CGGCGAGCTC 420
GCCATCCAGC AGATGGACGT GCAGACCTAT TTCTTCCGCC GCAAGAACAT GAACGCCAAG 480
GGCGAGCCGC GGTCCTGGAC GGACCATCTG CTCTGGCACC ATGCCGCGCA CACGGTGGAC 540
CTGTTCGCTT ATCAGGCCGG CAAGATCGTG CAGGCCAATG CCGTGCAGGG GCCGATCCAT 600
CCCGAGCTCG GCATCGCCAT GGACATGTCG ATCCAGCTCA AGAGCGAGAC GGGCGCGATC 660
TGCACCCTGT CCCTCTCGTT CAACAATGAC GGGCCGCTCG GCACCTTCTT CCGCTACATC 720
TGCGACAACG GCACCTGGAT CGCGCGCTAC GACGATCTGG TGACCGGCAA GGAAGAACCC 780
GTGGACGTCA GCAAGGTCGA CGTGTCGATG AACGGGATCG AGCTGCAGGA TCGGGAATTC 840
ATCGCGGCGA TCCGCGAAGG TCGCGAGCCC AATTCGTCGG TGGCGAGAGT GCTCGATTGC 900
TATCGGGTGC TGGGCGAACT CGAGGTCCAG CTCGAAAAGC AGGGC 945

【００６４】

配列番号：５

配列の長さ：１１７４

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ

起源

　生物名：スフィンゴモナス

　株名　：スフィンゴモナス　エスピーCR-0310201

配列：

```
CTCGAGGGGA GAGGGTTGGG AGAGGGGTCG CCACGCTGCG GCGTGTCAGC CCGCTCCTCT  60
CCTCCCCGCC CCCCTTCCCG GCCCTCTCCC TCGCAGGTGA GAGGGCGCTC ATGTGAAAGG 120
ACTGCCCC ATG AGA ATA GCT CTC GCA GGC GCC GGC GCA TTC GGC GAA AAA  170
         Met Arg Ile Ala Leu Ala Gly Ala Gly Ala Phe Gly Glu Lys
           1               5                  10
CAT CTC GAC GGT CTC AAG AAT ATC GAC GGC GTC GAG ATC GTC TCG ATC   218
His Leu Asp Gly Leu Lys Asn Ile Asp Gly Val Glu Ile Val Ser Ile
 15                  20                  25                  30
ATC AGC CGC AAG GCC GAG CAG GCC GCG GAA GTC GCC GCG AAA TAT GGC   266
Ile Ser Arg Lys Ala Glu Gln Ala Ala Glu Val Ala Ala Lys Tyr Gly
                 35                  40                  45
GCG AAG CAC AGC GGC ACC GAT CTT TCC GAA GCG CTT GCC CGT GAC GAT   314
Ala Lys His Ser Gly Thr Asp Leu Ser Glu Ala Leu Ala Arg Asp Asp
             50                  55                  60
GTC GAC GCG GTG ATC CTC TGC ACC CCC ACC CAG ATG CAT GCC GAG CAG   362
Val Asp Ala Val Ile Leu Cys Thr Pro Thr Gln Met His Ala Glu Gln
         65                  70                  75
GCC ATT GCC TGC ATG AAT GCC GGC AAG CAT GTC CAG GTG GAA ATC CCG   410
Ala Ile Ala Cys Met Asn Ala Gly Lys His Val Gln Val Glu Ile Pro
```

```
     80                  85                  90
CTG GCG GAC AGC TGG GCC GAT GCC GAA GCG GTG ATG AAG AAG AGC CAG   458
Leu Ala Asp Ser Trp Ala Asp Ala Glu Ala Val Met Lys Lys Ser Gln
 95                 100                 105                 110
GAA ACC GGC CTC GTC TGC ATG GTC GGC CAC ACC CGC CGC TTC AAC CCG   506
Glu Thr Gly Leu Val Cys Met Val Gly His Thr Arg Arg Phe Asn Pro
                115                 120                 125
AGC CAC CAG TAT ATC CAC AAC AAG ATC GTG GCC GGC GAG CTC GCC ATC   554
Ser His Gln Tyr Ile His Asn Lys Ile Val Ala Gly Glu Leu Ala Ile
            130                 135                 140
CAG CAG ATG GAC GTG CAG ACC TAT TTC TTC CGC CGC AAG AAC ATG AAC   602
Gln Gln Met Asp Val Gln Thr Tyr Phe Phe Arg Arg Lys Asn Met Asn
        145                 150                 155
GCC AAG GGC GAG CCG CGG TCC TGG ACG GAC CAT CTG CTC TGG CAC CAT   650
Ala Lys Gly Glu Pro Arg Ser Trp Thr Asp His Leu Leu Trp His His
    160                 165                 170
GCC GCG CAC ACG GTG GAC CTG TTC GCT TAT CAG GCC GGC AAG ATC GTG   698
Ala Ala His Thr Val Asp Leu Phe Ala Tyr Gln Ala Gly Lys Ile Val
175                 180                 185                 190
CAG GCC AAT GCC GTG CAG GGG CCG ATC CAT CCC GAG CTC GGC ATC GCC   746
Gln Ala Asn Ala Val Gln Gly Pro Ile His Pro Glu Leu Gly Ile Ala
                195                 200                 205
ATG GAC ATG TCG ATC CAG CTC AAG AGC GAG ACG GGC GCG ATC TGC ACC   794
Met Asp Met Ser Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr Gly Ala Ile Cys Thr
            210                 215                 220
CTG TCC CTC TCG TTC AAC AAT GAC GGG CCG CTC GGC ACC TTC TTC CGC   842
Leu Ser Leu Ser Phe Asn Asn Asp Gly Pro Leu Gly Thr Phe Phe Arg
        225                 230                 235
TAC ATC TGC GAC AAC GGC ACC TGG ATC GCG CGC TAC GAC GAT CTG GTG   890
```

```
Tyr Ile Cys Asp Asn Gly Thr Trp Ile Ala Arg Tyr Asp Asp Leu Val
    240                 245                 250
ACC GGC AAG GAA GAA CCC GTG GAC GTC AGC AAG GTC GAC GTG TCG ATG   938
Thr Gly Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val Asp Val Ser Met
255                 260                 265                 270
AAC GGG ATC GAG CTG CAG GAT CGG GAA TTC ATC GCG GCG ATC CGC GAA   986
Asn Gly Ile Glu Leu Gln Asp Arg Glu Phe Ile Ala Ala Ile Arg Glu
                275                 280                 285
GGT CGC GAG CCC AAT TCG TCG GTG GCG AGA GTG CTC GAT TGC TAT CGG   1034
Gly Arg Glu Pro Asn Ser Ser Val Ala Arg Val Leu Asp Cys Tyr Arg
            290                 295                 300
GTG CTG GGC GAA CTC GAG GTC CAG CTC GAA AAG CAG GGC TGAAAACCTG    1083
Val Leu Gly Glu Leu Glu Val Gln Leu Glu Lys Gln Gly
        305                 310                 315
CACCGGAATG AAACGGAAGC CTTGCCGGAG CAATCTGGCA AGGCTTTTTT CTTGGCGGCA 1143
GGCACGCCGT CATTGCATCA TGGCGGTGGA A                                 1174
```

【００６５】

配列番号：６

配列の長さ：９

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

```
Asp Asp Val Asp Ala Val Ile Leu Cys
 1               5
```

【００６６】

配列番号：７

配列の長さ：１２

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

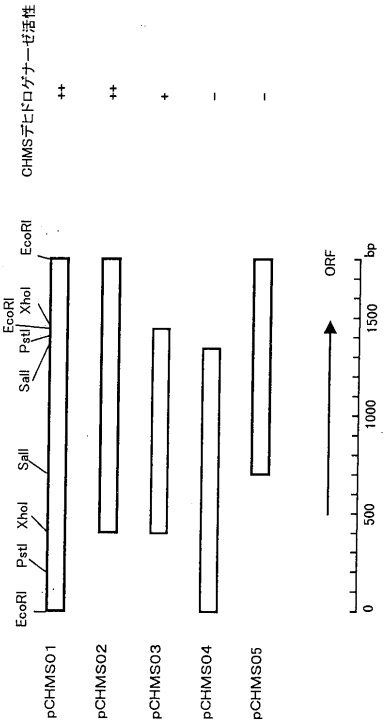
```
Thr Gly Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val
 1               5                  10
```

【００６７】
配列番号：８
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：１本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列：ACGCGGTGAT CCTCTGC　17

【００６８】
配列番号：９
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：１本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成ＤＮＡ
配列：CTTGCTGACG TCCACGG　17

【図面の簡単な説明】
【図１】スフィンゴモナス　エスピー由来のα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ遺伝子を含むプラスミドにおける挿入ＤＮＡ断片の制限酵素地図及びα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性の有無を示す説明図である。

【図１】


CHMSデヒドロゲナーゼ活性
++
++
+
-
-
EcoRI
XhoI
PstI
SalI
SalI
XhoI
PstI
EcoRI
EcoRI
SalI
PstI
XhoI
EcoRI
pCHMS01
pCHMS02
pCHMS03
pCHMS04
pCHMS05
ORF
0
500
1000
1500
bp

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ１２Ｒ 1/19 (2006.01) Ｃ１２Ｒ 1:19

(74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
(74)代理人 100106909
弁理士 棚井 澄雄
(72)発明者 政井 英司
新潟県長岡市希望ケ丘南６－３－１０ マエサンハイツ希望ケ丘２０６
(72)発明者 福田 雅夫
新潟県長岡市深沢町１７６９－１ 深沢町宿舎１－５０５
(72)発明者 片山 義博
東京都練馬区貫井３－４７－４
(72)発明者 西川 誠司
埼玉県幸手市権現堂１１３４－２ 株式会社コスモ総合研究所研究開発センター内
(72)発明者 堀田 康司
埼玉県幸手市権現堂１１３４－２ 株式会社コスモ総合研究所研究開発センター内

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 Journal of Bacteriology, 172[5](1990) p.2704-2709
FEMS Microbiology Letters, 154(1997) p.403-408
Journal of Bacteriology, 180[11](1998. 6月) p.2849-2853

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N15/00-15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed
JMEDPlus(JDream2)
JSTPlus(JDream2)