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

特許第4039037号
(P4039037)

(45)発行日　平成20年1月30日(2008.1.30)　(24)登録日　平成19年11月16日(2007.11.16)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A

請求項の数 20　(全 55 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-340304(P2001-340304)
(22)出願日　平成13年11月6日(2001.11.6)
(65)公開番号　特開2003-61682(P2003-61682A)
(43)公開日　平成15年3月4日(2003.3.4)
審査請求日　平成16年10月14日(2004.10.14)
(31)優先権主張番号　特願2001-175175(P2001-175175)
(32)優先日　平成13年6月11日(2001.6.11)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000002093
住友化学株式会社
東京都中央区新川二丁目２７番１号
(74)代理人　100093285
弁理士　久保山　隆
(74)代理人　100113000
弁理士　中山　亨
(74)代理人　100119471
弁理士　榎本　雅之
(72)発明者　朝子　弘之
兵庫県宝塚市高司４丁目２番１号　住友化学工業株式会社内
(72)発明者　清水　将年
兵庫県宝塚市高司４丁目２番１号　住友化学工業株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】還元酵素遺伝子及びその利用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

下記の塩基配列のいずれかを有することを特徴とする遺伝子。

ａ）配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列。

ｂ）配列番号２で示される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡの塩基配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列。

ｃ）配列番号２で示される塩基配列。

【請求項２】

宿主細胞内において機能可能なプロモーターと請求項１記載の遺伝子とが機能可能な形で接続されてなることを特徴とするＤＮＡ構築物。

【請求項３】

請求項１の遺伝子又は請求項２記載のＤＮＡ構築物を含むことを特徴とする組換ベクター。

【請求項４】

請求項２記載のＤＮＡ構築物又は請求項３記載の組換ベクターが宿主細胞に導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項５】

宿主細胞が微生物であることを特徴とする請求項４記載の形質転換体。

【請求項６】
宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする請求項４記載の形質転換体。
【請求項７】
請求項１記載の遺伝子を保有することを特徴とする形質転換体。
【請求項８】
請求項３記載の組換ベクターを宿主細胞に導入する工程を含むことを特徴とする形質転換体の製造方法。
【請求項９】
下記のアミノ酸配列のいずれかを有することを特徴とするタンパク質。
ａ）配列番号１で示されるアミノ酸配列。
ｂ）配列番号２で示される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡの塩基配列がコードするアミノ酸配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。
ｃ）配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。
【請求項１０】
４－ハロ－３－オキソ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルに請求項９記載のタンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルの製造方法。
【請求項１１】
請求項１記載の遺伝子及び酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を含むことを特徴とする組換ベクター。
【請求項１２】
酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質がグルコース脱水素酵素であることを特徴とする請求項１１記載の組換ベクター。
【請求項１３】
請求項１１又は１２記載の組換ベクターが宿主細胞に導入されてなることを特徴とする形質転換体。
【請求項１４】
宿主細胞が微生物であることを特徴とする請求項１３記載の形質転換体。
【請求項１５】
宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする請求項１３記載の形質転換体。
【請求項１６】
請求項１記載の遺伝子及び酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を保有することを特徴とする形質転換体。
【請求項１７】
酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質を反応系内に共存させること特徴とする請求項１０記載の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルの製造方法。
【請求項１８】
酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質がグルコース脱水素酵素であることを特徴とする請求項１７記載の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルの製造法。
【請求項１９】

４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルに請求項１３～１５記載の形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルの製造方法。

【請求項２０】

４－ハロ－３－オキソ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルに請求項１６記載の形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸のＣ1-Ｃ８アルキルエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、還元酵素をコードする遺伝子、該酵素及びそれらの利用等に関する。

【０００２】

【従来の技術】

（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルは医農薬中間体等として有用な化合物であり、これまでに種々の製造方法が提案されている。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、従来の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法は必ずしも工業的に十分なものではなく、新しい（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法が求められている。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造法について種々検討した結果、（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルを製造するために利用可能なタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を見出し、これを反応触媒として利用することにより４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルを不斉還元して（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルを優先的に生産するような製造方法を提供することが上記課題を解決するために極めて有効であると判断し、かつ多くの実験等を経ることにより、配列番号１で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルを不斉還元して（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルを優先的に生産する能力を有することを見出し、本発明に至った。

【０００５】

即ち、本発明は、

１．下記の塩基配列のいずれかを有することを特徴とする遺伝子（以下、本発明遺伝子と記すこともある。）

ａ）配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、

ｂ）配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡの塩基配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

ｃ）配列番号２で示される塩基配列；

２．宿主細胞内において機能可能なプロモーターと前項１記載の遺伝子とが機能可能な形で接続されてなることを特徴とする遺伝子；

３．前項１又は２記載の遺伝子を含むことを特徴とする組換ベクター（以下、本発明ベクターと記すこともある。）；

４．前項２記載の遺伝子又は前項３記載の組換ベクターが宿主細胞に導入されてなることを特徴とする形質転換体；

５．宿主細胞が微生物であることを特徴とする前項４記載の形質転換体；

６．宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする前項４記載の形質転換体；

７．前項１記載の遺伝子を保有することを特徴とする形質転換体（以下、本発明形質転換

体と記すこともある。）；
８．前項３記載の組換ベクターを宿主細胞に導入する工程を含むことを特徴とする形質転換体の製造方法；
９．下記のアミノ酸配列のいずれかを有することを特徴とするタンパク質（以下、本発明タンパク質と記載することもある。）
ａ）配列番号１で示されるアミノ酸配列、
ｂ）配列番号２で示される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡの塩基配列がコードするアミノ酸配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、
ｃ）配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列；
１０．４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルに前項９に記載のタンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法；
１１．前項１記載の遺伝子及び酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を含むことを特徴とする組換ベクター；
１２．酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質がグルコース脱水素酵素であることを特徴とする前項１１記載の組換ベクター；
１３．前項１１又は１２記載の組換ベクターが宿主細胞に導入されてなることを特徴とする形質転換体；
１４．宿主細胞が微生物であることを特徴とする前項１３記載の形質転換体；
１５．宿主細胞が大腸菌であることを特徴とする前項１３記載の形質転換体；
１６．前項１記載の遺伝子及び酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を保有することを特徴とする形質転換体；
１７．酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質を反応系内に共存させること特徴とする前項１０記載の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法；
１８．酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質がグルコース脱水素酵素であることを特徴とする前項１７記載の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造法；
１９．４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルに前項１３～１５記載の形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法；
２０．４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルに前項１６記載の形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法；
等を提供するものである。
【０００６】
【発明の実施の形態】
まず、本発明遺伝子について説明する。
本発明遺伝子は、天然の遺伝子であってもよく、又は天然の遺伝子に変異を導入（部位特異的変異導入法、突然変異処理等）することにより作出された遺伝子であってもよい。天然の遺伝子を検索する場合には、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有する微生物を対

象にすればよく、例えばペニシリウム・シトリナム（Penicillium citrinum）などのペニシリウム属に属する微生物をその対象として挙げることができる。

【０００７】

本発明遺伝子は４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する還元反応を触媒する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有している。

【０００８】

本発明遺伝子において「配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡ」とは、例えば「クローニングとシークエンス」（渡辺格監修、杉浦昌弘編集、１９８９年、農村文化社発行）等に記載されているサザンハイブリダイゼーション法において、（１）高イオン濃度下［例えば、6XSSC（900mMの塩化ナトリウム、90mMのクエン酸ナトリウム）が挙げられる。］に、65℃でハイブリダイズさせることにより配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡとＤＮＡ－ＤＮＡハイブリッドを形成し、（２）低イオン濃度下［例えば、0.1 X SSC（15mMの塩化ナトリウム、1.5mMのクエン酸ナトリウム）が挙げられる。］に、65℃で30分間保温した後でも該ハイブリッドが維持されうるようなＤＮＡをいう。

【０００９】

具体的には、例えば、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡ、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列において、その一部の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるＤＮＡ、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡと配列相同性が８０％以上であるＤＮＡ等があげられる。かかるＤＮＡは、自然界に存在するＤＮＡの中からクローニングされたＤＮＡであっても、このクローニングされたＤＮＡの塩基配列において、その一部の塩基の欠失、置換または付加が人為的に導入されてなるＤＮＡであっても、人為的に合成されたＤＮＡであってもよい。

【００１０】

より具体的には、例えば、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡ及び配列番号２で示される塩基配列を有するＤＮＡ（例えば、配列番号２で示される塩基配列からなるＤＮＡ、配列番号２８で示される塩基配列からなるＤＮＡ等）等が挙げられる。

【００１１】

本発明遺伝子のＤＮＡは、例えば、以下のようにして調製することができる。

【００１２】

ペニシリウム・シトリナム（Penicillium citrinum）等のペニシリウム属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法（例えば、「新　細胞工学実験プロトコール」（東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年）に記載された方法）に準じてｃDNAライブラリーを調製し、調製されたｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてＰＣＲを行うことにより、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡ、配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるＤＮＡ及び／又は配列番号２で示される塩基配列を有するＤＮＡ等を増幅して本発明遺伝子のＤＮＡを調製することができる。

【００１３】

また、前記ｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、かつ配列番号２３に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号２４に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてＰＣＲを行うことにより、配列番号２８で示される塩基配列からなるＤＮＡを増幅して本発明遺伝子のＤＮＡを調製することができる。

【００１４】

該ＰＣＲの条件としては、例えば、４種類のｄＮＴＰを各々２０μM、２種類のオリゴヌ

クレオチドプライマーを各々１５ｐｍｏｌ、Ｔａｑｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを１．３Ｕ及び鋳型となるｃＤＮＡライブラリーを混合した反応液を97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)－50℃(0.5分間)－72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)－55℃(0.5分間)－72℃(2.5分間)のサイクルを２０回行い、さらに72℃で7分間保持する条件が挙げられる。

【００１５】

なお、該ＰＣＲに用いるプライマーの５’末端側には、制限酵素認識配列等を付加していてもよい。

【００１６】

また、前記ｃＤＮＡライブラリーを鋳型として配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチド等（例えば、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする５’末端側の約１４塩基程度以上の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド）とｃＤＮＡライブラリー構築に用いられたベクターのＤＮＡ挿入部位近傍の塩基配列に相補的な塩基配列からなる約１４塩基程度以上のオリゴヌクレオチドとをプライマーとして用いてＰＣＲを行うことによっても、配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡや、配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ等を増幅して本発明遺伝子のＤＮＡを調製することができる。

【００１７】

上記のようにして増幅されたＤＮＡを「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989），Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBNO-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして本発明組換ベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119（宝酒造社製）、pTV118N（宝酒造社製）、pBluescriptII （東洋紡社製）、ｐCR2.1-TOPO（Invitrogen社製）、pTrc99A（Pharmacia社製）、ｐKK223-3（Pharmacia社製）などが挙げられる。

【００１８】

また、本発明遺伝子のＤＮＡは、例えば、微生物またはファージ由来のベクターに挿入されたｃＤＮＡライブラリーに配列番号１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有する約１５塩基程度以上の塩基配列からなるＤＮＡをプローブとして後述する条件にてハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するＤＮＡを検出することによっても取得することができる。

【００１９】

染色体ＤＮＡ又はｃＤＮＡライブラリーにプローブをハイブリダイズさせる方法としては、例えば、コロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションを挙げることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて方法を選択することができる。

【００２０】

使用されるライブラリーがプラスミドベクターを用いて作製されている場合にはコロニーハイブリダイゼーションを利用するとよい。具体的には、ライブラリーのＤＮＡを宿主微生物に導入することにより形質転換体を取得し、得られた形質転換体を希釈した後、該希釈物を寒天培地上にまき、コロニーが現われるまで培養する。

【００２１】

使用されるライブラリーがファージベクターを用いて作製されている場合にはプラークハイブリダイゼーションを利用するとよい。具体的には、宿主微生物とライブラリーのファージとを感染可能な条件下で混合し、さらに軟寒天培地と混合した後、該混合物を寒天培地上にまき、プラークが現われるまで培養する。

【００２２】

次いで、いずれのハイブリダイゼーションの場合にも、前記の培養を行った寒天培地上に

メンブレンを置き、形質転換体又はファージを該メンブレンに吸着・転写させる。このメンブレンをアルカリ処理した後、中和処理し、次いでＤＮＡを該メンブレンに固定する処理を行う。より具体的には、例えば、プラークハイブリダイゼーションの場合には、前記寒天培地上にニトロセルロースメンブレン又はナイロンメンブレン（例えば、Hybond-N^+（アマシャム社登録商標））を置き、約１分間静置してファージ粒子をメンブレンに吸着・転写させる。次に、該メンブレンをアルカリ溶液（例えば１．５Ｍ塩化ナトリウム、０．５Ｍ水酸化ナトリウム）に約３分間浸してファージ粒子を溶解させることによりファージＤＮＡをメンブレン上に溶出させた後、中和溶液（例えば、１．５Ｍ塩化ナトリウム、０．５Ｍトリス－塩酸緩衝溶液ｐＨ７．５）に約５分間浸す。次いで該メンブレンを洗浄液（例えば、０．３Ｍ塩化ナトリウム、３０ｍＭクエン酸、０．２Ｍトリス－塩酸緩衝液ｐＨ７．５）で約５分間洗った後、例えば、約８０℃で約９０分間加熱することによりファージＤＮＡをメンブレンに固定する。

【００２３】

このように調製されたメンブレンを用いて、上記ＤＮＡをプローブとしてハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、例えば、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition（1989）」 Cold Spring Harbor Laboratory Press等の記載に準じて行うことができる。

【００２４】

プローブに用いるＤＮＡは、放射性同位元素により標識されたものや、蛍光色素で標識されたものであってもよい。

プローブに用いるＤＮＡを放射性同位元素により標識する方法としては、例えば、Random Primer Labeling Kit（宝酒造社製）等を利用することにより、ＰＣＲ反応液中のｄＣＴＰを（α－^{32}Ｐ）ｄＣＴＰに替えて、プローブに用いるＤＮＡを鋳型にしてＰＣＲを行う方法が挙げられる。

また、プローブに用いるＤＮＡを蛍光色素で標識する場合には、例えば、アマシャム製のECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System等を用いることができる。

【００２５】

ハイブリダイゼーションは、例えば、以下の通りに行うことができる。

４５０～９００ｍＭの塩化ナトリウム及び４５～９０ｍＭのクエン酸ナトリウムを含みドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を０．１～１．０重量％の濃度で含み、変性した非特異的ＤＮＡを０～２００μｌ／ｍｌの濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ０～０．２重量％の濃度で含んでいてもよいプレハイブリダイゼーション液（好ましくは９００ｍＭの塩化ナトリウム、９０ｍＭのクエン酸ナトリウム、１．０重量％のＳＤＳ及び１００μｌ／ｍｌの変性Calf-thymusＤＮＡを含むプレハイブリダイゼーション液）を上記のようにして作製したメンブレン１ｃｍ^{2}当たり５０～２００μｌの割合で準備し、該プレハイブリダイゼーション液に前記メンブレンを浸して４２～６５℃で１～４時間保温する。

次いで、例えば、４５０～９００ｍＭの塩化ナトリウム及び４５～９０ｍＭのクエン酸ナトリウムを含み、ＳＤＳを０．１～１．０重量％の濃度で含み、変性した非特異的ＤＮＡを０～２００μｇ／ｍｌの濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポロビニルピロリドン等をそれぞれ０～０．２重量％の濃度で含んでいてもよいハイブリダイゼーション溶液（好ましくは、９００ｍＭの塩化ナトリウム、９０ｍＭのクエン酸ナトリウム、１．０重量％のＳＤＳ及び１００μｇ／ｍｌの変性Calf-thymusＤＮＡを含むハイブリダイゼーション溶液）と前述の方法で調製して得られたプローブ（メンブレン１ｃｍ^{2}当たり１．０×１０^4～２．０×１０^{6}cpm相当量）とを混合した溶液をメンブレン１ｃｍ^{2}当たり５０～２００μｌの割合で準備し、該ハイブリダイゼーション溶液に浸し４２～６５℃で１２～２０時間保温する。

【００２６】

該ハイブリダイゼーション後、メンブレンを取り出し、１５～３００ｍＭの塩化ナトリウム１．５～３０ｍＭクエン酸ナトリウム及び０．１～１．０重量％のＳＤＳ等を含む４２

～６５℃の洗浄液（好ましくは１５ｍＭの塩化ナトリウム、１．５ｍＭのクエン酸ナトリウム及び１．０重量％のＳＤＳを含む６５℃の洗浄液）等を用いて洗浄する。洗浄したメンブレンを２xSSC（３００ｍＭ塩化ナトリウム、３０ｍＭクエン酸ナトリウム）で軽くすすいだ後、乾燥する。このメンブレンを例えばオートラジオグラフィー等に供してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブとハイブリダイズするＤＮＡのメンブレン上の位置に相当するクローンを元の寒天培地上で特定し、これを釣菌することにより、当該ＤＮＡを有するクローンを単離する。

【００２７】

このようにして得られるクローンを培養して得られる培養菌体から本発明遺伝子のＤＮＡを調製することができる。

【００２８】

上記のようにして調製されたＤＮＡを「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989），Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBNO-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして本発明組換ベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119（宝酒造社製）、pTV118N（宝酒造社製）、pBluescriptII （東洋紡社製）、ｐCR2.1-TOPO（Invitrogen社製）、pTrc99A（Pharmacia社製）、ｐKK223-3（Pharmacia社製）等が挙げられる。

【００２９】

また、前述のＤＮＡの塩基配列は、F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson著、Proceeding of Natural Academy of Science U.S.A.(1977) 74: 5463-5467頁等に記載されているダイデオキシターミネーター法等により解析することができる。塩基配列分析用の試料調製には、例えば、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit等の市販の試薬を用いてもよい。

【００３０】

上述のようにして得られるＤＮＡが、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先して生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードしていることの確認は、例えば、以下のようにして行うことができる。

【００３１】

まず上述のようにして得られるＤＮＡを後述のように、宿主細胞において機能可能なプロモーターの下流に接続されるようにベクターに挿入し、このベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。次いで該形質転換体の培養物を４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルに作用させる。反応生成物中の（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの量を分析することにより、得られたＤＮＡがかかる能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードすることが確認できる。

【００３２】

本発明遺伝子を宿主細胞で発現させるには、例えば、宿主細胞で機能可能なプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で接続されてなる遺伝子を宿主細胞に導入する。

【００３３】

ここで、「機能可能な形で」とは、該遺伝子を宿主細胞に導入することにより宿主細胞を形質転換させた際に、本発明遺伝子が、プロモーターの制御下に発現するようにプロモーターと結合された状態にあることを意味する。プロモーターとしては、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、または、tacプロモーターもしくはtrcプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター等をあげることができ、ペニシリウム・シトリナムにおいて本発明遺伝子の発現を制御しているプロモーターを利用してもよい。

【００３４】

一般的には、宿主細胞において機能可能なプロモーターと機能可能な形で接続されてなる遺伝子を前述のようなベクターに組み込んでなる組換ベクターを宿主細胞に導入する。尚

、ベクターとしては、選択マーカー遺伝子（例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性付与遺伝子等）を含むベクターを用いると、該ベクターが導入された形質転換体を当該選択マーカー遺伝子の表現型等を指標にして選択することができる。

【００３５】

宿主細胞において機能可能なプロモーターと機能可能な形で接続されてなる本発明遺伝子又は本発明組換ベクター等を導入する宿主細胞としては、例えば、Escherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、Staphylococcus属、Streptomyces属、Saccharomyces属、Kluyveromyces属及びAspergillus属に属する微生物等があげられる。

【００３６】

宿主細胞において機能可能なプロモーターと機能可能な形で接続されてなる本発明遺伝子又は本発明組換ベクター等を宿主細胞へ導入する方法は、用いられる宿主細胞に応じて通常使われる導入方法であればよく、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989），Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBNO-471-50338-X等に記載される塩化カルシウム法や、「Methods in Electroporation:Gene Pulser /E.coli Pulser System」 Bio-Rad Laboratories, (1993)等に記載されるエレクトロポレーション法等をあげることができる。

【００３７】

宿主細胞において機能可能なプロモーターと機能可能な形で接続されてなる本発明遺伝子又は本発明組換ベクター等が導入された形質転換体を選抜するには、例えば、前述のようなベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の表現型を指標にして選抜すればよい。

該形質転換体が本発明遺伝子を保有していることは、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989），Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載される通常の方法に準じて、制限酵素部位の確認、塩基配列の解析、サザンハイブリダイゼーション、ウエスタンハイブリダイゼーション等を行うことにより、確認することができる。

【００３８】

次に本発明タンパク質について説明する。

本発明タンパク質は、下記のアミノ酸配列を有することを特徴とする。

ａ）配列番号１で示されるアミノ酸配列。

ｂ）配列番号２で示される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡの塩基配列がコードするアミノ酸配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

ｃ）配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

【００３９】

本発明タンパク質のアミノ酸配列のうち、配列番号１で示されるアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列としては、例えば、配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端側にTrp-Ile-Ser-Thr-Lys-Leuの６アミノ酸が付加されたアミノ酸配列等が挙げられる。

【００４０】

本発明タンパク質は、例えば、本発明遺伝子を保有する形質転換体を培養することにより製造することができる。

該形質転換体を培養するための培地としては、例えば、微生物等の宿主細胞の培養に通常使用される炭素源や窒素源、有機塩や無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。

【００４１】
炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、シュークロース等の糖類、グリセロール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸、動物油、植物油及び糖蜜が挙げられる。これらの炭素源の培地への添加量は培養液に対して通常０．１～３０％（ｗ／ｖ）程度である。
【００４２】
窒素源としては、例えば、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーン・スティープ・リカー（Corn Steep Liquor）、綿実粉、乾燥酵母、カザミノ酸等の天然有機窒素源、アミノ酸類、硝酸ナトリウム等の無機酸のアンモニウム塩、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩及び尿素が挙げられる。これらのうち有機酸のアンモニウム塩、天然有機窒素源、アミノ酸類等は多くの場合には炭素源としても使用することができる。これらの窒素源の培地への添加量は培養液に対して通常０．１～３０％（ｗ／ｖ）程度である。
【００４３】
有機塩や無機塩としては、例えば、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛等の塩化物、硫酸塩、酢酸塩、炭酸塩及びリン酸塩を挙げることができる。具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化コバルト、硫酸亜鉛、硫酸銅、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素一カリウム及びリン酸水素二カリウムが挙げられる。これらの有機塩及び／又は無機塩の培地への添加量は培養液に対して通常０．０００１～５％（ｗ／ｖ）程度である。
【００４４】
さらに、tacプロモーター、trcプロモーター及びlacプロモーター等のアロラクトースで誘導されるタイプのプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で接続されてなる遺伝子が導入されてなる形質転換体の場合には、本発明タンパク質の生産を誘導するための誘導剤として、例えば、isopropyl thio-β-D-galactoside（IPTG）を培地中に少量加えることもできる。
【００４５】
本発明遺伝子を保有する形質転換体の培養は、微生物等の宿主細胞の培養に通常使用される方法に準じて行うことができ、例えば、試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーメンター（Jar Fermenter）培養、タンク培養等の液体培養及び固体培養が挙げられる。
培養温度は、該形質転換体が生育可能な範囲で適宜変更できるが、通常約１５～４０℃である。培地のｐHは約６～８の範囲が好ましい。培養時間は、培養条件によって異なるが通常約１日～約５日が好ましい。
【００４６】
本発明遺伝子を保有する形質転換体の培養物から本発明タンパク質を精製する方法としては、通常のタンパク質の精製において使用される方法を適用することができ、例えば、次のような方法を挙げることができる。
【００４７】
まず、形質転換体の培養物から遠心分離等により細胞を集めた後、これを超音波処理、ダイノミル処理、フレンチプレス処理等の物理的破砕法又は界面活性剤若しくはリゾチーム等の溶菌酵素を用いる化学的破砕法等によって破砕する。得られた破砕液から遠心分離、メンブレンフィルター濾過等により不純物を除去することにより無細胞抽出液を調製し、これを陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー等の分離精製方法を適宜用いて分画することによって、本発明タンパク質を精製することができる。
クロマトグラフィーに使用する担体としては、例えば、カルボキシメチル（ＣＭ）基、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）基、フェニル基若しくはブチル基を導入したセルロース

、デキストリン又はアガロース等の不溶性高分子担体が挙げられる。市販の担体充填済カラムを用いることもでき、かかる市販の担体充填済カラムとしては、例えば、Q-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP（商品名、いずれもアマシャム　ファルマシア　バイオテク社製）、ＴＳＫ－ｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷ（商品名、東ソー社製）等が挙げられる。
尚、本発明タンパク質を含む画分を選抜するには、例えば、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を指標にして選抜すればよい。

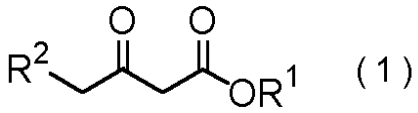
【００４８】

次に、本発明における（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法について説明する。
該製造方法は４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルに本発明タンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする。

【００４９】

４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルは、下記一般式（１）で示される化合物である。

【化１】



（１）

一般式（１）において、R^1は、例えば、Ｃ１－Ｃ８アルキル基を表し、R^2はハロゲン原子を表す。
４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルとしては、具体的には、例えば、４－クロロ－３－オキソ酪酸メチル、４－クロロ－３－オキソ酪酸エチル、４－クロロ－３－オキソ酪酸プロピル、４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル、４－ブロモ－３－オキソ酪酸エチル、４－ブロモ－３－オキソ酪酸プロピル及び４－ブロモ－３－オキソ酪酸オクチル等が挙げられる。

【００５０】

上記方法は、通常、水及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（以下、ＮＡＤＰＨと記す。）の存在下に行われる。この際に用いられる水は、緩衝水溶液であってもよい。該緩衝水溶液に用いられる緩衝剤としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウム水溶液、酢酸カリウム等の酢酸アルカリ金属塩及びこれらの混合物が挙げられる。

【００５１】

上記方法においては、水に加えて有機溶媒を共存させることもできる。共存させることができる有機溶媒としては、例えば、ｔ－ブチルメチルエーテル、ジイソプロプルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル類、ギ酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル等のエステル類、トルエン、ヘキサン、シクロヘヘキサン、ヘプタン、イソオクタン等の炭化水素類、メタノール、エタノール、２－プロパノール、ブタノール、ｔ－ブチルアルコール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド等の有機硫黄化合物、アセトン等のケトン類、アセトニトリル等のニトリル類及びこれらの混合物が挙げられる。

【００５２】

上記方法における反応は、例えば、水、ＮＡＤＰＨ、及び４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルを、本発明タンパク質あるいはそれを産生する形質転換体又はその処理物とともに、必要によりさらに有機溶媒等を含有した状態で、攪拌、振盪等により混合することにより行われる。

【００５３】

上記方法における反応時のｐＨは適宜選択することができるが、通常ｐＨ３～１０の範囲である。また反応温度は適宜選択することができるが、原料及び生成物の安定性、反応速度の点から通常０～６０℃の範囲である。

【００５４】
反応の終点は、例えば、反応液中の４－ハロ－３－オキソ酪酸エステルの量を液体クロマトグラフィー等により追跡することにより決めることができる。
反応時間は適宜選択することができるが、通常０．５時間から１０日間の範囲である。
【００５５】
反応液からの（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの回収は、一般に知られている任意の方法で行えばよい。
例えば、反応液の有機溶媒抽出操作、濃縮操作等の後処理を、必要によりカラムクロマトグラフィー、蒸留等を組み合わせて、行なうことにより精製する方法が挙げられる。
【００５６】
本発明タンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物は種々の形態で上記方法に用いることができる。
【００５７】
具体的な形態としては、例えば、本発明遺伝子を保有する形質転換体の培養物、かかる形質転換体の処理物、無細胞抽出液、粗精製タンパク質、精製タンパク質等及びこれらの固定化物が挙げられる。ここで、形質転換体の処理物としては、例えば、凍結乾燥形質転換体、有機溶媒処理形質転換体、乾燥形質転換体、形質転換体摩砕物、形質転換体の自己消化物、形質転換体の超音波処理物、形質転換体抽出物、形質転換体のアルカリ処理物が挙げられる。また、固定化物を得る方法としては、例えば、担体結合法（シリカゲルやセラミック等の無機担体、セルロース、イオン交換樹脂等に本発明タンパク質等を吸着させる方法）及び包括法（ポリアクリルアミド、含硫多糖ゲル（例えばカラギーナンゲル）、アルギン酸ゲル、寒天ゲル等の高分子の網目構造の中に本発明タンパク質等を閉じ込める方法）が挙げられる。
【００５８】
尚、本発明遺伝子を保有する形質転換体を用いた工業的な生産を考慮すれば、生形質転換体を用いるよりも該形質転換体を死滅化させた処理物を用いる方法が製造設備の制限が少ないという点では好ましい。そのための死菌化処理方法としては、例えば、物理的殺菌法（加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、濾過、通電）や、化学薬品を用いる殺菌法（アルカリ、酸、ハロゲン、酸化剤、硫黄、ホウ素、砒素、金属、アルコール、フェノール、アミン、サルファイド、エーテル、アルデヒド、ケトン、シアン及び抗生物質）が挙げられる。一般的には、これらの殺菌法のうちできるだけ本発明タンパク質の酵素活性を失活させず、かつ反応系への残留、汚染などの影響が少ない処理方法を選択することが望ましい。
【００５９】
また、本発明の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法はＮＡＤＰＨの存在下に行われ、４－ブロモ－３－オキソ酪酸エステルの不斉還元反応の進行に伴い、当該ＮＡＤＰＨは酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（以下、ＮＡＤＰ$^+$と記す）に変換される。変換により生じたＮＡＤＰ$^+$は、ＮＡＤＰ$^+$を還元型（ＮＡＤＰＨ）に変換する能力を有するタンパク質により元のＮＡＤＰＨに戻すことができるので、上記方法の反応系内には、ＮＡＤＰ$^+$をＮＡＤＰＨに変換する能力を有するタンパク質を共存させることもできる。
ＮＡＤＰ$^+$をＮＡＤＰＨに変換する能力を有するタンパク質としては、例えば、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素及び有機脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素等）等が挙げられる。
また、ＮＡＤＰ$^+$をＮＡＤＰＨに変換する能力を有するタンパク質がグルコース脱水素酵素である場合には、反応系内にグルコース等を共存させることにより該タンパク質の活性が増強される場合もあり、例えば、反応液にこれらを加えてもよい。
また、当該タンパク質は、酵素そのものであってもよいし、また該酵素をもつ微生物又は該微生物の処理物の形態で反応系内に共存していてもよい。さらにまた、ＮＡＤＰ$^+$をＮＡＤＰＨに変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を含む形質転換体又はその処理物であってもよい。ここで処理物とは、前述にあ

る「形質転換体の処理物」と同等なものを意味する。

【００６０】

さらに、本発明の（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法では、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素及び有機脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素等）等のようなＮＡＤＰ$^{+}$をＮＡＤＰＨに変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を同時に保有する形質転換体を用いて行うこともできる。

この形質転換体において、両者遺伝子を宿主細胞へ導入する方法としては、例えば、単一である、両者遺伝子を含むベクターを宿主細胞に導入する方法、複製起源の異なる複数のベクターに両者遺伝子を別々に導入した組換ベクターにより宿主細胞を形質転換する方法等があげられる。さらに、一方の遺伝子または両者遺伝子を宿主細胞の染色体中に導入してもよい。

尚、単一である、両者遺伝子を含むベクターを宿主細胞に導入する方法としては、例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域をそれぞれの両者遺伝子に連結して組換ベクターを構築したり、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させるような組換ベクターを構築してもよい。

【００６１】

【実施例】

以下、実施例等により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はそれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

参考例　（ｃＤＮＡライブラリー（A）の調製）

５００ｍｌフラスコに培地（水にポテト・デキストロース・ブロース（ベクトン・ディッキンソン社製）を２４g／Lの割合で溶解したもの）１００ｍｌを入れ、１２１℃で１５分間滅菌した。ここに同組成の培地中で培養（３０℃、４８時間、振盪培養）したペニシリウム・シトリナム（Penicillium citrinum）IFO4631株の培養液０．５ｍｌを加え、３０℃で７２時間振盪培養した。その後、得られた培養液を遠心し（８０００ｘｇ、１０分）、生じた沈殿を集めた。この沈殿を２０mMリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．０）５０ｍｌで3回洗浄して、約１．０ｇの湿菌体を得た。

上記の湿菌体約１．０gを用いて、チオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法で全ＲＮＡを調製することにより、約１．５ｍｇの全ＲＮＡを得た。さらに０．５ｍｇの全ＲＮＡからOligotex(dT)30-Super(宝酒造社製)を用いてpoly(A)を有するＲＮＡ約９．３μｇを得た。

【００６２】

ｃＤＮＡライブラリーの作製はGubler and Hoffman法に基づいて以下のとおり実施した。上記のpoly(A)を有するＲＮＡ（３．０μｇ）とOligo(dT)18-リンカープライマー（（含XhoIサイト）宝酒造社製）、RAV-2　Rtase及びSuperScriptII　Rtaseを用いて一本鎖cDNAを調製し、この反応液（調製された一本鎖ｃＤＮＡを含む）にE. coli DNA polymerase、E. coli Rnase/E. coli DNA Ligase Mixture及びT4 DNA Polymeraseを加え、二本鎖cDNAの合成と平滑末端化を行った。次いで、この二本鎖ｃＤＮＡとEcoRI-NotI-BamHIアダプター（宝酒造社製）とのライゲーションを行った。ライゲーション後のDNAをリン酸化処理、XhoIで切断、スピンカラム(宝酒造社製)で低分子量DNAを除去、λZapII（EcoRI-XhoI切断）とライゲーションを行った後、in vitro packaging kit (STRATAGENE社製)を用いて、パッケージングすることにより、ｃＤＮＡライブラリー（以下、ｃＤＮＡライブラリー（A）と記す。）を得た。

【００６３】

実施例１　（本発明遺伝子の取得及びその解析）

（１）本発明タンパク質の調製

参考例と同様の条件で調製したペニシリウム・シトリナム（Penicillium citrinum）IFO4631株の湿菌体約２３ｇを、５０mMリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．０）１６０ｍｌに懸濁しダイノミル（シンマルエンタープライズ製、ガラスビーズ０．１～０．２mm

Φ、３０００ｒｐｍ、３０分）で破砕した。得られた破砕液を遠心分離（１００００ｘｇ、１０分間）し、上清をさらに超遠心分離（１０００００ｘｇ、１２０分間）して、超遠心上清１６０ｍｌを得た。
得られた超遠心上清１６０ｍｌに硫酸アンモニウムをその濃度が１．５Ｍになるまで徐々に加えた。これを疎水性相互作用クロマトグラフィーカラム［Hi-LoadPhenyl（26/10）（アマシャムファルマシアバイオテク社製）］［１．５Ｍ硫酸アンモニウムを含むＢＩＳ－ＴＲＩＳ－ＰＲＯＰＡＮＥバッファー（２０ｍＭ、ｐＨ７．０）で平衡化したもの］に展着し、硫酸アンモニウムを溶解したＢＩＳ－ＴＲＩＳ－ＰＲＯＰＡＮＥバッファー（硫酸アンモニウム濃度１．５Ｍ→０．６Ｍの濃度勾配）を移動層として溶出し、還元酵素活性を有する画分として硫酸アンモニウム濃度が１．１～０．９Ｍの溶出画分２０ｍｌを得た。

【００６４】
この溶出画分を脱塩し、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（２０ｍＭ、ｐＨ７．７）に置換した。これをイオン交換クロマトグラフィーカラム［Hi-Load　Q Sepharose（16/10）（アマシャムファルマシアバイオテク社製）］［Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（２０ｍＭ、ｐＨ７．７）で平衡化したもの］に展着し、塩化ナトリウムを溶解したＴｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（塩化ナトリウム濃度０→０．５Ｍの濃度勾配）を移動層として溶出し、還元酵素活性を有する画分として塩化ナトリウム濃度０．０２～０．０８Ｍの画分３ｍｌを得た。これを濃縮し、濃縮液をゲル濾過［カラム：スーパーデックス200（10/30）（アマシャムファルマシアバイオテク社製）］［移動層：BIS-TRIS-PROPANEバッファー（20ｍＭ、ｐＨ7.0）］し、還元酵素活性を有する画分として分子量約３３０００ダルトンの部分１ｍｌ（以下、活性画分（Ａ）と記す。）を得た。

【００６５】
尚、クロマトグラフィー等で得られた画分について、以下の操作により還元酵素活性を測定した。
４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル（１．５６ｍｇ／ｍｌ）及びＮＡＤＰＨ（０．２２６ｍｇ／ｍｌ）を溶解したリン酸緩衝液（２０ｍＭ，ｐＨ７．０）０．９ｍｌにクロマトグラフィー等により得られた溶出画分を加えて全量を１ｍｌとし、３７℃で２０秒間保温した後、３４０ｎｍの吸光度を測定した。３４０ｎｍの吸光度からＮＡＤＰＨの消費量を計算して画分の還元酵素活性を求めた。

【００６６】
（２）本発明タンパク質由来の部分ペプチドが有するアミノ酸配列の解析
上記操作により得られた活性画分（Ａ）をLaemmli，U．K.，Nature，(1970) 227，680記載の方法に準じてＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動した。電気泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーＧ２５０染色液（ＢＩＯ－ＲＡＤ社製）で染色し、染色された部分のゲルを切り取った。このゲルをジチオスレイトール及びヨウ化アセトアミドを用いて還元アルキル化し、トリプシンを処理した後、ゲルからペプチドを抽出した。抽出したペプチドをＨＰＬＣ（カラム：TSK gel ODS-80=Ts、2.0㎜×250㎜（東ソー株式会社）、移動層：０．１％トリフルオロ酢酸水／アセトニトリル＝１００／０→２０／８０の濃度勾配）により分取した。分取した各画分のＴＯＦ－ＭＳスペクトルから純度が高いことが判明した５個の画分につきアミノ酸配列をプロテインシークエンサー（４９４ｃＬＣ）により決定した。決定したアミノ酸配列のそれぞれを配列番号３、４、５、６、７に示す。

【００６７】
（３）本発明遺伝子由来の部分塩基配列の解析（その１）
配列番号３で示されるアミノ酸配列を基に、配列番号８、９、１０、１１、１２、１３、１４で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

【００６８】
配列番号８、９、１０、１１、１２、１３、１４で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーのいずれかとＳＫオリゴヌクレオチドプライマー（STRATAGENE社製）とをプライマーに、前記ｃＤＮＡライブラリー（Ａ）を鋳型にして、下記反応液組成、反

応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用した。)

【００６９】

[反応液組成]

cDNAライブラリー原液	1μl
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl
enz.expandHiFi (3.5×10^3U/ml)	0.375μl
超純水	41.725μl

[反応条件]

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER－GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)－50℃(0.5分間)－72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)－55℃(0.5分間)－72℃(2.5分間)のサイクルを２０回行い、さらに72℃で7分間保持した。

【００７０】

その後、ＰＣＲ反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、プライマーとして、配列番号１０で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合、配列番号１２で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合及び配列番号１４で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合において各々約７４０ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。

【００７１】

約７４０ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出されたＰＣＲ反応液のそれぞれをそのまま用いて、上記の約７４０ｂｐのＤＮＡ断片のそれぞれを、ｐCR2.1－TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし（Invitrogen社製TOPO^{TM}TA cloningキット使用）、得られたライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ（１％バクトートリプトン、０．５％バクトー酵母エキス、１％塩化ナトリウム）寒天培地に５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－ガラクトシド（以下、Ｘ－ｇａｌと記す）４％水溶液３０μｌ及び０．１Ｍ IPTG３０μｌを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを１個ずつとり、このコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。

以下、配列番号１０で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてＰＣＲした場合に得られたＤＮＡ断片に由来するプラスミドをプラスミドｐ２７－１、配列番号１２で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてＰＣＲした場合に得られたＤＮＡ断片に由来するプラスミドをプラスミドｐ２７－２及び配列番号１４で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてＰＣＲした場合に得られたＤＮＡ断片に由来するプラスミドをプラスミドｐ２７－３と記す。

【００７２】

プラスミドｐ２７－１、プラスミドｐ２７－２及びプラスミドｐ２７－３のそれぞれに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を解析したところ、挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列はプライマーの塩基は配列部分を除き全て同一であった。

プラスミドｐ２７－１に挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を配列番号１５に示す。

なお、プラスミドに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle s

equencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いて各プラスミドを鋳型としてシークエンス反応を行い、得られたＤＮＡの塩基配列をＤＮＡシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。

【００７３】

（４）本発明遺伝子由来の部分塩基配列の解析（その２）　配列番号１５で示される塩基配列を基に配列番号１６及び配列番号１７で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

【００７４】

配列番号１６で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマー（STRATAGENE社製）とを、又は配列番号１７で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＴ７オリゴヌクレオチドプライマー（STRATAGENE社製）とをプライマーに、前記ｃＤＮＡライブラリー（Ａ）を鋳型にして下記反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【００７５】

［反応液組成］

cDNAライブラリー原液	1μl
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl
enz.expandHiFi (3.5×10^3U/ml)	0.375μl
超純水	41.725μl

【００７６】

［反応条件］

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN　ELMER－GeneAmp　PCR　System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)－55℃(0.5分間)－72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)－55℃(0.5分間)－72℃(2.5分間)のサイクルを２０回行い、さらに72℃で7分間保持した。

【００７７】

その後、ＰＣＲ反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、プライマーとして、配列番号１６で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合には約３５０ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出され、配列番号１７で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＴ７オリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合には約６５０ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。

【００７８】

上記のＰＣＲで得られた約３５０ｂｐのＤＮＡ断片を含有するＰＣＲ反応液又は約６５０ｂｐのＤＮＡ断片を含有するＰＣＲ反応液をそのまま用いて、上記の約３５０ｂｐのＤＮＡ断片と約６５０ｂｐのＤＮＡ断片のそれぞれをｐCR2.1－TOPOベクターの既存「PCR　Product挿入サイト」にライゲーションし（Invitrogen社製TOPO^{TM}TA cloningキット使用）、それぞれのライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地にＸ－ｇａｌ４％水溶液３０μｌ及び０．１Ｍ　IPTG３０μｌを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを１個ずつとり、このコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。

以下、配列番号１６で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＳＫオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてＰＣＲすることにより得られたＤＮＡ断片に由来するプラスミドをプラスミドｐＢＲ－１、配列番号１７で示される塩基配列

を有するオリゴヌクレオチドプライマーとＴ７オリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてＰＣＲすることにより得られたＤＮＡ断片に由来するプラスミドをプラスミドｐＢＲ－２と記す。

【００７９】

次に、プラスミドｐＢＲ－１及びプラスミドｐＢＲ－２のそれぞれに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を解析した。プラスミドｐＢＲ－１に挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を配列番号１８に、プラスミドｐＢＲ－２に挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を配列番号１９に示す。

なお、プラスミドに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いて各プラスミドを鋳型としてシークエンス反応を行い、得られたＤＮＡの塩基配列をＤＮＡシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。

【００８０】

（５）本発明遺伝子の塩基配列の解析

配列番号１５で示される塩基配列を基に配列番号２０で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、また、配列番号１９で示される塩基配列を基に配列番号２１で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

【００８１】

配列番号２０で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２１で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに、前記ｃＤＮＡライブラリー（Ａ）を鋳型にして下記反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【００８２】

［反応液組成］

cDNAライブラリー原液	1μl
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl
enz.expandHiFi (3.5×10^3U/ml)	0.375μl
超純水	41.725μl

【００８３】

［反応条件］

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER－GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)－55℃(0.5分間)－72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)－55℃(0.5分間)－72℃(2.5分間)のサイクルを２０回行い、さらに72℃で7分間保持した。

【００８４】

その後、ＰＣＲ反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、約４００ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。

【００８５】

上記のＰＣＲで得られた約４００ｂｐのＤＮＡ断片を含有するＰＣＲ反応液をそのまま用いて、上記の約４００ｂｐのＤＮＡ断片をpCR2.1－TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし（Invitrogen社製TOPO^{TM}TA cloningキット使用）、該ライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地にＸ－ｇａｌ ４％水溶液３０μｌ及び０．１Ｍ IPTG３０μｌを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを１個とり、このコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。この培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した（以下、このプラスミドをプラスミドｐＢＲ－３と記す）。

【００８６】
次に、プラスミドｐＢＲ－３に挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を解析した。プラスミドｐＢＲ－３に挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を配列番号２２に示す。
なお、プラスミドに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いてプラスミドｐＢＲ－３を鋳型としてシークエンス反応を行い、得られたＤＮＡの塩基配列をＤＮＡシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。
【００８７】
配列番号１８、１９、２２で示される塩基配列を基にＯＲＦ検索を行い、ペニシリウム・シトリナムＩＦＯ４６３１株が有する４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルを不斉還元して（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号２８）を決定した。さらに配列番号２８をもとに該タンパク質のアミノ酸配列（配列番号１）を決定した。なお、配列番号１と配列番号３、４、５、６、７とを比較したところ、配列番号３、４、５、６、７で示されるアミノ酸配列は配列番号１で示されるアミノ酸配列の一部分とほぼ一致することがわかった。
【００８８】
実施例２　（本発明形質転換体の製造及び還元反応例（その１））
（１）本発明ベクターの調製
配列番号１８に示される塩基配列を基に配列番号２３で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを、配列番号１９で示される塩基配列を基に配列番号２４で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。
【００８９】
配列番号２３で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２４で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに、前記ｃＤＮＡライブラリー（Ａ）を鋳型にして下記反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)
【００９０】
［反応液組成］

cDNAライブラリー原液	1μl
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl
enz.expandHiFi (3.5×10^3U/ml)	0.375μl
超純水	41.725μl

【００９１】
［反応条件］
上記組成の反応液が入った容器をPERKIN　ELMER－GeneAmp　PCR　System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを２０回行い、さらに72℃で7分間保持した。
【００９２】
その後、ＰＣＲ反応液を一部とりアガロースゲル電気泳動を行ったところ、約１０００ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。
残りのＰＣＲ反応液に２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）を加え、約１０００ｂｐのＤＮＡ断片を２重消化させ、次いで酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
一方、プラスミドベクターｐＴＶ１１８Ｎ（宝酒造社製）を２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）により２重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
【００９３】
これらの酵素消化させたＤＮＡ断片を混合し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼでライゲーションし

、得られたライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。
得られた形質転換体を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から６コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部をNcoIとBamHIとの２種類の制限酵素により２重消化した後、電気泳動して、取り出したプラスミドには全て前記約１０００ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐＴＲＰｃと記す。）

【００９４】

（２）本発明形質転換体の調製及び還元反応例
プラスミドｐＴＲＰｃを用いてE. coli HB101を形質転換した。得られた形質転換体を０．１mMのＩＰＴＧ及び５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（１００ｍｌ）に接種し、振盪培養した（３０℃、１２時間）。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体０．４ｇを得た。
４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル３００ｍｇ、前記湿菌体０．４ｇ、$NADP^+$９ｍｇ、グルコース７５０ｍｇ、グルコース脱水素酵素（天野製薬製）１．２ｍｇ、１００mMリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）１５ｍｌ及び酢酸ブチル１５ｍｌを混合し、３０℃で７時間撹拌した。なお、撹拌中は反応液のｐＨが６．５±０．２となるように２M炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を下記条件でガスクロマトグラフィーによる含量分析を行ったところ、反応に用いた４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルの量に対して４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルは９８．５％生成していることがわかった。また、下記条件で有機層中の４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ（Ｓ）体が９６．１ ％ｅ．ｅ．であった。さらに該有機層を濃縮することにより、粗（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

【００９５】

（含量分析条件）
カラム：ＨＲ－２０Ｍ（０．５３ｍｍ×３０ｍ、１μｍ）（信和化工社製）
カラム温度：１２０℃（５分）→３℃／分→１５０℃（５分）→１０℃／分→２００℃（５分）
キャリアーガス：ヘリウム（流量：２０ｍｌ／分）
検出器：ＦＩＤ

【００９６】

（光学純度測定条件）
カラム：G-TA（０．２５ｍｍ×３０ｍ、０．１２５μｍ）（アステック社製）
カラム温度：１１０℃（２０分）→５℃／分→１８０℃（１分）
キャリアーガス：ヘリウム（流量：１ｍｌ／分）
検出器：ＦＩＤ
スプリット比：1/５０
　尚、生成物の絶対立体配置は（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの標品と比較することにより決定した。

【００９７】

実施例３　（本発明形質転換体の製造及び還元反応例（その２））（１）本発明ベクターの調製
プラスミドｐＴＲＰｃを２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）により２重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
一方、プラスミドベクターｐＴｒｃ９９Ａ（Pharmacia製）を２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）により２重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
これらの酵素消化させたＤＮＡ断片を混合し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼでライゲーションし

、得られたライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。
得られた形質転換体を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から６コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。
それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部を２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）により２重消化した後、電気泳動することにより、取り出したプラスミドには全て目的とするＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐＴｒｃＲＰｃと記す。）

【００９８】
（２）本発明形質転換体の調製及び還元反応例　プラスミドｐＴｒｃＲＰｃを用いてE. coli HB101を形質転換した。
得られた形質転換体を０．１ｍＭのＩＰＴＧ及び５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（１００ｍｌ）に接種し、振盪培養した（３０℃、１２時間）。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体０．４ｇを得た。
４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル１５００ｍｇ、前記湿菌体０．４ｇ、$NADP^+$１８ｍｇ、グルコース３０００ｍｇ、グルコース脱水素酵素（天野製薬製）３ｍｇ、１００ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）１５ｍｌ及び酢酸ブチル１５ｍｌを混合し、３０℃で７時間攪拌した。なお、攪拌中は反応液のｐＨが６．５±０．２となるように２Ｍ炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を実施例２の含量分析条件により含量分析を行ったところ、反応に用いた４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルの量に対して４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルは９９．２％生成していることがわかった。また、実施例２の光学純度測定条件で有機層中の４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ（Ｓ）体が９５．７％ｅ．ｅ．であった。
さらに該有機層を濃縮することにより、粗（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

【００９９】
実施例４　（本発明形質転換体の製造及び還元反応例（その３））
（１）酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を調製するための準備
Bacillus megaterium IFO12108株を滅菌したＬＢ培地１００ｍｌ中で培養し、菌体０．４ｇを得た。この菌体からQiagen Genomic Tip (Qiagen社製)を用い、それに付属のマニュアルに記載の方法にしたがって染色体ＤＮＡ（以下、染色体ＤＮＡ（Ｂ）と記す。）を精製した。
（２）酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の調製
The Journal of Biological Chemistry Vol.264, No.11, 6381-6385(1989)に記載されたBacillus megaterium IWG3由来のグルコース脱水素酵素の配列をもとに配列番号２５で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２６で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとを合成した。
配列番号２５で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２６で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用い、前記染色体ＤＮＡ（Ｂ）を鋳型にして以下の反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【０１００】
［反応液組成］
染色体DNA原液　１μｌ

dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl
enz.expandHiFi (3.5x10^3U/ml)	0.375μl
超純水	41.725μl

【０１０１】
［PCR反応条件］
上記組成に反応液が入った容器をPERKIN ELMER－GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72?（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを２０回、さらに72℃で7分間保持した。
【０１０２】
その後、ＰＣＲ反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、約９５０ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。
得られたＰＣＲ反応液とInvitrogen社製TOPO^{TM}TA cloningキットVer.Eとを用いて、ＰＣＲによって得られた約９５０ｂｐのＤＮＡ断片をｐCR2.1－TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、そのライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地にＸ－ｇａｌ４％水溶液３０μｌ及び０．１Ｍ IPTG３０μｌを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを１個とり、このコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。次いで培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドの一部を制限酵素（EcoRI）で消化し、電気泳動することにより、該プラスミドには約９５０ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐＳＤＧＤＨ１２と記す。）
【０１０３】
次に、プラスミドｐＳＤＧＤＨ１２に挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を解析した。その結果を配列番号２７に示す。
なお、プラスミドに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いてプラスミドｐＳＤＧＤＨ１２を鋳型としてシークエンス反応を行い、得られたＤＮＡの塩基配列をＤＮＡシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。
【０１０４】
（３）本発明ベクターの調製
プラスミドｐＳＤＧＤＨ１２を２種類の制限酵素（BamHIとXbaI）で二重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
一方、プラスミドｐＴｒｃＲＰｃを２種類の制限酵素（BamHIとXbaI）で二重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
それぞれの酵素消化されたＤＮＡ断片をT4 DNAリガーゼでライゲーションし、そのライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。得られた形質転換体を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地で培養し、生育してきたコロニーから６コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部をBamHIとXbaIの2種類の制限酵素で二重消化した後、電気泳動することによって、取り出したプラスミドは全て目的とする約１０００ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した（以下、このプラスミドを以下プラスミドｐＴｒｃＲＳｂＧ１２と記す）。
【０１０５】

（４）本発明形質転換体の調製及び還元反応例
プラスミドｐＴｒｃＲＳｂＧ１２を用いてE. coli HB101を形質転換した。得られた形質転換体を０．１ｍＭのＩＰＴＧと５０μｇ／ｍｌのアンピシリンとを含有する滅菌ＬＢ培地（１００ｍｌ）に接種し、振盪培養した（３０℃、１２時間）。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体０．３ｇを得た。
４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル０．３ｇ、上記湿菌体０．３ｇ、ＮＡＤＰ$^{+}$９ｍｇ、グルコース７５０ｍｇ、１００ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）１５ｍｌ、酢酸ブチル１５ｍｌを混合し、３０℃で７時間攪拌した。なお、攪拌中は反応液のｐＨが６．５±０．２となるように２Ｍ炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を実施例２に記載した含量分析条件により含量分析を行ったところ、反応に用いた４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルの量に対して４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルは９９％生成していることがわかった。また、実施例２に記載した光学純度測定条件で有機層中の４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ（Ｓ）体が９６．０％ｅ．ｅ．であった。
さらに得られた有機層を濃縮することにより、粗（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを得る。
【０１０６】
実施例５　(本発明形質転換体の製造及び還元反応例（その４））（１）本発明ベクターの調製（３'末端欠失型の組換ベクターの構築）　配列番号１９で示される塩基配列を基に配列番号２９で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。
【０１０７】
配列番号２３で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２９で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに、前記プラスミドｐＴＲＰｃを鋳型にして下記反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)
【０１０８】
［反応液組成］

プラスミドｐＴＲＰｃ溶液	1μl
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl
enz.expandHiFi (3.5×10^{3}U/ml)	0.375μl
超純水	41.725μl

【０１０９】
［反応条件］
上記組成の反応液が入った容器をPERKIN　ELMER－GeneAmp　PCR　System2400にセットし、97?（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを２０回行い、さらに72℃で7分間保持した。
【０１１０】
その後、ＰＣＲ反応液を一部とりアガロースゲル電気泳動を行ったところ、約１０００ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。
残りのＰＣＲ反応液を精製し、２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）を加え、約１０００ｂｐのＤＮＡ断片を２重消化させ、次いで酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
一方、プラスミドベクターｐＴＶ１１８Ｎ（宝酒造社製）を２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）により２重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。
【０１１１】
これらの酵素消化させたＤＮＡ断片を混合し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。
得られた形質転換体を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地で培養し、

生育してきたコロニーの中から６コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部をNcoIとBamHIとの２種類の制限酵素により２重消化した後、電気泳動して、取り出したプラスミドには全て前記約１０００ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐＴＲＰｃSと記す。）

【０１１２】

次に、プラスミドｐＴＲＰｃSに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を解析した。プラスミドｐＴＲＰｃSに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列を配列番号３０に示す。

なお、プラスミドに挿入されたＤＮＡ断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いてプラスミドｐＴＲＰｃSを鋳型としてシークエンス反応を行い、得られたＤＮＡの塩基配列をＤＮＡシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。

【０１１３】

（２）本発明形質転換体の調製及び還元反応例

プラスミドｐＴＲＰｃSを用いてE. coli HB101を形質転換した。得られた形質転換体を０．１mMのＩＰＴＧ及び５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（１００ｍｌ）に接種し、振盪培養した（３０℃、１８時間）。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体０．４ｇを得た。

４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル３００ｍｇ、前記湿菌体０．４ｇ、ＮＡＤＰ$^{+}$９ｍｇ、グルコース７５０ｍｇ、グルコース脱水素酵素（天野製薬製）１．２ｍｇ、１００mMリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）１５ｍｌ及び酢酸ブチル１５ｍｌを混合し、３０℃で１９時間攪拌した。なお、攪拌中は反応液のｐＨが６．５±０．２となるように２M炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を下記条件でガスクロマトグラフィーによる含量分析を行ったところ、反応に用いた４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルの量に対して４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルは９７．３％生成していることがわかった。また、下記条件で有機層中の４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ（Ｓ）体が９６．５％ｅ．ｅ．であった。さらに該有機層を濃縮することにより、粗（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

【０１１４】

実施例６　(本発明形質転換体の製造及び還元反応例（その４））

（プラスミドpTRPcとプラスミドpAGDH12を用いた形質転換体の構築と反応）

（１）　酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を含む組換ベクターの調製（その１：プラスミドpTGDH12の構築）

配列番号２７で示される塩基配列を基に配列番号３１で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号３２で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとを合成した。

配列番号３１で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号３２で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用い、前記染色体ＤＮＡ（Ｂ）を鋳型にして以下の反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【０１１５】

［反応液組成］

染色体DNA原液	1μl
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4μl
プライマー(20pmol/μl)	各0.75μl
10xbuffer(with MgCl)	5μl

enz.expandHiFi (3.5x10^3U/ml) 0.375μl
超純水 41.725μl

【０１１６】

［PCR反応条件］

上記組成に反応液が入った容器をPERKIN ELMER－GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを２０回、さらに72℃で7分間保持した。

【０１１７】

その後、ＰＣＲ反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、約８５０ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。

残りのＰＣＲ反応液を精製し、２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）を加え、約８５０ｂｐのＤＮＡ断片を２重消化させ、次いで酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。

一方、プラスミドベクターｐＴＶ１１８Ｎ（宝酒造社製）を２種類の制限酵素（NcoI及びBamHI）により２重消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。

【０１１８】

これらの酵素消化させたＤＮＡ断片を混合し、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。

得られた形質転換体を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から６コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部をNcoIとBamHIとの２種類の制限酵素により２重消化した後、電気泳動して、取り出したプラスミドには全て前記約８５０ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐTGDH１２と記す。）

【０１１９】

（２） 酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を含む組換ベクターの調製（その２：プラスミドpCGDH12の構築）

プラスミドベクターｐＴＶ１１８Ｎ（宝酒造社製）の配列をもとに配列番号３３で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

配列番号３３で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号３２で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用い、プラスミドｐTGDH１２を鋳型にして以下の反応液組成、反応条件でＰＣＲを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【０１２０】

［反応液組成］

プラスミドｐTGDH１２溶液 1μl
dNTP(各2.5mM-mix) 0.4μl
プライマー(20pmol/μl) 各0.75μl
10xbuffer(with MgCl) 5μl
enz.expandHiFi (3.5x10^3U/ml) 0.375μl
超純水 41.725μl

【０１２１】

［PCR反応条件］

上記組成に反応液が入った容器をPERKIN ELMER－GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃（1.5分間）のサイクルを１０回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを２０回、さらに72℃で7分間保持した。

【０１２２】
その後、ＰＣＲ反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、約１０００ｂｐのＤＮＡ断片のバンドが検出された。
得られたＰＣＲ反応液とInvitrogen社製TOPO^{TM}TA cloningキットVer.Eとを用いて、ＰＣＲによって得られた約１０００ｂｐのＤＮＡ断片をｐCR2.1－TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、そのライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地にＸ－ｇａｌ４％水溶液３０μｌ及び０．１Ｍ　IPTG３０μｌを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを1個とり、このコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０℃、２４時間）。次いで培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドの一部を制限酵素（BamHI）で消化し、電気泳動することにより、該プラスミドには約１０００ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐCGＤＨ１２と記す。）
【０１２３】
（３）酸化型β－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸を還元型に変換する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を含む組換ベクターの調製（その３：プラスミドpAGDH12の構築）
プラスミドｐCGＤＨ１２を制限酵素（BamHI）で消化させ、酵素消化された約１０００ｂｐＤＮＡ断片を精製した。
一方、プラスミドベクターｐACYC184（ニッポンジーン社製）を制限酵素（BamHI）により消化させ、酵素消化されたＤＮＡ断片を精製した。さらに、セルフライゲーションを防ぐため、Alkaline Phospatase（宝酒造社製）を用いて脱リン酸化処理を行った。
【０１２４】
これらの酵素消化させたＤＮＡ断片を混合し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5αを形質転換した。
得られた形質転換体を２０μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含有するＬＢ寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から４コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ２０μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含有する滅菌ＬＢ培地（２ｍｌ）に接種し、試験管中で振盪培養した（３０?、２４時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素（BamHI）により消化した後、電気泳動して、取り出したプラスミドはに全て前記約１０００ｂｐのＤＮＡ断片が挿入されていることを確認した。（以下、このプラスミドをプラスミドｐAGDH１２と記す。）
【０１２５】
（４）本発明形質転換体の調製及び還元反応例　プラスミドｐＴＲＰｃおよびpAGDH12を用いてE. coli HB101を形質転換した。得られた形質転換体を０．１ｍＭのＩＰＴＧ及び５０μｇ／ｍｌのアンピシリン及び２０μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含有する滅菌ＬＢ培地（１００ｍｌ）に接種し、振盪培養した（３０℃、１８時間）。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体０．４ｇを得た。
４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチル３００ｍｇ、前記湿菌体０．４ｇ、ＮＡＤＰ$^{+}$９ｍｇ、グルコース７５０ｍｇ、１００ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）１５ｍｌ及び酢酸ブチル１５ｍｌを混合し、３０℃で１９時間攪拌した。なお、攪拌中は反応液のｐＨが６．５±０．２となるように２Ｍ炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を下記条件でガスクロマトグラフィーによる含量分析を行ったところ、反応に用いた４－ブロモ－３－オキソ酪酸メチルの量に対して４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルは９８．６％生成していることがわかった。また、下記条件で有機層中の４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ（Ｓ）体が９６．２％ｅ．ｅ．であった。

さらに該有機層を濃縮することにより、粗（Ｓ）－４－ブロモ－３－ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

【０１２６】

【発明の効果】

本発明によれば、（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルを製造するために優れた触媒能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、該タンパク質、及びこれを利用した（Ｓ）－４－ハロ－３－ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法等が提供される。

【０１２７】

「配列表フリーテキスト」

配列番号８

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号９

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１０

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１１

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１２

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１３

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１４

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１６

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号１７

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２０

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２１

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２３

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２４

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２５

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２６

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号２９

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号３１

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号３２

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号３３

ＰＣＲのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

【０１２８】

【配列表】

〈110〉 Sumitomo Chemical Co., Ltd

〈120〉 Reductase gene and Use thereof

〈130〉 P153589

〈150〉 JP 2001/175175
〈151〉 2001-06-11

〈160〉 27

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

〈210〉 1
〈211〉 325
〈212〉 PRT
〈213〉 Penicillium citrinum

〈400〉 1

Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro
1 5 10 15

Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr
20 25 30

Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp
35 40 45

Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg

50 55 60

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val
65 70 75 80

Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp
85 90 95

Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met
100 105 110

Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu
115 120 125

Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr
130 135 140

Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp
145 150 155 160

Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu
165 170 175

Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile
180 185 190

Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe
195 200 205

Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn
210 215 220

Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn
225 230 235 240

Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala
245 250 255

Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro
260 265 270

Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp
275 280 285

Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val
290 295 300

Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala
305 310 315 320

Lys Asn Leu Ser Ala
325

〈210〉 2
〈211〉 978
〈212〉 DNA
〈213〉 Penicillium citrinum

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (1)...(978)

〈400〉 2

```
atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct   48
Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro
 1               5                  10                  15

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc   96
Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr
            20                  25                  30

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac  144
Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp
        35                  40                  45

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt  192
Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg
    50                  55                  60

gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc  240
Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val
65                  70                  75                  80

tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg  288
Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp
                85                  90                  95
```

```
tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg   336
Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met
            100                 105                 110

ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gag aag aat ggc cag ggt gag   384
Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu
        115                 120                 125

ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc   432
Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr
    130                 135                 140

gag aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gag aag att tat gag gat   480
Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp
145                 150                 155                 160

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt   528
Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu
                165                 170                 175

gag aag atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc   576
Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile
            180                 185                 190

gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc   624
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe
        195                 200                 205
```

```
tcc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tcg cag aac   672
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn
    210                 215                 220

cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac   720
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn
225                 230                 235                 240

gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc   768
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala
                245                 250                 255

tgg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc   816
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro
            260                 265                 270

aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac   864
Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp
        275                 280                 285

ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc   912
Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val
    290                 295                 300

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc   960
Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala
305                 310                 315                 320

aag aac ctg tct gcg tga                                          978
```

Lys Asn Leu Ser Ala
325

〈210〉 3
〈211〉 17
〈212〉 PRT
〈213〉 Penicillium citrinum

〈400〉 3
Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn Gln Val
1 5 10 15

Pro

〈210〉 4
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 Penicillium citrinum

〈400〉 4
Ile Pro Gly Val Phe Gly Thr Phe Ala Ser
1 5 10

〈210〉 5
〈211〉 17

〈212〉 PRT
〈213〉 Penicillium citrinum

〈400〉 5
Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala
1 5 10 15

Lys

〈210〉 6
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Penicillium citrinum

〈400〉 6
Met Ile Gly Val Ala Asn Tyr Thr Ile Ala Asp Leu Glu Lys
1 5 10

〈210〉 7
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Penicillium citrinum

〈400〉 7
Tyr Glu Asp Val Leu Xaa Xaa Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg
1 5 10

〈210〉 8
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 8
ggaacytgrt tytggswacc 20

〈210〉 9
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR
〈400〉 9
tangcnacng gcataatatt 20

〈210〉 10
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR
〈400〉 10
tangcnacng gcataatgtt 20

〈210〉 11
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 11
tangcnacng gcatgatatt 20

〈210〉 12
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 12
tangcnacng gcatgatgtt 20

〈210〉 13
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 13
tangcnacng gcattatatt 20

〈210〉 14
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 14
tangcnacng gcattatgtt 20

〈210〉 15
〈211〉 697
〈212〉 DNA

〈213〉 Escherichia coli

〈400〉 15

cgctctaaaa ctantggatc ccccgggctg caggaattcg gcggcggcgg atccaacgga 60
aanactttca cactgagcaa cggcgtcaaa attcctggcg tcggctttgg tacctncgct 120
agtgaaggtt ccaagggcga aacctatnct gctgtcacca ctgccctgaa aaccggttac 180
cgtcnctigg actgtgcctg gtactacctg aacaagggtg aggttggtga gggtntccgt 240
gacttcctga aggaaaaccc ctcggtgaag cgtgaggaca tcttcgtctg caccaaggtg 300
tggaaccacc tccaccgtta tgaggacgtc ctctggtcca ttgacnactc cctgaagcgt 360
cttggacttg actacgttga tatgttcctc gttcactggc ccattgctgc cgaaaaaaat 420
ggccagggtg agcccaaaat tggccctgac ggcaaatacn tcnttctcaa ggacctgacc 480
gaaancccna ncccacctgg cgcgctatgg aaaaaatttn tgangatccc aaggccaggt 540
ccattggtgt ttccaattgg accattgccg accttgagaa gatgtccaag ttngccaagg 600
tnatgcctca cgccaaccag atcgagattc acccccttcct gcccaacgag gagctggtgc 660
agtactgctt ttccaagaac antatgcccg tagcgta 697

〈210〉 16
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 16
ggaggtggtt ccacaccttg g 21

〈210〉 17
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 17
caaccagatc gagattcacc 20

〈210〉 18
〈211〉 331
〈212〉 DNA
〈213〉 Escherichia coli

〈400〉 18
cgctctaaaa ctantggatc ccccgggctg caggaattcg gcggccgcgg atccttcatc 60
cccatcatgt ctaacggaaa gactttcaca ttgagcaacg gcgtcaagat tcctggcgtc 120
ggctttggta ccttcgctag tgaaggttcc aagggcgaga cctatactgc tgtcaccact 180
gccctgaaga ccggttaccg tcacttggac tgtgcctggt actacctgaa cgagggtgag 240
gttggtgagg gtatccgtga cttcctgaag gagaacccct cggtgaagcg tgaggacatc 300
ttcgtctgca ccaaggtgtg gaaccacctc c 331

〈210〉 19
〈211〉 743
〈212〉 DNA

〈213〉 Escherichia coli

〈400〉 19

caaccagatc gagattcacc ccttcctgcc caacgaggag ctggtgcagt actgcttctc 60
caagaacatt atgcccgtgg cctactctcc tctgggctcg cagaaccagg ttcccaccac 120
cggtgagcgg gtcagcgaga acaagactct gaacgagatc gccgagaagg gcggcaacac 180
ccttgctcag gttcttattg cctggggtct gcgccgtggc tacgtcgttc tccccaagag 240
ctccaacccc aagcgcattg agtccaactt caagagcatt gagctctccg atgccgactt 300
tgaagccatc aatgccgttg ccaagggtcg tcacttccgt ttcgtcaaca tgaaggatac 360
tttcggatat gatgtctggc ccgaggagac cgccaagaac ctgtctgcgt gaatctctac 420
gaaattataa aatnacaccn acnaaaancc aaagcganag gatgatnccc aaaantttig 480
agggtttctt ggttgaaaac gtttantgan cccgaantga angaatagat gancntgatt 540
tctccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacggtc cgcggccgct ccnngggggg gcccggttcc 600
caattcnccc cttatnattg aattcttttt taanggggnc aaattccncc nnatttccnt 660
cnanattggn nggccgcctc caaactttcn tcntnaaagg gncccaattc ccccccnatt 720
aantggantt cctntttacc ttt 743

〈210〉 20
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed origonucleotide primer for PCR

〈400〉 20
ccaaggtgtg gaaccacctc c 21

〈210〉 21
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed origonucleotide primer for PCR

〈400〉 21
ccagaggaga gtaggccacg g 21

〈210〉 22
〈211〉 417
〈212〉 DNA
〈213〉 Escherichia coli

〈400〉 22
ccaaggtgtg gaaccacctc caccgttatg aggacgtcct ctggtccatt gacgactccc 60
tgaagcgtct tggacttgac tacgttgata tgttcctcgt tcactggccc attgctgccg 120
agaagaatgg ccagggtgag cccaagattg gccctgacgg caaatacgtc attctcaagg 180
acctgaccga gaaccccgag cccacatggc gcgctatgga gaagatttat gaggatcgca 240
aggccaggtc cattggtgtc tccaactgga ccattgccga ccttgagaag atgtccaagt 300
tcgccaaggt catgcctcac gccaaccaga tcgagattca ccccttcctg cccaacgagg 360
agctggtgca gtactgcttc tccaagaaca ttatgcccgt ggcctactct cctctgg 417

〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 23
gccatggcta tgtctaacgg aaagact 27

〈210〉 24
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 24
cggatccgtt ataatttcgt agagattca 29

〈210〉 25
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 25
gatcatcata gcaggagtca t 21

〈210〉 26
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 26
gaattcaaca ccagtcagct c 21

〈210〉 27
〈211〉 786
〈212〉 DNA
〈213〉 Escherichia coli

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (1)...(786)

〈400〉 27
atg tat aaa gat tta gaa gga aaa gta gtt gtc ata aca ggt tca tct 48

```
Met Tyr Lys Asp Leu Glu Gly Lys Val Val Val Ile Thr Gly Ser Ser
 1               5                  10                  15

acc ggt tta gga aaa gca atg gcg att cgt ttt gcg aca gaa aaa gct   96
Thr Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Ala Thr Glu Lys Ala
            20                  25                  30

aaa gta gtt gtg aac tat cgt tcg aaa gaa gaa gaa gct aac agc gtt   144
Lys Val Val Val Asn Tyr Arg Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asn Ser Val
        35                  40                  45

tta gaa gaa att aaa aaa gtg ggc gga gag gct att gcc gtc aaa ggt   192
Leu Glu Glu Ile Lys Lys Val Gly Gly Glu Ala Ile Ala Val Lys Gly
    50                  55                  60

gat gta aca gtt gag tct gat gtg atc aat tta gtt caa tct gct att   240
Asp Val Thr Val Glu Ser Asp Val Ile Asn Leu Val Gln Ser Ala Ile
65                  70                  75                  80

aaa gaa ttt gga aag cta gac gtt atg att aat aac gca gga atg gaa   288
Lys Glu Phe Gly Lys Leu Asp Val Met Ile Asn Asn Ala Gly Met Glu
                85                  90                  95

aat ccg gtt tcg tct cat gaa atg tct tta agt gat tgg aat aaa gtc   336
Asn Pro Val Ser Ser His Glu Met Ser Leu Ser Asp Trp Asn Lys Val
            100                 105                 110

att gat acg aac tta acg gga gca ttt tta ggc agc cgt gaa gcg att   384
Ile Asp Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
```

115 120 125

aaa tat ttt gtg gaa aat gat att aag gga aca gtt att aac atg tcg 432
Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Thr Val Ile Asn Met Ser
130 135 140

agt gtt cac gag aaa att cct tgg cca tta ttt gtt cat tac gca gca 480
Ser Val His Glu Lys Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
145 150 155 160

agt aaa ggc gga atg aag ctc atg acc gaa aca ctt gca tta gaa tac 528
Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
165 170 175

gct cca aaa ggt att cgt gta aat aac att gga ccg gga gcg att aat 576
Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
180 185 190

aca ccg att aac gct gag aaa ttt gct gat cct gag cag cgt gca gat 624
Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Glu Gln Arg Ala Asp
195 200 205

gta gaa agc atg att cca atg gga tac att gga gag ccg gaa gaa att 672
Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
210 215 220

gca gcg gtt gct gca tgg cta gct tct tca gag gca agt tat gta aca 720
Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Ser Glu Ala Ser Tyr Val Thr
225 230 235 240

ggg att aca ctc ttt gct gac ggc ggt atg aca cag tac cca tca ttc 768
Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe
245 250 255

caa gca gga cgc gga taa 786
Gln Ala Gly Arg Gly
260

〈210〉 28
〈211〉 996
〈212〉 DNA
〈213〉 Penicillium citrinum

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (1)...(978)

〈400〉 28
atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct 48
Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro
1 5 10 15

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc 96
Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr
20 25 30

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac 144

```
Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp
        35                  40                  45

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt   192
Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg
    50                  55                  60

gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc   240
Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val
65                  70                  75                  80

tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg   288
Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp
                85                  90                  95

tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg   336
Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met
            100                 105                 110

ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gag aag aat ggc cag ggt gag   384
Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu
        115                 120                 125

ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc   432
Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr
    130                 135                 140

gag aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gag aag att tat gag gat   480
Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp
```

```
145                 150                 155                 160

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt   528
Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu
                165                 170                 175

gag aag atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc   576
Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile
            180                 185                 190

gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc   624
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe
        195                 200                 205

tcc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tcg cag aac   672
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn
    210                 215                 220

cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac   720
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn
225                 230                 235                 240

gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc   768
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala
                245                 250                 255

tgg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc   816
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro
            260                 265                 270
```

aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac 864
Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp
275 280 285

ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc 912
Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val
290 295 300

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc 960
Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala
305 310 315 320

aag aac ctg tct gcg tga atctctacga aattataa 996
Lys Asn Leu Ser Ala
325

〈210〉 29
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 29
cggatccgtt cacgcagaca ggttcttgg 29

〈210〉 30

〈211〉 978
〈212〉 DNA
〈213〉 Penicillium citrinum

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (1)...(978)

〈400〉 30

```
atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct   48
Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro
 1               5                  10                  15

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc   96
Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr
            20                  25                  30

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac  144
Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp
        35                  40                  45

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt  192
Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg
    50                  55                  60

gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc  240
Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val
65                  70                  75                  80
```

```
tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg   288
Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp
                85                  90                  95

tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg   336
Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met
            100                 105                 110

ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gag aag aat ggc cag ggt gag   384
Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu
        115                 120                 125

ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc   432
Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr
    130                 135                 140

gag aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gag aag att tat gag gat   480
Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp
145                 150                 155                 160

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt   528
Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu
                165                 170                 175

gag aag atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc   576
Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile
            180                 185                 190

gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc   624
```

```
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe
        195                 200                 205

tcc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tcg cag aac   672
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn
    210                 215                 220

cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac   720
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn
225                 230                 235                 240

gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc   768
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala
                245                 250                 255

tgg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc   816
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro
            260                 265                 270

aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac   864
Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp
        275                 280                 285

ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc   912
Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val
    290                 295                 300

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc   960
Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala
```

305 310 315 320

aag aac ctg tct gcg tga 978
Lys Asn Leu Ser Ala
325

〈210〉 31
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 31
gccatggcta tgtataaaga tttagaa 27

〈210〉 32
〈211〉 23
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 32
cggatccgtt atccgcgtcc tgc 23

〈210〉 33

〈211〉 28

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Designed oligonucleotide primer for PCR

〈400〉 33

cggatccgag cgcccaatac gcaaaccg 28

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	***9/02***	***(2006.01)***	C12N	9/02	
C12P	***7/62***	***(2006.01)***	C12P	7/62	
C12R	*1/80*	*(2006.01)*	C12N	15/00	ZNAA
C12R	*1/19*	*(2006.01)*	C12R	1:80	
			C12N	1/21	
			C12R	1:19	
			C12N	9/02	
			C12R	1:80	
			C12P	7/62	
			C12R	1:19	

審査官　三原　健治

(56)参考文献　Enzyme Microb. Technol., １９９２年　９月, vol.14, no.9, p.731-738

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)

C12N 15/00-15/90
C12N 9/00- 9/08
C12P 7/00- 7/66
UniProt/Geneseq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDream2)