

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815348.3

C07K 14/01

C07K 14/06

C12N 9/10

C12N 15/54

C12N 15/01

C12N 15/63

C12N 1/21

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665833A

[22] 申请日 2003.6.23 [21] 申请号 03815348.3

[30] 优先权

[32] 2002.6.28 [33] FR [31] 02/08057

[86] 国际申请 PCT/FR2003/001926 2003.6.23

[87] 国际公布 WO2004/003012 法 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.28

[71] 申请人 安万特医药股份有限公司

地址 法国安东尼

[72] 发明人 N·巴马-雅克 D·蒂博

A·方雄

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 4 页 说明书 40 页 序列表 3 页
附图 13 页

[54] 发明名称 新的链霉菌属细菌 PapM 多肽变异体

[57] 摘要

本发明涉及新的链霉菌属细菌 PapM 多肽变异体，与野生型多肽比较，该多肽变异体具有底物选择性和/或增强的效力。本发明也涉及编码所述变异体的核酸，涉及引入了所述核酸的微生物和它们用于生产链阳性菌素 B 成分的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、链霉菌属细菌的 PapM 多肽的变异体，其通过一个或多个氨基酸置换，衍生自始旋链霉菌野生型 PapM 多肽序列或同源多肽序列，其中所述氨基酸选自：

- a) 始旋链霉菌 PapM 多肽的残基 Gly249，
- b) 始旋链霉菌 PapM 多肽的残基 Thr192，
- c) 同源肽中等价于 a) 或 b) 的残基。

2、如权利要求 1 所述的变异体，其衍生自多肽序列 SEQ ID NO.2，并且其至少显示出一个在 249 位置的丝氨酸对甘氨酸的置换。

3、如权利要求 1 所述的变异体，其衍生自多肽序列 SEQ ID NO.2，并且其至少显示出一个在 192 位置的异亮氨酸对苏氨酸的置换。

4、如权利要求 1 所述的变异体，其衍生自 SEQ ID NO.2，并且其至少显示出一个在 249 位置的丝氨酸对甘氨酸的置换，和一个在 192 位置的异亮氨酸对苏氨酸的置换。

5、编码权利要求 1 至 4 任一项所述的变异体的核酸。

6、如权利要求 5 所述的核酸，其衍生自 SEQ ID NO.1 中所示核苷酸序列，或者衍生自由于遗传密码简并性所致的衍生序列。

7、如权利要求 6 所述的核酸，其在位于 193-196 位置的 NPPY 基序上游包含至少一个错义突变。

8、如权利要求 7 所述的核酸，其中错义突变导致非保守性氨基酸改变。

9、如权利要求 8 所述的核酸，其至少包含一个在 658 位置的胸腺嘧啶对胞嘧啶的置换（C658T）。

10、如权利要求 6 所述的核酸，其至少包含一个在 828 位置的腺嘌呤对鸟嘌呤的置换（G828A）。

11、如权利要求 8 所述的核酸，其至少包含一个在 828 位置的腺嘌呤对鸟嘌呤的置换（G828A）和一个在 658 位置的胸腺嘧啶对胞嘧啶的置换（C658T）。

12、包含权利要求 5 至 11 任一项所述的核酸的重组 DNA。

13、自主复制和/或整合的表达载体，其包含权利要求 5 至 11 任一项所述的核酸或权利要求 12 所述的重组 DNA。

14、如权利要求 13 所述的载体，其包含图 11 中所示的载体 pVRC1306 的所有或部分。

15、含有权利要求 5 至 11 任一项所述的核酸和/或权利要求 12 所述的重组 DNA 和/或权利要求 13 或 14 所述的表达载体的宿主细胞。

16、如权利要求 15 所述的宿主细胞，其选自：大肠杆菌，始旋链霉菌，橄榄色链霉菌 ATCC12019, *Streptomyces ostreogriseus* ATCC27455, 三鹰链霉菌 ATCC15297, 劳意德链霉菌 ATCC11415, 禾生链霉菌和淀粉酶链霉菌。

17、制备权利要求 1 至 4 任一项所述的变异体的方法，其中培养权利要求 15 或 16 的宿主细胞，并且回收产生的多肽。

18、表达权利要求 1 至 4 任一项所述的变异体的权利要求 15 或 16 的宿主细胞在生物转化反应中的用途。

19、权利要求 5 至 11 任一项所述的核酸在改变链阳性菌素生产菌株中各种链阳性菌素 B 成分的比例中的用途

20、如权利要求 19 所述的用途，其用于生产 PIB，其中所用核酸是编码权利要求 1 至 4 任一项所述的变异体的核酸，且链阳性菌素生产菌株是始旋链霉菌株系。

21、如权利要求 19 所述的用途，其用于生产 PIA，其中所用核酸是编码权利要求 8 所述的变异体的核酸，且链阳性菌素生产菌株是始旋链霉菌株系。

22、制备链阳性菌素的一种或多种 B 成分的方法，其中

-失活生产链阳性菌素或潜在生产链阳性菌素的菌株中的 papM 基因，并且引入一个或多个编码权利要求 1 至 4 任一项所述的 PapM 变异体的核酸拷贝，

-在产生链阳性菌素的条件下培养所述菌株，和

-回收产生的一种或多种链阳性菌素 B 成分。

23、如权利要求 22 所述的方法，其中链阳性菌素生产菌株是来源于始旋链霉菌，优选地来源于始旋链霉菌 SP92 株系或来源于橄榄色链霉菌 ATCC12019, *Streptomyces ostreogriseus* ATCC27455, 三鹰链霉菌 ATCC15297, 劳意德链霉菌 ATCC11415, 禾生链霉菌和淀粉酶链霉菌的原始霉素生产菌株。

24、如权利要求 22 或 23 所述的方法，其中链阳性菌素生产菌株是产生少量或不可检测到的量的链阳性菌素 A 成分的菌株。

25、如权利要求 23 所述的方法，其中它涉及来源于始旋链霉菌 SP213 的菌株。

26、如权利要求 22 到 25 任一项所述的方法，其中通过置换野生型 papM 基因，引入编码权利要求 1 至 4 任一项所述的 PapM 变异体的核酸。

27、如权利要求 26 所述的方法，其具有生产 PIB 的用途，其中用编码权利要求 1 至 4 任一项所述的变异体的核酸置换野生型 papM 基因。

28、如权利要求 22 至 27 任一项所述的方法，其具有生产 PINH2 的用途，其中用编码失活形式的 papM 多肽的核酸置换野生型 papM 基因。

29、如权利要求 27 所述的方法，其中所用菌株包含显示双突变 (G828A) (C658T) 的 papM 基因。

30、如权利要求 27 所述的方法，其中所用菌株包含显示突变 (G828A) 的 papM 基因。

31、如权利要求 27 所述的方法，其中所用菌株包含显示突变 (C658T) 的 papM 基因。

32、始旋链霉菌突变菌株，其包含权利要求 5 至 11 任一项所述的核酸。

33、如权利要求 32 所述的菌株，其是始旋链霉菌 SP217 株系。

34、如权利要求 32 所述的菌株，其是始旋链霉菌 SP101 株系。

35、如权利要求 32 所述的菌株，其是始旋链霉菌 SP218 株系。

36、始旋链霉菌 SP217 株系用于生产 PIB 的用途。

37、始旋链霉菌 SP101 株系用于生产 PIB 的用途。

38、始旋链霉菌 SP218 株系用于生产 PIB 的用途。

39、始旋链霉菌 SP216 株系用于生产 PINH2 的用途。

40、一种筛选权利要求 1 至 4 任一项所述的 PapM 多肽变异体的方法，该方法包括：

-对克隆到质粒中的始旋链霉菌 papM 基因或同源基因进行化学诱变，

-通过用在步骤 (a) 中进行了诱变的质粒转化受体菌株制备文库，

-筛选显示甲基化活性的克隆，使得每单位时间转化的甲基化底物的量的比率“r”大于或等于 0.6，其中 $r = \text{底物 1} / (\text{底物 1} + \text{底物 2})$ 。

新的链霉菌属细菌 PapM 多肽变体

技术领域

本发明涉及新的链霉菌属 (*Streptomyces*) 细菌 PapM 多肽变体, 与野生型多肽比较, 该多肽变体具有底物选择性和/或改进的效力。本发明也涉及编码这些变异体的核酸, 涉及引入了这些核酸的微生物和它们用于产生链阳性菌素 B 成分的用途。

背景技术

原始霉素是属于链阳性菌素家族的抗生素, 维及尼霉素和蜜柑霉素也属于链阳性菌素家族。链阳性菌素是一组小的、均质起始抗生素, 其由化学上非常不同的两种类型分子的联合组成: 链阳性菌素 A 是多不饱和大环内酯, 链阳性菌素 B 是 depsipeptide (Cocito C. G. (1979) *Microbiol. REV.*, 43 : 145-198) (Cocito C. G. (1983) 《Antibiotics》, 6 : (F. E. Hahn 编辑), 296-332.)。在原始霉素的情况下, A 和 B 化合物分别被称为原始霉素 II (PII) 和原始霉素 I (PI), 图 1 和图 2 中表示出了它们的结构。

A 和 B 化合物具有协同杀细菌的抗细菌活性, 特别是对于革兰氏阳性细菌诸如葡萄球菌属 (*Staphylococci*) 和肠球菌属 (*Enterococci*) 的抗菌活性(Cocito, 1979)。这些化合物通过附着到靶细胞核糖体的 50S 亚基上(这引起了蛋白质合成的抑制)起作用 (Cocito, 1979); (Di Giambattista M., Chinali G.和 Cocito C. G. (1989) *J. Antim. Chemother.*, 24 : 485-507)。

链阳性菌素主要通过放线菌纲 (*Actinomycetes*) 产生。更具体地, 原始霉素通过丝状细菌始旋链霉菌 (*Streptomyces Pristinaespiralis*), 以由 30%PI 和 70%PII 组成的天然混合物形式产生(Blanc 等, (1995), *J. Bacteriol.* 177 (18) : 5206-14)。对于每种类型分子, 共同产生几种同种型,

对于天然代谢物这是常见的。

在原始霉素 PI(原始霉素 B 成分)的情况下,产生的主要形式是 PIA,它由下面通过酰胺键和酯键相互连接的 7 个残基组成(图 2): 3-羟基吡啶甲酸, L-苏氨酸, D-氨基丁酸, L-脯氨酸, 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸, 4-氧代-L-六氢吡啶羧酸和 L-苯基甘氨酸。几种天然同种型也与 PIA 一起产生,它们对应于主要涉及下面残基的结构修饰: D-氨基丁酸, 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸(L-DMPAPA), 和 4-氧代-L-六氢吡啶羧酸(Thibaut 等, (1997) *J. Bacteriol.* 170 (3): 697-704)。根据始旋链霉菌株系的不同,这些次要形式以变化的百分数合成,其总共占大约几个百分数,PIA 占所产生的 PI 的 90%到 95%。特别应注意到,始旋链霉菌的各种株系合成约 5%的 PIB,其与 PIA 的不同之处在于在大环的 4-位中存在 4-甲基氨基-L-苯丙氨酸(L-MMPAPA)。尽管占少数,但发现 PIB 是特别有利于它的各种药理学特性的分子(W096/05219)。

由于在 4 位中存在 4-氨基-L-苯丙氨酸而不同的另一 PIA 类似物 PINH2 具有开发半合成起始产品的价值。至今,只有在将 4-氨基-L-苯丙氨酸添加入始旋链霉菌培养基的方法中才可能获得 PINH2(WO 96/01901)。

已经设想了几种方法来改进链阳性菌素的生产,第一种方法涉及改变 A 成分(原始霉素 II)产量相对于 B 成分(原始霉素 I)产量的总比例,另一种方法涉及改变 A 或 B 成分中存在的各种同种型的比例。然而,至今还没有方法可以满意地产生原始霉素 PIB,其仍然是原始霉素 B 成分(原始霉素 I)中的少数形式。

申请 W093/20182 中描述了第一种方法,其涉及筛选具有特异地产生链阳性菌素 A 成分或 B 成分的能力的微生物。这些微生物可以通过常规筛选技术获得,该常规筛选技术包括:对产生链阳性菌素的微生物进行诱变的第一可选步骤和鉴定选择性产生链阳性菌素 A 或 B 成分的微生物的第二步骤。该技术尤其可用于获得选择性产生原始霉素 PII(A 成分)或原始霉素 PI(B 成分)的始旋链霉菌菌株。然而,该文献没有描述选择性产生如下原始霉素 PI 的任何株系,所述 PI 具有与 PIA(其总是保持占大多数)

比较有利于 PIB 形式的同种型比例改变。

申请 WO 94/08014 描述了编码如下酶的基因的分离和鉴定, 所述酶参与链阳性菌素 A 成分的生物合成途径和 B 成分的生物合成途径。它也描述了目的在于增加 A 或 B 成分的生产水平的这些基因的表达, 和这些基因用于构建突变体的用途, 其中所述突变体将阻断 A 或 B 成分生物合成途径的不同步骤并由此引起这些生物合成途径的某些中间产物发生积累。更特别地, 申请 WO 94/08014 描述了从始旋链霉菌基因组 DNA 文库分离的 12 种基因 snaA, snaB, snaC, snaD, papA, papM, samS, snbA, snbC, snbD, snbE 和 snbR 的分离和鉴定, 并且证明 snaA, snaB, snaC 和 snaD 基因参与 A 成分的生物合成途径, 而 papA, papM, samS, snbA, snbC, snbD, snbE 和 snbR 基因参与 B 成分的生物合成途径。

● 因此, 始旋链霉菌株系中失活 snaA 基因可以获得不再产生 PIIA(原始霉素 A 成分同种型之一) 而仅仅产生 PIIB (原始霉素 A 成分的另一同种型) 的株系, 该 PIIB 的产量等于带有野生型 snaA 基因的对照株系产生的 PIIA 和 PIIB 的总和。在 snaA 基因失活的株系和对照株系中 PI (原始霉素 B 成分的所有同种型) 的生产保持相同。

● samS 基因的失活导致如下菌株的形成, 该菌株与对照株系比较 PIA 的产生减少了 35% (原始霉素 B 成分的同种型之一) 而 PIB 的产生多了约 10 倍 (原始霉素 B 成分的另一同工型); 由此, PIB 水平达到产生的所有 I 型 原始霉素 (PI) 总量的 20%。尽管在这些株系中改进了 PIB 的生产, 但是 PIB 的比例仍不占大多数, 并且保持小于 PIA 的比例。

● PapA 基因或 snbA 基因的失活导致形成仅仅产生 PII 类型 (A 成分) 原始霉素且不再产生 PI 类型 (B 成分) 原始霉素的株系。

● 相反, snaD 基因的失活可以获得仅仅产生 PI 类型原始霉素且不再产生 PII 类型原始霉素的株系。

申请 WO 96/01901 描述了制备如下新化合物的创造性方法, 所述化合物与链阳性菌素 B 成分相关, 但是不同于产生链阳性菌素的微生物所天然产生的 B 成分。根据该方法, 使用被诱变以致改变了链阳性菌素 B 成分前

体的生物合成的微生物株系。特别地，所用突变株系可以是其中通过破坏 papA 或 pipA 或 hpaA 基因改变了 B 成分前体的生物合成途径的始旋链霉菌菌株。这些株系不再产生原始霉素 PI (B 成分)，并且产生原始霉素 PII (A 成分)。在补加有起始前体的培养基中培养此突变株系，其中该起始前体不同于所述合成被改变的前体。起始前体代替天然前体掺入到 depsipeptide 中引起新化合物的产生，该化合物与链阳性菌素 B 成分有关，并且显示有利的治疗特性。

通过上述方法 (WO 96/01901) 已经使得可以获得主要产生在 B 成分中天然占少数的同种型的微生物株系。但是，它需要用微生物株系天然状态中不存在的特定前体补充培养基。

原始霉素生物合成途径的基础生物化学和遗传学研究已经使得可以阐明所观察到的多种 PI 同种型的来源。更具体地，已经证实 PIB 来源于通过 SnbDE 肽合成酶将 L-MMPAPA (L-DMPAPA 的生物合成中间体) 掺入至大环中，其中 L-DMPAPA 被掺入到 PIA 的大环中 (Blanc 等, Mol. Microbiol (1997), 23 (2) : 191-202) ; Thibaut 等 J. Bacteriol. (1997), 179 (3) : 697-704)。已经鉴定出了参与从分支酸生物合成 L-MMPAPA 和 L-DMPAPA 的 4 种基因，papA, papB, papC 和 papM (Blanc 等, 1997)。

papM 基因编码催化两个相继的甲基化反应的蛋白质，根据图 3 中描述的方案，该反应可以通过 L-MMPAPA，从 4-氨基-L-苯丙氨酸产生 L-DMPAPA。这两个甲基化反应由 PapM 催化，具有非常相似的动力学参数 (反应速率和亲和常数) (Blanc 等, 1997)。在 SEQ ID NO.1 序列中示出了始旋链霉菌 papM 基因的序列和相应多肽 (4-氨基-L-苯丙氨酸 (苯基-N)-甲基转移酶) 的序列。

发明内容

本发明是基于如下发现形成的，即通过修饰 papM 基因产物的酶活性，可以提高链阳性菌素 B 成分中的一些少数同种型的产量。

更具体地，本发明是基于新 PapM 多肽变异体的鉴定，与野生型多肽

比较, 该多肽变异体具有底物选择性和/或改进的效力。事实上, 本发明人已经证实可以对 papM 基因进行诱变, 以使得相应蛋白质不再具有催化第二个甲基化反应的能力而又同时保留了用于第一个甲基化反应的足够活性, 或者, 最低限度地, 使得与第一个反应比较, 第二个甲基化反应受到极大地抑制。

在产生链阳性菌素的微生物, 诸如始旋链霉菌株系中这种酶的存在将导致 L-MMPAPA 的积累, 由此优选产生 PIB (图 3)。相反地, 也可以对 papM 基因进行诱变, 使得相应蛋白质催化第二个甲基化反应的效力比催化第一个甲基化反应的效力高; 在始旋链霉菌株系中这种酶的存在应引起 L-DMPAPA 的积累, 从而增加 PIA 的产生。

本发明也基于如下发现: 产生失活形式的 PapM 多肽的微生物或不再表达 papM 基因的突变体允许如下链阳性菌素 B 成分积累, 该成分在野生型微生物中虽然能天然合成但是数量太少而以致不能被分离。因此, 本发明描述了始旋链霉菌重组株系的构建, 该株系主要产生许多野生型始旋链霉菌株系不能合成的 PI 家族化合物 PINH₂, 即相应于在大环位置 4 中掺入 4-氨基-L-苯丙氨酸。

本发明的第一个主题涉及 PapM 多肽变异体, 其显示出对甲基化底物的甲基化效率与野生型 PapM 多肽对这些相同底物的甲基化效率不同(增加或降低)。

PapM 多肽变异体与野生型 PapM 多肽显示出不同的(由 K_{cat1}/K_{m1} 比所定义的)对甲基化底物 1 的甲基化 1 效率和/或(由 K_{cat2}/K_{m2} 所定义的)对甲基化底物 2 的甲基化 2 效率。优选地, 本发明的 PapM 变异体显示出(由 $K_{cat_{PAPA}}/K_{m_{PAPA}}$ 比所定义的) L-PAPA 至 L-MMPAPA 的甲基化 1 效率和/或(由 $K_{cat_{MMPAPA}}/K_{m_{MMPAPA}}$ 比所定义的) L-MMPAPA 至 L-DMPAPA 的甲基化 2 效率不同于 SEQ ID No.1 中所示的 PapM 多肽的甲基化效率。

根据第一实施方式, 本发明 PapM 变异体显示出将 L-PAPA 甲基化为 L-MMPAPA 的甲基化 1 效率比将 L-MMPAPA 甲基化为 L-DMPAPA 的

甲基化 2 效率高至少 2 倍, 优选地至少 5 倍, 更优选地至少 10 倍。这种变异体更特别有利于生产 PIB。优选地, 通过置换选自以下的一个或多个氨基酸: Gly249 残基 (a), Thr192 残基 (b) 和同源多肽中等同于 (a) 或 (b) 的残基, 从野生型 PapM 多肽序列得到本发明变异体。

对于本发明目的而言, 表述“同源 PapM 多肽”意指来源于或衍生自链霉菌属 (*Streptomyces*) 细菌, 诸如特别是橄榄色链霉菌 (*Streptomyces olivaceus*), *Streptomyces ostreogriseus*, 三鹰链霉菌 (*Streptomyces mitakaensis*), 劳意德链霉菌 (*Streptomyces loidensis*), 禾生链霉菌 (*Streptomyces graminofaciens*) 或淀粉酶链霉菌 (*Streptomyces diastaticus*), 或者其它微生物的多肽, 该多肽的氨基酸序列由于一个或多个氨基酸的置换、缺失和/或插入而不同于氨基酸序列 SEQ ID No.1, 但其生物学功能与 PapM 多肽的生物学功能相似。这种同源多肽序列可以与序列 SEQ ID No.1 的至少 60% 相似, 优选地与序列 SEQ ID No.1 的至少 70% 相似, 更优选地与至少 80% 相似。

根据另一个实施方式, 本发明变异体来源于多肽序列 SEQ ID No.1, 并且至少显示出一个在 249 位置用丝氨酸替代甘氨酸的置换。

根据另一个实施方式, 本发明变异体来源于多肽序列 SEQ ID No.1, 并且至少显示出一个在 192 位置异亮氨酸替代苏氨酸的置换。

最后, 根据另一个实施方式, 本发明变异体来源于多肽序列 SEQ ID No.1, 并且至少显示出在 249 位置用丝氨酸替代甘氨酸的置换和在 192 位置用异亮氨酸替代苏氨酸的置换。

根据另一个实施方式, 本发明 PapM 变异体显示将 L-MMPAPA 甲基化 L-DMPAPA 的甲基化 2 效率比将 L-PAPA 甲基化为 L-MMPAPA 的甲基化 1 效率高至少 2 倍, 优选地高至少 5 倍, 更优选地高至少 10 倍。这种变异体更特别有利于增加 PIA 的产生。

本发明也涉及编码上述多肽变异体的核酸。优选通过突变 SEQ ID No.1 中所示的核苷酸序列或通过突变由于遗传密码简并性衍生的序列而获得的核酸。有利地, 本发明核酸在位于 193-196 位置的 NPPY 基序上游

包含至少一个错义突变，并且优选地该错义突变产生了非保守性氨基酸改变，诸如，在 658 位置胸腺嘧啶对胞嘧啶的置换（C658T）（突变的等位基因 66）。另一个有利的实施方式涉及至少含有一个在 828 位置腺嘌呤对鸟嘌呤的置换（G828A）的核酸（突变的等位基因 49）。最后，另一个更特别有利的形式是至少含有在 828 位置的一个腺嘌呤对鸟嘌呤的置换（G828A）和在 658 位置的一个胸腺嘧啶对胞嘧啶的置换（C658T）的核酸（突变的等位基因 49/66）。

本发明的另一主题是上述核酸在改变链阳性菌素生产菌株中 B 成分同种型的比例中的用途。对于在本发明上下文中可以使用的链阳性菌素生产菌株，特别可以例举的是橄榄色链霉菌，*Streptomyces ostreogriseus*，三鹰链霉菌，劳意德链霉菌，禾生链霉菌和淀粉酶链霉菌（*Streptomyces diastaticus*）等株系。当在始旋链霉菌株系中表达编码如下 PapM 变异体的核酸时，该核酸对于产生 PIB 具有更特别的用途，其中所述变异体显示出比 MMPAPA 到 DMPAPA 的甲基化 2 效率高至少 2 倍，优选地高至少 5 倍，更优选地高至少 10 倍的 PAPA 到 MMPAPA 的甲基化 1 效率。而当在始旋链霉菌株系中表达编码如下 PapM 变异体的核酸时，该核酸对于产生 PIA 具有更特别的用途，其中所述变异体显示出比 PAPA 到 MMPAPA 的甲基化 1 效率高至少 2 倍，优选地高至少 5 倍，更优选地高至少 10 倍的 MMPAPA 到 DMPAPA 的甲基化 2 效率。

本发明又一主题是包含上述核酸的任何重组 DNA。

本发明也涉及包含上述核酸或重组 DNA 的、自主复制和/或进行整合的任何表达载体，诸如，特别是包含图 11 中所示载体 pVRC1306 之全部或部分的载体。

本发明也涉及包含上述核酸和/或重组 DNA 和/或表达载体的宿主细胞。本发明宿主细胞可以是真核生物和原核生物细胞。可以例举的适宜真核生物细胞是动物细胞、酵母或真菌。特别地，涉及酵母可以例举的是酵母属（*Saccharomyces*），克鲁维酵母属（*Kluyveromyces*），毕赤酵母属（*Pichia*），许旺酵母属（*Schwanniomyces*）或汉逊酵母属（*Hansenula*）

的酵母。涉及动物细胞可以例举的是 COS, CHO 和 C127 细胞, 非洲爪蟾卵等。在真菌中可以更特别地例举的是小单孢菌属 (*Micromonospora*), 曲霉属 (*Aspergillus ssp.*) 或木霉属 (*Trichoderma ssp.*)。关于原核生物细胞, 优选使用下面细菌: 放线菌纲 (*Actinomycetes*), 并且特别是链霉菌属 (*Streptomyces*), 大肠杆菌 (*E.coli*) (实施例 7), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。优选地, 本发明重组细胞选自链阳性菌素生产细胞, 特别是橄榄色链霉菌, *Streptomyces ostreogriseus*, 三鹰链霉菌, 劳意德链霉菌, 禾生链霉菌和淀粉酶链霉菌。可以通过将外源核苷酸序列引入到细胞中的任何方法获得本发明重组细胞。特别地, 它可以是本领域技术人员已知的转化、电穿孔、接合、原生质体融合或任何其它技术。

本发明主题也涉及产生本发明 PapM 多肽变异体的方法, 其中培养上述宿主细胞, 和回收产生的多肽。

本发明也涉及上述表达本发明 PapM 多肽变异体的宿主细胞在生物转化反应中的用途。特别地, 这些细胞可以将芳香胺转化为一甲基化胺, 特别是将 4-氨基-L-苯丙氨酸转化为 4-甲基氨基-L-苯丙氨酸。可以利用整个细胞或利用所述细胞的无细胞提取物进行这些生物转化。

本发明另一个主题涉及产生链阳性菌素 B 成分的方法, 其中

- 失活产生链阳性菌素或潜在地产生链阳性菌素的菌株中的 papM 基因, 并且引入一个或多个编码上述 PapM 变异体的核酸拷贝,
- 在产生链阳性菌素的条件下培养所述菌株, 和
- 回收产生的链阳性菌素 B 成分。

优选地, 链阳性菌素生产菌株是来源于始旋链霉菌的原始霉素生产菌株, 更优选地, 它来源于始旋链霉菌 SP92 株系或来源于始旋链霉菌 ATCC25486。它也可以选自下面的株系: 橄榄色链霉菌 ATCC12019, *Streptomyces ostreogriseus* ATCC27455, 三鹰链霉菌 ATCC15297, 劳意德链霉菌 ATCC11415, 禾生链霉菌和淀粉酶链霉菌。

有利地, 链阳性菌素生产菌株是产生少量或检测不到量的链阳性菌素 A 成分的株系。特别可以例举的不产生链阳性菌素 A 成分的株系是申请

WO 93/20182 中所描述的 *S. osteogriseus* Pr4Q031/CBS 142.93 株系。关于不产生 A 成分的始旋链霉菌株系的例子，可以例举的是化学诱变后来源于 SP92 的株系 SP213(Blanc 等, 1994), 或申请 WO 93/20182 中描述的始旋链霉菌株系 Pr4R31 (保藏为 CBS182.92); 株系 SP213 和 Pr4R31 特异地产生原始霉素 P1, 并且不再产生可检测量的原始霉素 II (A 成分)。

根据优选的变通方案, 通过置换野生型 papM 基因形式而导入编码本发明 PapM 变异体的核酸。根据所引入的核酸表达的变异体, 可以促进链阳性菌素的不同 B 成分产生。因此, 表达如下变异体的始旋链霉菌株系引起 PIB 的优先生产, 该变异体与野生型多肽比较具有增加的 $K_{cat_{PAPA} \cdot Km_{MMPAPA}} / K_{cat_{MMPAPA} \cdot Km_{PAPA}}$ 比率。相反地, 显示该比率减少的变异体应该可以导致增加的 PIA 生产。优选地, 对于 PIB 生产而言, 始旋链霉菌株系包含至少显示突变 (G828A) 或突变 (C658T) 或双突变 (G828A) (C658T) 的 papM 基因。

本发明也涉及生产 PINH2 的方法, 其中使用始旋链霉菌野生型 papM 基因被失活和/或被编码失活形式的 PapM 多肽的核酸所置换的株系。

本发明另一主题是始旋链霉菌突变菌株, 其包含编码本发明 PapM 多肽变异体的核酸。特别地, 这种菌株可以通过用自杀质粒转化如下重组菌株获得, 其中在所述重组菌株中, 野生型 papM 基因已经被破坏并且被盒子 Ω -Km (参见实施例 8) 置换, 而所述自杀质粒允许该盒子与 papM 突变等位基因之一发生交换。通过示例的方式, 本发明描述了包含带有突变 C658T (突变等位基因 66) 的核酸的始旋链霉菌 SP217 株系, 或者包含双突变 C658T 和 G828A (突变等位基因 49/66) 的始旋链霉菌 SP218 株系。将这些突变引入到事先已破坏了 papM 基因并用盒子 Ω -Km 将 papM 基因置换的始旋链霉菌 SP213 株系中。使用相同的方法, 将突变等位基因 66 引入到株系 SP92 中, 能够构建始旋链霉菌株系 SP101。合成本发明 papM 变异体的始旋链霉菌株系 SP101, SP218 和 SP217 主要产生 PIB。

本发明的又一主题是始旋链霉菌菌株用于生产 PINH2 的用途。通过株系 SP216 特别示例了这种菌株, 其在 papM 基因失活后来源于株系 SP213

并且主要产生 PINH2。

本发明也涉及筛选 PapM 多肽或同源基因编码的多肽的变异体的方法，该方法包括：

- 对克隆到质粒中的 papM 基因或同源基因进行化学诱变，
- 通过用步骤 (a) 中进行了诱变的质粒转化受体菌株制备文库，
- 筛选显示甲基化活性的克隆，使得在初始速度条件下每单位时间转化的甲基化底物量的比率“r”比野生型多肽的增加至少 20%，优选地大于或等于 0.6，其中 $r = \text{底物 1} / (\text{底物 1} + \text{底物 2})$ 。

在这方面，本发明显示了如何可以用羟胺在体外对克隆到质粒中的 papM 基因进行化学诱变以构建突变体文库，以及利用微型化酶学筛选法从该文库筛选表达突变 papM 基因的大肠杆菌克隆，其中所述突变 papM 基因的相应蛋白质具有上述催化特性并且显示大于或等于 0.6 的上述比率“r”。

以下利用应该认为是非限制性示例的实施例举例说明本发明。

附图说明

图 1: 原始霉素 II 结构的例子。

图 2: 原始霉素 I 结构的例子。

图 3: PIB 和 PIA 的相应前体 MMPAPA 和 DMPAPA 的生物合成途径。

图 4: 用于筛选 PapM 突变体的酶测定法的原理：在 $[^{14}\text{C-Me}]$ -SAM 存在的情况下，通过分别从 PAPA 和 MMPAPA 到 MMPAPA 和 DMPAPA 的同时甲基化进行标记。

图 5: 质粒 pVRC706 的示意图。

图 6: 质粒 pUC4K 的示意图。

图 7: 野生型 papM 基因的序列和翻译。对于突变克隆 49 和 66 所鉴定到的突变位置。

图 8: 质粒 pVRC721 的示意图。

图 9: 构建质粒 pVRC1303 的方案。

图 10: 质粒 pVRC1303 和始旋链霉菌染色体之间的双交换事件的示意图。重组菌株的染色体结构。

图 11: 构建 pVRC1306 的方案。

图 12: 选择的在质粒 pVRC1306 和重组株系 SP216 染色体之间的单交换事件。

图 13: 产生重组菌株的第二重组事件的示意图, 该重组菌株显示 papM 基因的一个突变等位基因。

参考文献:

- Blanc 等, (1994) WO 94/08014
- Blanc 等, (1995), *J. Bacteriol.* 177 (18) : 5206-14
- Blanc 等, *Mol. Microbiol* (1997), 23 (2) : 191-202
- Chambers 等, (1988) *Gene.* 八月 15 ; 68 (1) : 139-49
- Cocito C. G. (1979) *Microbiol. Rev.*, 43 : 145-198
- Cocito C. G. (1983) *In Antibiotics*, 6 : (F. E. Hahn 编辑), 296-332
- Dessen P. C., Fondrat C., Vanelcien C.和 Mugnier C. (1990) *Comp. Appl. in Biosciences*, 6 : 355-356
- Di Giambattista M., Chinali G.和 Cocito C. G. (1989) *J : Antim. Chemother.*, 24 : 485-507
- Fellay 等, (1987) *Gene.* 52 (2-3) : 147-54
- Hanahan 等. (1990) *PNAS USA* 87, 4645-4649 页(1990)
- Hillemann D., Pülher A.和 Wohlleben W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 727-731
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M.和 Scrempf H. (1985) 实验手册 (A laboratory manual) , The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Humphreys 等,(1976) *Mol Gen Genet.* Apr 23 ; 145 (1) : 101-8.
- Maniatis T., Fritsh E. F.和 Sambrook J. (1989) 分子克隆: 实验手册 (Molecular cloning: a laboratory manual) . *Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Messing J., Crea R. 和 Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 309
- Schluckebier 等, (1995) *Gene.* 五月 19 ; 157 (1-2) : 131-4
- Thibaut 等, (1997) *J. Bacteriol.* 179 (3) : 697-704
- Veira 和 Messing, *Gene.* 1982 十月; 19 (3) : 259-68

实施例 1: 酶学筛选的方法学和方案

该实施例示例了利用来源于用羟胺诱变处理的酶群体 (参见实施例 2 和 3), 筛选显示新动力学特征的突变 PapM 酶。具体地, 该实施例示例了如下突变形式 PapM 的产生, 该突变形式的 PapM 对该酶的两种天然底物具有改变的选择性。

1.1 方法学

以前已经克隆、纯化和表征了 papM 甲基化酶(Blanc 等. 1994 ; Blanc 等. 1997)。PapM 是双功能性酶, 其催化 L-PAPA 向 L-MMPAPA 和 L-MMPAPA 向 L-DMPAPAN 的 N-甲基化 (参见图 4)。

L-PAPA 和 L-MMPAPA 是 PapM 的两种竞争性底物, 具有分别为 240 和 530 μ M 的米氏常数(Km), 并且 PapM 对这两种底物的最大速度(Vmax) 分别是每 mg PapM 每小时 55 和 71 μ mol (Blanc 等. 1997)。

根据公式:

$$V1/V2 = (Vmax1/Km1) [S1] / (Vmax2/Km2) [S2]$$

L-PAPA 和 L-MMPAPA 各自甲基化的速度 V1 和 V2 的比率取决于 PapM 的动力学参数 (对于 L-PAPA 是 Km1 和 Vmax1, 对于 L-MMPAPA 是 Km2 和 Vmax2), 也取决于 L-PAPA 和 L-MMPAPA 各自的浓度 S1 和 S2。

在固定浓度 S1 和 S2 同时测量两种甲基化速度 V1 和 V2 可以确定 PapM 对 L-PAPA 和 L-MMPAPA 的动力学常数的比率。该比率不依赖于测定中所用 PapM 的量。当突变的 PapM 酶对 L-PAPA 的选择性增加, V1/V2 比率应该增加, 相反地, 当突变的 PapM 酶优先地甲基化 L-MMPAPA 时, 该比率应该降低。

最后, 为了避免 Km 小的变化, 和相反地促进 Km 大的变化或 Vmax 值的改变, 固定 L-PAPA 和 L-MMPAPA 的浓度在大约为 Km 的 6 倍, 以便处于饱和条件下。在这种条件下, 对于野生型 PapM 酶, 甲基化 1 速率和甲基化 2 速率实际上相等。

实施例 7.1 中描述了对 PapM 的两种甲基化活性的同时测定。在 1.5mM

L-PAPA, 3 mM L-MMPAPA 和 70 μ l SAM 存在的情况下, 进行这种 PapM 甲基化酶活性的测定。

1.2 突变的 PapM 酶群体的筛选

在 23 $^{\circ}$ C, 融化如实施例 3 中所述制备的产生突变 PapM 酶的大肠杆菌 (*E.coli*) 克隆文库的 96 孔板。接着, 向每个孔中含有的 LB 培养基上的 200 μ l 培养物添加 25 μ l 混合物 A。通过相继添加 (1) 3ml 50mM Bis-Tris-丙烷缓冲液, pH10, 该缓冲液中以二盐酸盐形式已经溶解了 12mg L-PAPA 和 71mg (DL)-MMPAPA(如 WO 96/01901-A1 中所述进行制备), (2) 0.7ml 于水中的 4mM SAM, (3) 0.7ml 在 25 μ Ci/ml 和 60mCi/mmol 的 [14 C-Me]-SAM (AMERSHAM), (4) 0.6ml 100mM Bis-Tris-丙烷缓冲液, pH6.8, 和 (5) 56mg EDTA 二钠盐, 获得混合物 A。所给出的量为针对 5ml 体积混合物 A 制备物的量。然后用粘性膜密封该板, 在 27 $^{\circ}$ C, 温育 2 小时。用 40 μ l 终止溶液终止反应。通过混合 2.2ml 在水中的 24mg/ml 庚烷磺酸钠溶液和 1.8ml 浓盐酸获得终止溶液(对于 4ml 体积而言)。以 3000g, 离心该板 5 分钟后, 在实施例 7.1 中所述的系统中, 通过 HPLC 分析每个孔的约 100 μ l 上清液。

对于每个孔, 积分从放射化学检测结果获得的 MMPAPA 和 DMPAPA 峰的相应面积 A1 和 A2。然后用下面的方式计算比率 r:

$$r = A1 / (A1 + A2)$$

在野生型 PapM 甲基化酶的情况下, $r = 0.50 \pm 0.05$ 。

对于突变的 PapM 酶(该酶对于甲基化 1 比对于甲基化 2 具有显著更高活性), 固定了比率 r 的阈值约是 0.60。

实施例 2: 用羟胺诱变 papM 基因

该实施例示例了利用克隆到可以在大肠杆菌中复制的质粒上的链霉菌质粒 DNA 进行 papM 基因诱变。

2.1 诱变剂的选择

利用羟胺 (NH_2OH) 进行化学诱变, 羟胺特异性结合胞嘧啶残基以形

成随后能与腺嘌呤残基配对的 N4-羟基-胞嘧啶。因此，羟胺引起了 G:C>A:T 的转换。这种诱变剂的选择特别有利于进行富含 GC 的 DNA，诸如含有 70%到 75%GC 的链霉菌 DNA 的突变。

2.2 选择进行诱变的质粒

同时在两种不同质粒，质粒 pVRC706 和质粒 pUC4K 上进行诱变。

质粒 pVRC706 (图 5) 是 pMTL23 (Chambers 等, 1988) 的衍生物，其中带有将要被进行诱变的 papM 基因的来源于质粒 pVRC409 的 1.7kb MluI-StuI 片段(Blanc 等, 1994; Blanc 等, 1997)。已经被克隆在唯一的 MluI 和 BamHI 位点之间(根据 Sambrook 等, (1989)的方法, 用 BamHI 切割的末端已经通过 Klenow 酶的作用被平端化了)。StuI 末端克隆到用 Klenow 酶补平的 pMTL23 的 BamHI 位点中, 使得可以重建在随后克隆期间能再次使用的 BamHI 位点。在 MluI 位点的克隆使得可以在质粒 pMTL23 的 lacZ 基因编码的 β -半乳糖苷酶的头 32 个氨基酸和位于 papM 基因上游的 papB 基因的最后 11 个氨基酸之间获得同相融合; 鉴于核酸序列(Blanc 等, 1994), 这保留了看起来存在于这两个基因之间的翻译偶联。在该构建体中, papM 基因的表达受 lacZ 基因的 Plac 启动子控制, 而通过添加 1mM IPTG 可以诱导该启动子。以前已经证明这种表达系统可以在大肠杆菌中产生活性可溶蛋白质形式的 PapM 甲基化酶, 其占总蛋白质的约 0.5%(Blanc 等, 1994)。

质粒 pUC4K (图 6) 是载体 pUC4 的衍生物, 其带有赋予对氨苄青霉素和卡那霉素的抗性的两种基因(Vieira 和 Messing, 1982)。该质粒被选作诱变对照的原因如下: (1) 它的大小(3.9 kb)接近质粒 pVRC706 (4.4 kb), (2) 两种质粒 pUC4K 和 pVRC706 具有非常接近的结构和特性, 因为它们都来源于 pUC 系列载体, 和 (3) pUC4K 带有的两种抗性基因 amp^r 和 kan^r 使得可以通过计算对选定抗生素敏感的克隆, 容易地计算其中一个基因已经经历诱变的克隆的百分数。

2.3 诱变方案

根据 Humprey 等, (1976)的方法, 改变温育温度: 80°C 和 85°C, 用羟

胺进行两个诱变：在含有 0.05M 磷酸钠和 0.5mM EDTA 的缓冲液中，在期望的温度（80℃或 85℃），在 100ml 的终体积中，使在氯化铯梯度上纯化的 5mg 质粒 DNA 与 0.4M 羟胺接触（pH6）35 分钟。通过添加含有 0.1M 磷酸钠和 1mM EDTA 的 100ml 缓冲液终止诱变反应，并且利用 2 升 TES 缓冲液（10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA 和 100 mM NaCl），通过 8 次连续透析浸浴除去羟胺。通过添加 1/10 体积的 3M 醋酸钠（pH8）和 2.5 体积的 95%乙醇沉淀由此处理的 DNA。漂洗 DNA 沉淀，干燥，然后溶于 100 μ l TE 缓冲液（10 mM Tris-HCl 和 1 mM EDTA, pH 7.5）中。对于每种质粒，在没有羟胺的情况下，在研究的温度下制备诱变反应的对照。

2.4 接受了经诱变的质粒的大肠杆菌株系的制备

用根据上述方法进行诱变后的质粒 pVRC706 和 pUCK4 转化大肠杆菌株系 DH5 α (supE44 DlacU169 (f801acZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-l relA1), (Hanahan, 1990)，以评估诱变作用。

根据下面的方法制备用于电穿孔转化的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞：在 37℃，制备 LB 培养基中的 1 升培养物直到 O.D.（在 600nm）达到 0.5 到 0.8。然后将细胞放置在冰上 30 分钟以停止它们的生长，然后在 4℃，以 4000g 离心 15 分钟。用 1 升冷无菌水，0.5 升冷水和含有 10%甘油的 20ml 冷溶液相继漂洗细胞沉淀。每次漂洗后，在 4℃，以 4000g 离心细胞 15 分钟。最后，将细胞沉淀溶于 2ml 10%浓度甘油中。可以立即电穿孔由此制备的细胞，或者可以在 -80℃，以 40ml 等份试样的形式冷冻和贮藏细胞以备随后的使用。电感受态细胞的转化效率是大约 10^9 菌落/ μ g pUC18 质粒 DNA。

用相当于 5ng 试验质粒的物质电穿孔由此制备的大肠杆菌 DH5 α 细胞。为此，在 4℃，使 40 μ l 电感受态细胞与含有 5ng 质粒 DNA 的 1 到 2 μ l 溶液接触 1 分钟。电穿孔仪（Bio-Rad）设定为 25mF 脉冲和 2500V。脉冲控制器的电阻设为 200 Ω 。细胞/DNA 混合物放入 0.2cm 宽的电穿孔杯中，并且施加电脉冲。常规地获得 4.5 到 5ms 的脉冲时间。脉冲后，向细胞中快速添加 1ml SOC 培养基（2%细菌培养用琼脂，10 mM NaCl, 2.5 mM

KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM 葡萄糖), 并且将整个混合物转移到 5ml 聚丙烯试管中, 在 37°C 温育该试管 1 小时。这步使得细胞可以恢复和开始表达已经穿入细胞的质粒上存在的抗性基因。在温育结束时, 适当地稀释细胞培养物 (稀释倍数通常是 10⁻¹ 到 10⁻⁴), 并且在含有筛选抗生素 (50µg/ml 氨苄青霉素或 50µg/ml 卡那霉素) 的固体 LB 培养基上筛选转化的菌落。

2.5 评估诱变作用并确定选定的温度条件

根据下面两个标准评估试验的两种诱变温度条件: 首先, 进行了诱变的质粒转化大肠杆菌株系的能力, 其次, 在用进行了诱变的 pUC4K 质粒转化的大肠杆菌克隆中已经失去质粒编码的两种抗性之一的大肠杆菌克隆的百分数。

对于质粒 pVRC706 和 pUCK4, 测定了用羟胺进行诱变后质粒转化大肠杆菌株系 DH5α 的能力。该能力与 (在没有羟胺的情况下做为温育温度对照制备的) 未诱变质粒的能力进行比较。具体地, 羟胺的作用应该在质粒中, 更特别地在允许筛选重组克隆的抗性基因中, 也在带有复制起点的区域中造成致死突变。因此, 可以认为诱变处理越有效, 质粒转化的能力损失得越大。两种质粒在诱变后的转化能力表示为没有进行诱变的对照质粒的能力的百分数 (%), 见下表。

表 1

	pVRC706		pUC4K	
	80 °C	85 °C	80 °C	85 °C
氨苄青霉素	12.5	1.5	14	1.5
卡那霉素	-	-	16	0.3

这些结果清楚地表明对于两种质粒 pVRC706 和 pUC4K, 在 85°C 的诱变明显地更有效, 因为它改变了统计学上 10 倍多的质粒实体, 这样, 只有 1.5% 的质粒仍旧能转化电感受态大肠杆菌 DH5α 细胞, 能复制和赋予由此得到的克隆氨苄青霉素抗性。此外, 无论所选定的筛选是 (Amp^R) 还是 (Kana^R), 用 pUC4K 观察到的结果非常均一, 这表明羟胺的作用均一地发生在对这两种抗性的表达必需的区域中。

用于评估的第二个标准是针对诱变后的质粒 pUC4K，计算在抗氨苄青霉素 (Ampⁱ^R) 的克隆中对卡那霉素敏感 (Kana^S) 的克隆的百分数 (%)，和反之亦然。这些百分数反映了在羟胺作用下，在所考虑的抗性基因 (amp^R 或 kan^R) 中已经发生的如下突变的频率，该突变通过完全阻断 (终止转录或翻译)，或通过引起截短和/或失活蛋白质的合成干扰了这些抗性基因的表达。

为了估计这些百分数，在分别含有氨苄青霉素或卡那霉素的固体 LB 培养基上继代培养 200 个 (Kana^R) 或 (Ampⁱ^R) 克隆，这些克隆选自用进行或没有进行过诱变的质粒 pUC4K 转化大肠杆菌 (*E.coli*) 株系 DH5 α 电感受态细胞后获得的克隆。生长 24 小时后，计数对两种抗生素之一敏感的克隆。在下表中给出了在用质粒 pUC4K 转化的克隆中对氨苄青霉素或卡那霉素敏感的克隆的百分数，其中所述质粒 pUC4K 用羟胺已进行了诱变或者没有进行诱变。

表 2

	pUC4K+羟胺		没有进行诱变的 pUC4K	
	80℃	85℃	80℃	85℃
(Amp ⁱ ^S) / (Kana ^R)	1.3	3.2	0	0
(Kana ^S) / (Amp ⁱ ^R)	1.5	6	0	0

从该结果可以得出结论：只有用羟胺处理才明显地导致影响 pUC4K 的两种抗性基因之一的表达的突变。从这些结果还可以得出结论：对质粒 pUC4K 的两种抗性基因，在 85℃ 进行诱变的效率比在 80℃ 进行诱变的效率高 3 到 4 倍。最后，这些样品表明羟胺对两种抗性基因 amp^R 和 Kan^R 的作用是比较均一的。

因此，可以合理地推测羟胺对两种质粒 pUC4K 和 pVRC706 的所有部分都发生作用，并且在 85℃ 进行的诱变可能最大地影响质粒 pVRC706 上的 papM 基因。该诱变条件的比较使我们在剩余的研究中只筛选用 85℃ 下以羟胺进行诱变后的质粒 pVRC706 转化大肠杆菌株系 DH5 α 电感受态细胞获得的克隆。

实施例 3: 含有质粒 pVRC706 的大肠杆菌 DH5 α 文库的构建和利用

该实施例示例了具有 6000 个含有质粒的大肠杆菌株系 DH5 α 克隆的文库的构建和利用, 其中该质粒经过了在 85 $^{\circ}\text{C}$, 用羟胺进行的化学诱变。

对于如上所述在 85 $^{\circ}\text{C}$ 用羟胺对带有 papM 基因的质粒 pVRC706 进行的诱变, 基于如下假设: 羟胺全面地作用于质粒 pVRC706 的所有部分上 (参见实施例 2), 可以估计具有含有这些质粒的 6000 个大肠杆菌克隆的文库代表突变体文库, 其中一定百分数的克隆表达突变的 papM 基因。通过同时测定相应 PapM 蛋白质催化的两种甲基化活性, 分析文库的 6000 个克隆以证实该假说 (参见, 实施例 4)。

为了构建该文库, 转化大肠杆菌株系 DH5 α 电感受态细胞后, 从含有 50mg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基的培养皿上选定 6000 个克隆, 将各个克隆在含有 200ml Hogness 培养及保持培养基 (Hogness culture and conservation medium) (Sambrook 等, 1989) (补加有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素) 的 96 孔微量滴定板孔中分别继代培养。在 37 $^{\circ}\text{C}$, 以 160rpm 中等搅拌, 温育由此构建的母板 24 小时, 使克隆增殖, 并且形成已经达到稳定生长期的饱和细菌悬浮液。然后, 利用母板每个孔的等份培养物, 通过分别再次接种两个 96 孔板 (含有 200ml 补加有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素和 1mM IPTG 的 LB 培养基) 的每个孔, 一式两份地复制该母板。由此获得的这些板称为测定板, 温育 24 小时 (37 $^{\circ}\text{C}$, 160rpm), 使克隆增殖, 并且形成已经达到稳定生长期的饱和细菌悬浮液。用氨苄青霉素筛选细菌细胞中质粒 pVRC706 的存在, 并且通过在培养开始添加 IPTG 诱导这些质粒带有的 papM 甲基化基因的表达。然后, 在对粗细菌悬浮液进行甲基化活性测定以前, 在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻这些板 (参见实施例 1)。

在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保藏曾一式两份复制的母板, 并且形成待分析的 6000 个克隆的长期贮藏形式。

实施例 4: 含有已经进行诱变的质粒 pVRC706 的大肠杆菌株系 DH5 α 文库的筛选结果

该实施例示例了利用微型化活性测定法对具有 6000 个克隆的文库的快速分析，以便筛选含有突变基因的克隆，该突变基因编码具有有利特性的酶。

4.1 6000 个克隆筛选的粗结果

如实施例 1 中所述，对实施例 3 中制备的文库的 6000 个克隆进行第一次筛选，结束时，选定的结果如下：

- 441 个克隆显示零或检测不到的甲基化活性，即，7.3%水平；
- 9 个克隆显示比第二甲基化反应更有利于第一甲基化反应，即，克隆具有大于 0.6 的比率 r （如实施例 1.2 中所定义）。因此，这种突变体出现的频率非常低，它是 0.15%。

如下所述证实这些最初的结果。

4.2 验证选定克隆的方法学

利用实施例 3 中所制备的复制板，按照相同的方案，再次系统地测定最初筛选期间选定的所有克隆的甲基化活性，以证实最初测定的结果。看起来，对于极大多数克隆，测定结果均得以验证。

因此，证实：

- 360 个克隆显示了零甲基化活性，即，6%水平。
- 8 个克隆显示了比第二甲基化反应更有利于第一甲基化反应，即，克隆具有大于 0.6 的比率 r （如实施例 1.2 中所定义）。因此，这种突变体出现的频率非常低，它是 0.13%。

对于酶效率比率是 $r > 0.60$ 的 8 个克隆，设立了另两个证实步骤：

(1) 利用标准技术分离这些克隆的质粒 DNA(Sambrook 等, 1989)，并且将其再次引入到大肠杆菌株系 DH5 α 的新鲜电感受态细胞中。这个步骤可以证实 8 个克隆中观察到的甲基化活性 r 比率的改变与克隆的染色体背景无关，而只取决于来源于选定克隆的质粒。

(2) 下面的证实步骤包括将选定克隆中存在的 papM 基因再次克隆到新鲜表达载体 pMTL23 中。为此，从提取自选定克隆的质粒 DNA 分离带有 papM 基因的 1.7kb MluI-BamHI 片段，并且将其再次克隆到 pMTL23

的唯一 MluI 和 BamHI 位点之间。根据 Sambrook 等, (1989)所述的标准方法进行这些克隆所需的步骤(质粒 DNA 的分离,用限制酶进行的质粒 DNA 消化,通过琼脂糖凝胶电泳的酶消化物的迁移和分析,电泳迁移后 DNA 片段的制备,连接反应)。

所得到的质粒具有与 pVRC706 结构相似的结构(图 5),不同是它们带有 papM 基因的 8 个突变等位基因之一。它们被称为 pVRC710 到 pVRC717 (每个号码都对应于 8 个突变等位基因之一),并且被再次引入到大肠杆菌株系 DH5 α 的新鲜电感受态细胞中。如上所述,再次测定所获得克隆的甲基化活性。该步骤可以证实在这些克隆中观察到的甲基化活性比率 r 的改变与 papM 基因外的 pVRC706 区域中将产生的一个(或多个)突变无关,而只取决于位于 papM 基因中的一个(或多个)突变。

所有的证实步骤均证实预先选定的 8 个突变体中 7 个突变体的表型。例如,观察到如实施例 1.2 中所述计算的两种甲基化活性的比率对于突变体 49 (克隆 49C9) 是 0.63,对于突变体 66 (克隆 66A9) 是 0.67,而对于表达野生型 papM 基因的克隆,在相同的试验中它仅是 0.40。

实施例 5: 对通过在 85°C 用羟胺对质粒 pVRC706 进行诱变得到的突变 papM 基因的遗传表征

该实施例示例了对已经经受化学诱变的基因进行的遗传表征。通过克隆和测序突变的基因进行遗传表征,从而比较突变基因的序列和野生型基因的序列并证明导致所观察到的表型的突变。该遗传表征与突变基因编码的蛋白质的生物化学表征平行进行,以使观察到的氨基酸改变与注意到的这些酶的催化特性改变相关联。

5.1 方法

对于通过在 85°C 用羟胺诱变质粒 pVRC706 产生的 papM 基因,亚克隆和测序 7 个选定克隆的 papM 基因。经诱变的质粒 pVRC706 中带有突变的 papM 基因的 1.7kb MluI-BamHI 区域做为两个亚插入片段亚克隆到来源于 M13 噬菌体的载体中(Messing 等, 1981),该载体适于通过 Sanger

方法进行DNA测序(Sambrook等,1989):将含有papM基因3'部分的0.7kb SmaI-AgeI片段克隆在载体M13mp18的SmaI位点,将含有5'部分的0.4kb Sall-PstI片段克隆在载体M13mp18和M13mp19的Sall和PstI位点之间(图5)。根据Sambrook等,(1989)所述的标准方法进行这些亚克隆所需的步骤。利用Applied Biosystems销售的PRISM ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle测序试剂盒系统的荧光双脱氧核苷酸,通过“Sanger”链终止方法双链测序这两个插入片段。利用通用引物(Sambrook等,1989)或寡核苷酸(该寡核苷酸与将要测序的插入片段的20个核苷酸序列互补,并且通过Biosearch 8600自动合成仪合成(Blanc et AL,1995))作为合成引物,在PCR机上对单链DNA进行测序反应。然后,利用Applied Biosystems 370A自动测序仪分析这些反应的产物,该自动测序仪进行序列的电泳迁移并且读取序列。然后,利用Infobiogen生物信息学中心的BISANCE服务器程序处理这些序列(Dessen等,1990),该程序尤其能够进行序列的串连,将序列翻译成蛋白质和与野生型序列进行比较。

5.2 结果

最初,单链测序下面的7个克隆,并再次测定比率r(在此试验中,发现野生型PapM酶的比率等于0.40)。

突变体	比率	突变	突变(核苷酸)
45	0.52	Thr274>Ile	ACC>ATC
49	0.63	Gly249>Ser	GGC>AGC
52	0.66	Gly249>Asp	GGC>GAC
66	0.67	Thr192>Ile	ACC>ATC
69	0.51	Met226>Ile	ATG>ATA
74D4	0.63	Gly249>Ser	GGC>AGC
74D5	0.52	Met226>Ile	ATG>ATA

图7和下表中示出了(通过在85℃,用羟胺诱变质粒pVRC706形成的)突变papM基因编码的蛋白质序列与野生型papM基因编码的蛋白质序列

(Blanc 等, 1994 ; Blanc 等, 1997)的比较结果, 其中对于 7 个选定克隆中的 2 个克隆, 在两条链上验证了其序列。

表 3

	突变体 49 (克隆 49C9)	突变体 66 (克隆 66A9)
papM 基因中的核苷酸突变	GGC>AGC	ACC>ATC
PapM 蛋白质中的氨基酸置换	Gly ₂₄₉ >Ser	Thr ₁₉₂ >Ile

在该表中, 只示出了引起相应蛋白质中氨基酸改变的突变。对于一些克隆, 特别是对于称为突变体 66 的克隆 66A9, 观察到了由于遗传密码子的简并性未引起氨基酸序列改变的其它“沉默”突变。

应注意到, 对于选定和测序的 7 个克隆中的每个克隆, 均可以阐明 papM 基因中引起氨基酸改变的点突变, 这些点突变有效地对应于用羟胺处理后所预期到的 C>T 或 G>A 类改变。在所分析的 7 个克隆中, 一些突变出现了几次, 因此根据所影响的位置, 可以将这 7 个克隆分成 4 类突变体。上述克隆代表由此构成的 4 类突变体中的两类。

在余下的研究工作中更具体地研究了两个突变的作用; 参考序列 SEQ ID No.1, 它们之其一是在 658 位置胸腺嘧啶对胞嘧啶的置换 (C658T) (突变等位基因 66), 其二是在 828 位置腺嘌呤对鸟嘌呤的置换 (G828A) (突变等位基因 49)。

与该遗传表征平行, 实施例 7 中描述的对突变基因编码的蛋白质的生物化学表征使得可以观察这些酶与野生型 papM 基因编码的蛋白质比较在催化特性上改变。

由此, 可以将观察到的氨基酸改变与注意到的这些酶的催化特性改变相关联系起来。

因此, 注意到对于突变体 66, 修饰的氨基酸是刚好位于 NPPY 基序之前的 192 位置的苏氨酸, 其中该基序位于 193 到 196 位置 (图 7)。该基序在所有 N-甲基化酶, 更具体地 DNA N-甲基化酶 (甲基化腺嘌呤的 6 位

和胞嘧啶的 4 位) 中是保守的, 并且被认为是这些酶的催化结构域的一部分 (schluckebier 等 1995)。因此, 将极性氨基酸-苏氨酸残基修饰为疏水性异亮氨酸残基对于相应蛋白质的催化特性可能是重要的。事实上, 已注意到了突变基因 66 编码的酶在催化特性上, 并且更具体地对于第二甲基化反应而言 (参见实施例 7) 有相当大的改变。

实施例 6: 利用对质粒 pVRC706 进行诱变所得到的突变 papM 基因, 通过基因工程构建双突变 papM 基因

该实施例示例了利用显示单突变的基因, 通过基因工程构建双突变基因, 其中所述显示单突变的基因在用羟胺对质粒 DNA 进行诱变 (参见实施例 2), 以酶学筛选法进行选择 (参见实施例 4) 和测序鉴定 (参见实施例 5) 后获得。意外地, 该方案可以获得积累了单突变体中所观察到的特性的更有利的突变基因。

实施了几种成对突变联合。例如, 下面详细地给出了突变 49 和 66 的联合。为此, 通过将突变 papM 基因 66 的 5' 部分连接到突变 papM 基因 49 的 3' 部分上产生嵌合基因。为此, 分离下面的 DNA 片段:

- 从带有突变 papM 基因 66 的质粒 pVRC713 (参见实施例 4) 分离 0.65kb MluI-XhoI 片段。该片段含有等位基因 66 的起始部分, 该部分包含在修饰的甲基化酶 66 位置 192 发现的 ATC 密码子, 该密码子是经突变而编码异亮氨酸的密码子 (参见图 7);

- 从带有突变 papM 基因 49 的质粒 pVRC711 (参见实施例 4) 分离 1.05kb XhoI-BamHI 片段。该片段含有等位基因 49 的末端, 其中包含在修饰的甲基化酶 49 位置 249 发现的 AGC 密码子, 该密码子是经突变而编码丝氨酸的密码子 (参见图 7)。

根据 Sambrook 等, (1989) 的标准方案, 将这两个片段共克隆在质粒 pMTL23 (Chambers 等, 1988) 的唯一 MluI-BamHI 位点之间, 以重建与 pVRC706 结构相似的质粒 (图 5), 不同在于该质粒带有 papM 基因的双突变等位基因, 该等位基因编码在 192 和 249 位置被修饰的蛋白质。由此

得到的质粒称为 pVRC718, 在转化大肠杆菌株系 DH5 α 电感受态细胞后通过添加 1mM IPTG 诱导 Plac 启动子, 该质粒允许双突变基因 49/66 表达。

然后, 利用 T7 噬菌体 RNA 聚合酶识别的强 PT7 启动子, 将双突变等位基因 49/66 转移到第二表达载体 pET11c (Novagen) 中。为此, 从质粒 pVRC718 分离带有 papM 基因 49/66 的 1.8kb BglII-BamHI 片段, 并且将其克隆在 pET11c 的唯一 BamHI 位点。选择对应于定向插入的图 8 中所述称为 pVRC721 的重组质粒, 该定向插入使得在 T7 噬菌体基因 10 和位于 papM 基因上游的 papB 基因之间产生翻译融合。然后, 将该质粒引入到大肠杆菌表达株系 BI21(DE3) 中, 该株系允许 T7 噬菌体 RNA 聚合酶表达并由此允许从 T7 启动子转录的该 papM 基因 49/66 表达。

利用 T7 噬菌体表达系统, 用相似构建体, 已经观察到了野生型 PapM 蛋白质的超量产生, 比用质粒 pVRC706 获得的产量高 10 倍 (Blanc 等, 1997)。利用 T7 噬菌体的该系统相似地可以超量产生双突变基因 49/66 编码的修饰的甲基化酶, 以便纯化和表征该酶 (如实施例 7 所述)。

实施例 7: 大肠杆菌株系中表达的始旋链霉菌 (野生型或突变的) papM 基因产物的生物化学鉴定

该实施例示例了 (野生型或突变的) PapM 蛋白质催化的反应的动力学常数测定。PapM 蛋白质催化两个反应: 首先是 4-氨基-L-苯丙氨酸 (L-PAPA) 甲基化为 4-甲氨基-L-苯丙氨酸 (L-MMPAPA), 其次是 4-甲氨基-L-苯丙氨酸甲基化为 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸 (L-DMPAPA)。

7.1 测定 4-氨基-L-苯丙氨酸 (L-PAPA) 甲基化为 4-甲氨基-L-苯丙氨酸的活性和 4-甲氨基-L-苯丙氨酸甲基化为 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸的活性

该实施例示例了原始霉素 Ia 的成分 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸生物合成的两个终活性的测定。这两个终活性首先是 4-氨基-L-苯丙氨酸甲基化为 4-甲氨基-L-苯丙氨酸 (甲基化 1), 其次是 4-甲氨基-L-苯丙氨酸甲基化为 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸 (甲基化 2), 这两个活性均利用 SAM 做为甲基供体 (图 4)。

在 27°C, 在 pH6.8, 总体积 200 μ l 的 50mM bis-tris-丙烷缓冲液中, 在 4-氨基-L-苯丙氨酸 (1mM) 存在的情况下 (用于测定甲基化 1), 或者在 4-甲氨基-L-苯丙氨酸 (2.5mM) 存在的情况下 (用于测定甲基化 2) 温育待测定的酶级分 (1-20 个单位) 30 分钟, 该缓冲液含有甲基被碳 14 同位素 (2Ci/mol) 放射性标记的 SAM (200 μ M)。

通过添加 16 μ l 37% 盐酸, 然后添加 240g/l 的 20 μ l 庚烷磺酸钠终止该反应。离心后, 以下面梯度模式, 将 150 μ l 上清液注射到 HPLC 系统中:

-流动相: 洗脱液 A = 1.2g 庚烷磺酸盐+2.5ml 冰醋酸+水 (适量 1 至 1000ml)。洗脱液 B=1.2g 庚烷磺酸钠+2.5ml 冰醋酸+300ml 乙腈+水 (适量, 1000ml)。用下面方法产生梯度: 在 t = 0, 30%洗脱液 B; t = 16(分钟), 30%洗脱液 B; t = 17 (分钟), 100%洗脱液 B; t = 20 分钟, 100%洗脱液 B; t = 21 分钟, 30%洗脱液 B; t = 25 (分钟), 30%洗脱液 B。

-固定相: Nucleosil[®] C18 5 μ m \times 4.6mm 柱子 (Macherey-Nagel)

离开柱子时, 酶反应的底物和产物通过在 254nm 的吸收定量。利用装配有 GT400-U4 固相闪烁室的 Berthold LB506 检测器, 将上述测定与联机放射性化学测定偶联。这可以特异性地跟踪反应产物中放射性甲基的掺入。

甲基化 1(还有甲基化 2)的酶活性单位定义为向 4-氨基-L-苯丙氨酸中 (或 4-甲氨基-L-苯丙氨酸) 中掺入 1nmol 甲基所需要的酶量。

7.2 显示 SAM 依赖性 N-甲基转移酶活性的 (野生型或突变的) 始旋链霉菌重组蛋白质的纯化, 该 N-甲基转移酶活性催化 4-氨基-L-苯丙氨酸甲基化为 4-甲氨基-L-苯丙氨酸和 4-甲氨基-L-苯丙氨酸甲基化为 4-二甲氨基-L-苯丙氨酸

该实施例示例了通过修饰的 papM 基因的克隆在大肠杆菌中表达的始旋链霉菌 SP92 酶的纯化, 该酶参与原始霉素 IA 的生物合成途径。

7.2.a 突变体 PapM 酶 49/66 的纯化

利用实施例 7.1 中前述的测定法, 按如下所述纯化依赖于 SAM 的 N-甲基转移酶, 注意在各步骤之间, 如果必要, 在 -70°C 冷冻和保藏活性级分。

用 pH 7.2 的 100mM 磷酸缓冲液洗涤来源于大肠杆菌 BL21 (DE3) ::

pVRC721 培养物的离心沉淀, 其中, 该大肠杆菌 BL21 (DE3) :: pVRC721 在用 IPTG 诱导后超量产生 PapM 变异体 49/66, 并且其中所述磷酸缓冲液含有 1mM PMSF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.5 M KCl 和 10% v/v 甘油。将 2g 洗后的沉淀溶于 pH 8 的 20ml 0.1M Tris-HCl 缓冲液中, 该缓冲液含有 4 mM DTE, 5 mM 苯甲脒, 0.2 mM Pefabloc, 100 μ g/l E-64, 2mg/l 亮抑蛋白酶肽, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2mg/l 抑蛋白酶肽, 20%甘油和 2 mg/ml 溶菌酶。在 4 $^{\circ}$ C 保存该缓冲液。在 4 $^{\circ}$ C 有力地搅拌由此获得的悬浮液。搅拌 30 分钟后, 添加 0.2mg/ml 的脱氧核糖核酸酶 I 和 5mM MgCl₂。搅拌 90 分钟后, 在 50 000g, 离心提取物 1 小时。通过在用 pH6.8, 20mM bis-tris 缓冲液平衡过的 PD-10 柱子 (Pharmacia) 上凝胶渗透, 去除 2.5ml 等份的上清液的盐, 其中平衡缓冲液含有 4 mM DTE, 5 mM 苯甲脒, 0.2 mM Pefabloc, 100 μ g/l E-64, 2mg/l 亮抑蛋白酶肽, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2mg/l STI, 2mg/l 抑蛋白酶肽和 20%v/v 甘油。然后, 在 pH6.8, 20mM bis-tris 缓冲液中, 用渐增的氯化钠线性梯度 (0 到 0.3M), 以 3ml/分钟的流动速率, 在 MonoQ HR[®]10/10 柱子上层析部分蛋白质洗脱物 (34mg 蛋白质), 所述缓冲液含有 4 mM DTE, 2mM 苯甲脒, 100 μ g/l E-64, 2mg/l 亮抑蛋白酶肽和 20%v/v 甘油。离开柱子时, 级分用 pH6.8, 10%v/v 的 20mM bis-tris 缓冲液补充, 该缓冲液含有 4 mM DTE, 30mM 苯甲脒, 2 mM Pefabloc, 100 μ g/l E-64, 2mg/l 亮抑蛋白酶肽, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 10mg/l STI, 10mg/l 抑蛋白酶肽和 20%v/v 甘油。在这些条件下, 用相同方法, 检测排除级分(exclusion fraction)和第一洗脱级分中两种甲基化活性 (1 和 2)。合并这些级分, 通过在 Centriprep[®]10, 然后在 Centricon[®]10 上超离心浓缩这些级分。将该浓缩物加入到 0.85M 硫酸铵中, 然后, 在 pH6.8, 50mM bis-tris 缓冲液中, 用渐减的硫酸铵线性梯度 (0.85M 到 0), 以 0.5ml/分钟的流动速率, 在 Phenyl-Superose HR[®]5/5 柱子上层析 (每个循环 20 到 80mg), 其中所述缓冲液含有 4 mM DTE, 2mM 苯甲脒, 100 μ g/l E-64, 2mg/l 亮抑蛋白酶肽, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA 和 10%v/v 甘油。离开柱子时, 级分用 pH6.8, 10%v/v 的 50mM bis-tris 缓冲液补充, 该缓冲

液含有 4 mM DTE, 30mM 苯甲脒, 2 mM Pefabloc, 100 μ g/l E-64, 2mg/l 亮抑蛋白酶肽, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10mg/l STI, 10mg/l 抑蛋白酶肽和 10%甘油。在这些条件下, 用相同的方法, 检测对应于大约 0.15M 硫酸铵的洗脱级分中的两种甲基化活性 (1 和 2)。

该步骤后, 酶是纯的。通过 SDS-PAGE 电泳, 其显示了集中在 32 000 区分子量的单条带。

表 4: 从大肠杆菌 BL21 (DE3) :: pVRC721 纯化突变体 49/66 4-氨基-L-苯丙氨酸 (苯基 N-) 甲基转移酶。根据纯化期间级分的比活性的增加计算纯化倍数。

纯化步骤	体积 (ml)	蛋白质 (mg)	比活性 (单位 ^a /mg)	产率 (%)	纯化倍数
粗提取物	4.3	33.7	3400	-	-
PD10	6	31.5	3400	93.5	1
MonoQ HR 10/10	17.5	3.0	19365	36.9	4.1
Phenyl-Superose	1	0.145	28000	3.5	8.2

^a 这些是如实施例 7.1 中所定义的甲基化 1 的酶活性单位。

7.2.b 野生型、突变体 49 和突变体 66 PapM 酶的纯化

从分别用质粒 pVRC706, pVRC711 和 pVRC713 (参见实施例 4) 转化并且用 IPTG 诱导的大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α 培养物纯化 PapM wt, PapM49 和 papM66 酶。所用纯化方法与实施例 7.2.a 中所述纯化方法相同。

7.3. 纯化的 (野生型和突变的) PapM 甲基化酶的 K_m 和 V_{max} 动力学常数的测定

除了 2mM 浓度的 SAM (用碳 14 同位素放射性标记其甲基 (2Ci/mol)) 外, 测定甲基化活性的条件与实施例 7-1 中所述条件相同。对于用于甲基化 1 的 4-氨基-L-苯丙氨酸底物和用于甲基化 2 的 4-甲氨基-L-苯丙氨酸底物, 各制备从 0.1 到 60mM 变化的浓度范围。对于每种底物的每种浓度, 测定反应速率, 并且以每小时每 mg 蛋白质转化的 nmol 数表示。

从利用 Enzfiter 软件绘制的米曼曲线推导动力学常数的值。

下表中给出了针对天然野生型 PapM 酶和突变体形式 PapM49, PapM66 和 PapM49/66 获得的数值。

表 5

克隆	PAPA		MMPAPA		比率	比率
	Km1 (mM)	Vm1 (nmol/h/mg)	Km2 (mM)	Vm2 (nmol/h/mg)	Km2/ Km1	Vm1/ Vm2
wt	0.5	112600	0.55	114000	1.1	0.99
49	12	10600	30	2820	2.5	3.8
66	0.57	45200	2.2	19700	3.9	2.3
49/66	9	28000	22	9100	2.5	3.1

这些结果表明利用这种方法，可以获得与天然酶比较，显示出新的催化特性的新酶。对于酶的每种突变体形式，测定每个甲基化反应（甲基化 1 和甲基化 2）的酶效力。用比率 $Vm1/Km1$ （甲基化 1）或 $Vm2/Km2$ （甲基化 2）定义这种效力。

然后，对于每种形式，确定酶效力的比率（甲基化反应 1/甲基化反应 2）。该比率等于 $Vm1.Km2/Vm2.Km1$ 。

针对野生型 PapM 酶获得的比率是 1.1。

选择 PapM 突变体，使得酶效力比率大于 2.5。最好的突变体显示了大于 7，优选地在 10 范围内的比率。

表 7

	Km1	Vm1	Km2	Vm2	$Vm1/Km1$	$Vm2/Km2$	$\frac{Vm1.Km2}{Vm2.Km1}$
wt	0.5	112600	0.55	114000	225200	207270	1.08
49	12	10600	30	2820	880	94	9.36
66	0.57	45200	2.2	19700	79300	8950	8.86
49/66	9	28000	22	9100	3110	410	7.58

7.4 两种底物 4-氨基-L 苯丙氨酸和 4-甲氨基-L 苯丙氨酸之间的竞争测定

该实施例示例了如何能区分对于产生 PIB 而言最有效的甲基化酶,即,与对甲基-L-氨基-苯丙氨酸到对二甲氨基-L-苯丙氨酸的第二甲基化反应比较,最好地催化对氨基-L-苯丙氨酸到对甲基-L-苯丙氨酸的第一甲基化反应的酶。

用下面的公式给出两种竞争性底物的转化速度的比率。

$$V1/V2 = (Kcat1/Km1) [S1] / (Kcat2/Km2) [S2]$$

Kcat 是酶的“转化数”或者每单位时间和每摩尔数酶下被甲基化的底物的摩尔数。

该公式对于所有浓度的 S1 和 S2 都有效。

事实上,无论存在什么样的 S1 和 S2 浓度,酶反应总是两种成分的总和,就好像它们是被两种单独的酶所催化一样,一种酶对 S1 起作用,并且被 S2 竞争性抑制,另一种酶对 S2 起作用,并且被 S1 竞争性抑制。

两种底物中一种底物的 Km 和/或 Vmax 的任何改变都将对另一种底物的转化速率产生影响,并且将引起比率 V1/V2 的变化。

因此,对于每一种底物而言,通过注意,均可以避免发挥作用的底物和酶的量转化超过 2% 的底物。

除了 2mM 浓度的 SAM (用碳 14 同位素放射性标记其甲基 (2.5Ci/mol)) 以及同时存在 1mM 浓度的 4-氨基-L-苯丙氨酸和 2mM 浓度的 4-甲氨基-L-苯丙氨酸两种底物外,使用与实施例 7-1 中所述条件相同的测定甲基化活性的条件,可以由此测定每种反应的速率。

利用相同的底物溶液,对实施例 4-6 中所述突变体同时进行该测定。

在这些条件下,双突变的甲基化酶 49/66 看起来是最有选择性的;它催化第一个甲基化反应比第二个好 7 倍,而天然酶以相似的方式催化两个反应。

实施例 8: papM 基因受到破坏的重组始旋链霉菌株系的构建

该实施例示例了 papM 基因受到破坏的重组始旋链霉菌株系的构建。这种株系构成构建如下重组株系的第一步，在所述重组株系中用前述实施例中所述获得和表征的突变等位基因之一置换野生型 papM 基因。此外，这些 papM 基因受到破坏的重组株系主要产生 PI 家族化合物，PINH2（图 3），而这种化合物不能由具有野生型 papM 基因的株系天然合成。因此，这些株系代表了获得 PINH2 的途径，其中所述 PINH2 不可能从 papM 基因没有被破坏的株系分离。

8.1 papM 基因受到破坏的重组菌株的构建

在以下几种始旋链霉菌株系中进行 papM 基因的破坏：

-以前描述的始旋链霉菌 SP92 株系，其产生 PI 和 PII 的混合物（Blanc 等, 1994）；

-化学诱变后来源于 SP92 的株系 SP213。该株系特异地产生 PI。

构建 papM 基因受到破坏的重组菌株的方案对于这两种株系是相同的。在该实施例的余下部分中详细地给出了用 SP213 株系获得的结果。

利用来源于自杀载体 pDH5 的质粒 pVRC1303（参见图 9）制备该构建体，该自杀载体 pDH5 只能在大肠杆菌中复制，并且带有在链霉菌中表达的抗性基因（Hillemann 等, 1991）。

8.1.1 质粒 pVRC1303 的构建

利用如下质粒，在进行图 9 中所述 4 个主要克隆步骤后，构建质粒 pVRC1303：

-载体 pDH5，其带有在大肠杆菌中有功能的复制起点，在大肠杆菌中表达的氨苄青霉素抗性基因和在链霉菌中表达的抗硫链丝菌肽和抗诺雪七肽的基因（Hillemann 等, 1991）；

-质粒 pVRC409（Blanc 等, 1994），其用于制备 2.5kb BsiWI-PstI 片段，该片段带有位于 papM 基因下游的原始霉素基因簇的部分；

-质粒 pVRC900（Blanc 等, 1994；Blanc 等, 1997），其用于制备 3.3kb PvuII-PvuII 片段，该片段带有位于 papM 基因上游的原始霉素基因簇的部分；

-质粒 pHP45 Ω -Km (Fellay 等, 1987) 和 pIJ702 (Hopwood 等, 1985), 在中间克隆步骤后, 其用于制备 3.7kb EcoRI-EcoRI 片段, 该片段实质上带有在大肠杆菌和链霉菌中表达的卡那霉素抗性基因。将带有卡那霉素抗性基因的 Ω -Km 盒子引入 papM 基因上游和下游区域之间, 克隆到 pVRC1303 中, 并且置换丢失的 papM 基因 (图 9)。

根据 Sambrook 等 (1989) 所述的标准方法进行这些克隆所需的所有步骤 (分离质粒 DNA、用限制酶消化质粒 DNA、通过用 Klenow 酶处理补平突出 5' 末端, 通过琼脂糖凝胶电泳对酶消化物进行迁移和分析, 电泳迁移后制备 DNA 片段、连接反应、转化大肠杆菌、筛选和分析重组克隆)。

8.1.2 通过与质粒 pVRC1303 同源重组, 构建 papM 基因受到破坏的重组始旋链霉菌株系

用质粒 pVRC1303 转化株系 SP213 后, 分离重组菌株。

如 Hopwood 等, (1985) 中所述, 通过利用 PEG 的方法进行这些菌株的原生质体制备和转化。在用 5 次 1 μ g pVRC1303 转化后, 将原生质体铺在 R2YE 培养基 (Hopwood 等, 1985) 上, 并且通过覆盖含有 10 μ g/ml 卡那霉素的 3ml SNA 培养基在过夜再生后实施筛选。从所进行的 5 次转化分离 37 个卡那霉素抗性克隆。这些重组体可以:

- 由 (位于 papM 区域上游或下游的质粒区域和染色体之间的简单重组事件后) 质粒 pVRC1303 整合到染色体中引起 (在简单交换的情况下);
- 或者由 (位于 papM 上游或下游的质粒区域和染色体之间的双同源重组事件后) 带有卡那霉素抗性基因的质粒 Ω -Km 盒子和染色体 papM 基因之间的交换引起 (在图 10 中所示双交换的情况下)。

在这两种情况下, Ω -Km 盒子均被转移到重组菌株的染色体上, 并且赋予其对卡那霉素的抗性。另一方面, 只有在简单交换的情况下, 质粒 pVRC1303 (图 9) 中存在的基因才被转移到重组菌株染色体上, 并且赋予其对硫链丝菌肽和/或诺雪七肽的抗性 (Hillemann 等, 1991)。因此, 通过分析对诺雪七肽的敏感性或抗性表型可以区分这两种交换情况 (简单或双交换)。

为此,以斑点形式,在含有 10 μ g/ml 卡那霉素的 HT 培养基(Hopwood 等,1985)上继代培养重组克隆(该重组克隆如上所述来源于用 pVRC1303 进行的 5 次转化并筛选了它们对 10 μ g/ml 卡那霉素的抗性),然后在含有 400 μ g/ml 诺雪七肽的 HT 培养基上检测该重组克隆。只选定显示表型(Kana^R, Nosi^S)的克隆,因为它们对应于所寻找的双交换情况。然后,用下面的方式纯化这些重组克隆:在含有 10 μ g/ml 卡那霉素的 HT 培养基上接种和生长后,根据 Hopwood 等,(1985)的方法制备这些克隆的孢子原种,然后将其稀释,并且再次接种在相同培养基上以获得分离的菌落。这些菌落组成了选定克隆的纯亚克隆。因此,分析来源于 5 个不同克隆的 2 个亚克隆。

为了验证这些亚克隆的染色体结构,在含有 10 μ g/ml 卡那霉素的液体 YEME 培养基中培养它们后,根据 Hopwood 等,(1985)所述,利用溶菌酶裂解并利用苯酚/氯仿提取,提取亚克隆基因组 DNA。对用 EcoRI 和 SphI 消化的这些不同克隆的总 DNA 进行几轮 Southern 印迹,与用 EcoRI 线性化的质粒 pVRC1303 杂交,其中该质粒用 Amersham 所售标记试剂盒(随机引发 DNA 标记试剂盒)和(α -³²P)dCTP 通过随机引发标记后做为探针。所用技术是 Sambrook 等,(1989)中所述技术。杂交结果清楚地表明这些亚克隆通过图 10 所示的载体 pVRC1303 和 SP213 株系染色体之间的双交换获得。特别地验证了在这些亚克隆中存在与探针杂交的 9.9kb EcoRI 片段,该片段在野生型 SP213 株系中不存在,野生型 SP213 株系中杂交的 EcoRI 片段大小是 6.8kb。

具有基因型 SP213 Δ papM:: Ω kanaR 的克隆之一称为 SP216。 , 选定该克隆用于对其生产进行分析并用于继续遗传构建以获得用前述实施例所述 papM 的突变或双突变等位基因之一置换了野生型 papM 基因的重组菌株。

8.2 通过突变体 SP216 产生原始霉素

该实施例示例了如何测定在标准发酵条件下, papM 基因受到破坏的始旋链霉菌 SP216 突变体主要产生 PINH2[4 ξ -氨基-脱(4 ξ -二甲氨基)

原始霉素 IA]。图 2 示出了 PINH2 的结构。

在液体生产培养基中培养突变体 SP216 和对照野生型株系 SP213。按照下面过程进行发酵：在无菌条件下，向 300ml 带挡板锥形瓶中的 40ml 接种培养基添加 0.5ml 上述株系的孢子悬浮液。该接种培养基的组成为：10g/l 玉米浆，15g/l 蔗糖，10g/l (NH₄)₂SO₄，1g/l K₂HPO₄，3g/l NaCl，0.2g/l MgSO₄·7H₂O 和 1.25 g/l CaCO₃。在引入碳酸钙以前，用氢氧化钠将 pH 调节到 6.9。在 27℃，在旋转振荡器上，以 325rpm 的速率振荡锥形瓶 44 小时。向 300ml 锥形瓶中的 30ml 生产培养基中无菌添加 2.5ml 前述 44 小时培养物。生产培养基的组成为：25 g/l 大豆粉，7.5g/l 淀粉，22.5g/l 葡萄糖，3.5g/l 饲料酵母、0.5g/l 硫酸锌和 6g/l 碳酸钙。在引入碳酸钙以前，用盐酸将 pH 调节到 6.0。

在 27℃，振荡锥形瓶 50 小时。发酵一结束，测定发酵液体积，并且添加 2 体积的流动相，该流动相由 34% 乙腈和 66% 的 0.1M KH₂PO₄ 溶液组成（用浓 H₃PO₄ 调节到 pH2.9），允许提取原始霉素。振荡后，过滤所有混合物；原始霉素包含在上清液中。然后，通过 HPLC，将 150μl 离心上清液注射到 4.6 × 150mm 的 Nucleosil 5-C8® 柱子上，用 pH2.9 的 40% 乙腈和 60% 0.1M 磷酸缓冲液的混合物洗脱，分析原始霉素。通过在 206nm 的 UV 吸收和可选地，通过它们的荧光发射（370nm 滤光片，在 306nm 激发）检测原始霉素。下表中给出了原始霉素的产量：

表 8:株系 SP213 和 SP216 的 PINH2 产量水平（用 mg/l 表示）

株系	PINH2
SP213(papM wt)	<0.1
SP216 (ΔpapM::Ω kanaR)	7

这些结果表明在生产的发酵条件下，突变体 SP216 实质上产生 PINH2，而对照 SP213 产生主要包含 PIA 的标准量的 PI。

实施例 9: 含有等位基因 49/66 papM 基因或等位基因 66 papM 基因的重组始旋链霉菌株系的构建

该实施例示例了具有突变 papM 基因的重组始旋链霉菌株系选择性产生 PI 家族化合物 PIB (图 2) 的能力。具有野生型 papM 基因的菌株以最大约 5% 的非常低水平天然合成 PIB。因此, 这些菌株代表了通过大量和非常特异地产生 PIB 而获得 PIB 的途径。

9.1 突变了 papM 基因的重组菌株的构建

将突变的 papM 基因 49/66 引入到产生 PI 和 PII 混合物的先前所述始旋链霉菌株系 SP92 (Blanc 等,1994) 中, 和引入到化学诱变后来源于 SP92 的 SP213 株系中; 株系 SP213 特异地产生 PI。

将突变的 papM 基因 66 引入到来源于 SP92 的株系 SP213 中。

无论选择什么突变类型的 papM 基因等位基因 (49/66 或 66) 以及无论选择什么株系, 构建带有 papM 基因突变等位基因之一的重组菌株的方案都相同。其组成为: 用自杀质粒转化重组菌株, 其中, 该重组菌株中已经破坏并且用 Ω -Km 盒子置换了野生型 papM 基因 (参见实施例 8), 而所述自杀质粒允许该盒子与 papM 的突变等位基因之一进行交换。

通过示例的方式, 下面详细地描述了向株系 SP216 (如实施例 8 中所述产生 SP216 株系) 中引入等位基因 49/66 突变 papM 基因。利用来源于自杀载体 pDH5 的质粒 pVRC1306 (参见图 11) 进行该构建, 该载体 pDH5 只能在大肠杆菌中复制, 并且带有在链霉菌中表达的抗硫链丝菌肽和抗诺雪七肽的基因 (Hillemann 等,1991)。

实施例 9.2 给出了用几种重组菌株获得的原始霉素生产结果, 所述重组菌株来源于 SP92 或来源于 SP213 并且表达突变的 papM 基因 66 或突变的 papM 基因 49/66。

9.1.1 质粒 pVRC1306 的构建

从带有 papM 基因缺失的质粒 pVRC1303 构建带有等位基因 49/66 papM 基因的质粒 pVRC1306。如图 11 所示, 分三步进行该构建。对于这些克隆, 使用下面的质粒:

-质粒 pBR322 是用于在大肠杆菌中克隆的载体,其用作中间载体用于转移实施例 8.1.1 中所述 pVRC1303 的 8.9kb EcoRI 片段,该片段尤其含有用带有卡那霉素抗性基因的 W-Km 盒子缺失的 papM 基因。在 pBR322 的 EcoRI 位点进行该克隆,并且获得的质粒称为 pVRC1304。

- 实施例 6 中所述质粒 pVRC 721(图 6)用于制备含有等位基因 49/66 papM 基因的 1kb MluI-AgeI 插入片段。然后,该插入片段与 pVRC1304 的 4kb MluI-AgeI 片段交换,获得的质粒称为 pVRC1305。

-质粒 pVRC1303 可以使 8.9kb EcoRI 片段与 pVRC1305 中含有等位基因 49/66 papM 基因的 5.83kb EcoRI 片段交换。

因此,最终质粒 pVRC1306(图 11)含有等位基因 49/66 papM 基因和该基因的上游和下游部分,此整个装配物被克隆到实施例 8.1.1 中所述载体 pDH5 中。

9.1.2 通过和质粒 pVRC1306 同源重组,构建突变了等位基因 49/66 papM 基因的重组始旋链霉菌株系

用质粒 pVRC1306 转化实施例 8 中所述 SP216 株系后,分离重组菌株。为此,需要两步,第一步为通过表型分析(Kana^R, Nosi^R)选择来源于 papM 基因上游的质粒区域和染色体之间的简单同源重组事件的株系(图 12)。第二步为利用菌株(Kana^R, Nosi^R),通过分析所获克隆的表型(Kana^S, Nosi^S)筛选第二个同源重组事件(图 13)。

下面描述了这两个步骤的实施:

如 Hopwood 等,(1985)中所述,通过利用 PEG 的方法进行这些株系的原生质体的制备和其转化。进行 10 个单独的转化,每个转化使用 1 μ g pVRC1306。将原生质体铺在 R2YE 培养基(Hopwood 等,1985)上,并且通过覆盖含有 400 μ g/ml 诺雪七肽的 3ml SNA 培养基在过夜再生后进行筛选。

从所进行的 10 个转化,分离到 7 个抗诺雪七肽的克隆。这些重组体由位于 papM 基因上游的质粒区域和染色体之间的简单同源重组事件后,质粒 pVRC1306 整合到染色体中引起,这赋予了这些克隆对卡那霉素(由于

转化的株系)和对诺雪七肽(由于质粒的重组)的双重抗性。因此,在含有 10 μ g/ml 卡那霉素的 HT 培养基上和含有 400 μ g/ml 诺雪七肽的 HT 培养基上继代培养所述 7 个重组克隆。所有这些克隆显示了预期的表型(Kana^R, Nosi^R)。根据下面的方法纯化这些克隆 2 次:根据 Hopwood 等,(1985)的方法制备这些克隆的孢子原种,并且通过在含有 400 μ g/ml 诺雪七肽的 HT 培养基上涂各种稀释度的原种,获得分离的菌落。这些菌落为选定克隆的纯亚克隆。通过 Southern 印迹分析了来源于 2 个克隆的 2 个亚克隆的染色体结构。

在含有 4 μ g/ml 诺雪七肽的 YEME 液体培养基中培养后提取基因组 DNA。根据 Hopwood 等,(1985)所述用溶菌酶处理并用苯酚/氯仿提取,提取 DNA。用 EcoRI 和 AseI 限制酶消化这些不同亚克隆的总 DNA,之后进行几轮 Southern 印迹。通过用 Amersham 所售标记试剂盒(随机引发的 DNA 标记试剂盒)和(α -³²P)dCTP 进行随机引发标记后,用 EcoRI 消化来源于 pVRC1303 的 8.9kb 片段用作探针。所用技术是 Sambrook 等,(1989)中所述技术。杂交结果(对应于 6.83, 3.42, 3.125 和 2.06kb 的条带)清楚地表明这些亚克隆通过载体 pVRC1306 和株系 SP216 染色体之间的简单交换获得。株系 SP216 的 DNA 显示了对应于 4.42, 3.125 和 2.06kb 的条带,但是没有显示对应于 6.83kb 的条带。

这些克隆中的一个克隆称为 SP216:: pVRC1306。

第二步为利用株系 SP216:: pVRC1306, 筛选 papM 基因下游的质粒区域和染色体之间的第二同源重组事件(参见图 13)。这步导致对如下重组克隆的筛选,该重组克隆中用 Ω -Km 盒缺失的 papM 基因已经和等位基因 49/66 papM 基因发生交换;重组克隆的预期表型是(Kana^S, Nosi^S)。

利用克隆 SP216:: pVRC1306, 在 30 $^{\circ}$ C, 以 325rpm 速率, 在旋转振荡器上进行 2 个生长周期,以促进第二重组事件。用 200 μ l SP216:: pVRC1306 孢子原种, 在 10ml YEME 培养基中进行第一个周期(培养条件: 30 $^{\circ}$ C, 280rpm, 72 小时), 用 800 μ l 第一个周期的悬浮液, 在 40ml YEME 培养基中进行第二个周期(培养条件: 30 $^{\circ}$ C, 280rpm, 72 小时)。以 3500rpm

离心第二培养物 15 分钟，将沉淀溶于 600 μ l 水+0.01%Tween 中，并且在 HT 培养基上涂板该悬浮液以获得孢子层。为了纯化来源于该液体培养物的重组克隆，收获孢子，并且在 HT 培养基上涂板这些孢子的稀释悬浮液以获得分离的菌落。

为了筛选具有期望表型 (Kana^S, Nosi^S) 的克隆，继代培养和筛选 1000 个分离的菌落。在没有抗生素的 HT 培养基上和含有 10 μ g/ml 卡那霉素的 HT 培养基上自动继代培养这些菌落。该第一步使得可以筛选 18 个重组 Kana^S 克隆。从没有抗生素的 HT 培养基人工地挑取这 18 个克隆，并且在没有抗生素的 HT 培养基，含有 10 μ g/ml 卡那霉素的 HT 培养基和含有 400 μ g/ml 诺雪七肽的 HT 培养基上继代培养。选择具有表型 (Kana^S, Nosi^S) 的 3 个重组克隆，因为其可能来源于双交换事件。利用上述方法纯化这些克隆，从孢子层制备孢子原种和进行基因组分析。

分两步进行重组亚克隆的染色体分析：第一步为验证等位基因 49/66 papM 基因存在并且该基因上游和下游染色体区域没有被修饰。第二步为验证对应于 W-Km 盒子和对应于质粒 pDH5 的 DNA 片段不存在。

对于第一步，根据上述方法，制备重组克隆基因组 DNA，并且通过 Southern 印迹进行总 DNA 分析。用 EcoRI 和 AseI 限制酶消化总 DNA。用 MluI 消化质粒 pVRC721(含有等位基因 49/66 papM 基因的 1.7kb 插入片段)。该标记的片段用做探针，与对应于 6.83kb 条带的片段杂交。

此外，用 SalI 消化总 DNA。来源于 pVRC409 和来源于 pVRC803 的标记片段(含有株系 SP213 papM 基因的上游和下游区域, Blanc 等, 1994; Blanc 等, 1997) 用做探针。杂交后，这些片段使得可以提示 7 个条带 (2.45, 0.190, 2.150, 0.725, 1.55, 0.4 和 0.55kb)。

第二步为验证不再有对应于 Ω -Km 盒子或质粒 pDH5 的 DNA 片段。用 EcoRI 和 AseI 消化总 DNA。pHP45 Ω -Km 的 2.2kb HindIII 片段(Ω -Km 盒子) (Fellay 等, 1987) 和 pDH5 用做探针。

3 个重组克隆显示了图 13 所示染色体模式，这证实了等位基因 49/66 papM 基因的存在，及卡那霉素抗性基因和对应于质粒 pDH5 的片段的不

存在。这些元件表明等位基因 49/66 papM 基因的基因组环境是完整的。选定克隆并且称为株系 SP217。

用相同的方法，构建了整合等位基因 49/66 突变 papM 基因或等位基因 66 papM 基因的其它始旋链霉菌株系。它们是：

-SP101，其来源于用带有等位基因 49/66 突变 papM 基因的质粒 pVRC1306 转化的株系 SP92；

-SP218，其来源于用等同于 pVRC1306 但是等位基因 49/66 突变 papM 基因已经被等位基因 66 突变 papM 基因置换的质粒转化的株系 SP216。

9.2 通过始旋链霉菌株系 SP213，SP217，SP218，SP100 和 SP101 的原始霉素生产

该实施例显示了各种突变体的原始霉素生产。具体地，它示例了与对照 papM wt 株系（株系 SP213）比较，等位基因 49/66 突变 papM 突变体（株系 SP217）和等位基因 66 papM 突变体（株系 SP218）的 PIB 产量增加。也相对于对照 papM wt 株系（株系 SP92），比较了等位基因 49/66 突变 papM 基因（株系 SP101）的作用。

产生、提取和测定原始霉素的技术与实施例 8.2 中所述技术相同。

下表中给出了相对于对照株系（SP213 和 SP92）PIA 量表示的各种原始霉素的产量水平。

表 9: 各种始旋链霉菌株系的原始霉素 PI 的产量。产生的 PI 值用 mg/l 表示。

株系	PIA	PIB	PINH2	其它 PI
SP213(papM wt)	474	39	0	25
SP217 (papM 49/66)	0	162	57	19
SP218(papM 66)	19	271	14	32

层	PIA	PIB
SP92(papM wt)	100	3
SP101(papM 66)	0	11

这些结果证实表达本发明 papM 多肽突变体的基因赋予了始旋链霉菌

株系优良的 PIB 生产选择性。

<110> 安万特医药股份有限公司 (AVENTIS PHARMA S.A.)

<120> 新的链霉菌属细菌PapM多肽变异体

<130> PapM polypeptide

<140> FR0208057

<141> 2002-06-28

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1052

<212> DNA

<213> 始旋链霉菌 (Streptomyces pristinaespiralis)

<220>

<221> CDS

<222> (84)..(962)

<400> 1

ctcgaggacg agtggatcgc ctccggcggc gcccccgctcc ccacgcccggt gcacgcgtcc 60

gcgtccgcgc gggggggccgt gtc gtg acc gcc gcc gca ccc acc ctc gcc cag 113
 Val Thr Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ala Gln
 1 5 10

gcg ctg gac gag gcc acc ggg cag ctg acc ggc gcc ggg atc acc gcc 161
 Ala Leu Asp Glu Ala Thr Gly Gln Leu Thr Gly Ala Gly Ile Thr Ala
 15 20 25

gac gcc gcc cgg gcc gac acc cgg ctg ctg gcc gcc cac gcc tgc cag 209
 Asp Ala Ala Arg Ala Asp Thr Arg Leu Leu Ala Ala His Ala Cys Gln
 30 35 40

gtc gcc ccg ggg gac ctc gac acc tgc ctg gcc ggc ccg gtg ccg ccc 257
 Val Ala Pro Gly Asp Leu Asp Thr Cys Leu Ala Gly Pro Val Pro Pro
 45 50 55

cgg ttc tgg cac tac gtc cgg cgc cgt ctg acc cgc gaa ccc gcc gaa 305
 Arg Phe Trp His Tyr Val Arg Arg Arg Leu Thr Arg Glu Pro Ala Glu
 60 65 70

cgc atc gtc ggc cac gcc tac ttc atg ggc cac cgc ttc gac ctg gcc 353
 Arg Ile Val Gly His Ala Tyr Phe Met Gly His Arg Phe Asp Leu Ala
 75 80 85 90

ccc ggc gtc ttc gtc ccc aaa ccc gag acc gag gag atc acc cgg gac 401
 Pro Gly Val Phe Val Pro Lys Pro Glu Thr Glu Glu Ile Thr Arg Asp
 95 100 105

gcc atc gcc cgc ctg gag gcc ctc gtc cgc cgc ggc acc acc gca ccc 449
 Ala Ile Ala Arg Leu Glu Ala Leu Val Arg Arg Gly Thr Thr Ala Pro
 110 115 120

ctg gtc gtc gac ctg tgc gcc gga ccg ggc acc atg gcc gtc acc ctg 497
 Leu Val Val Asp Leu Cys Ala Gly Pro Gly Thr Met Ala Val Thr Leu

125					130					135						
gcc	cgc	cac	gta	ccg	gcc	gcc	cgc	gtc	ctg	ggc	atc	gaa	ctc	tcc	cag	545
Ala	Arg	His	Val	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Gln	
	140						145				150					
gcc	gcc	gcc	cgc	gcc	gcc	cgg	cgc	aac	gcc	cgc	ggc	acc	ggc	gcc	cgc	593
Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Arg	Asn	Ala	Arg	Gly	Thr	Gly	Ala	Arg	
155						160				165					170	
atc	gtg	cag	ggc	gac	gcc	cgc	gac	gcc	ttc	ccc	gaa	ctg	agc	ggc	acc	641
Ile	Val	Gln	Gly	Asp	Ala	Arg	Asp	Ala	Phe	Pro	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr	
				175					180						185	
gtc	gac	ctc	gtc	gtc	acc	aac	ccg	ccc	tac	atc	ccc	atc	gga	ctg	cgc	689
Val	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Pro	Tyr	Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Arg	
			190						195					200		
acc	tcc	gca	ccc	gaa	gtg	ctc	gag	cac	gac	ccg	ccg	ctg	gcc	ctg	tgg	737
Thr	Ser	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	His	Asp	Pro	Pro	Leu	Ala	Leu	Trp	
		205						210					215			
gcc	ggg	gag	gag	ggc	ctc	ggc	atg	atc	cgc	gcc	atg	gaa	cgc	acc	gcg	785
Ala	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Gly	Met	Ile	Arg	Ala	Met	Glu	Arg	Thr	Ala	
	220					225					230					
gcc	cgg	ctg	ctg	gcc	ccc	ggc	ggc	gtc	ctg	ctc	ctc	gaa	cac	ggc	tcc	833
Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	His	Gly	Ser	
235					240					245					250	
tac	caa	ctc	gcc	tcc	gtg	ccc	gcc	ctg	ttc	cgc	gca	acc	ggc	cgc	tgg	881
Tyr	Gln	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Leu	Phe	Arg	Ala	Thr	Gly	Arg	Trp	
				255					260						265	
agc	cac	gcc	tcg	tcc	cgt	ccc	acc	tgc	aac	gac	ggc	tgc	ctg	acc	gcc	929
Ser	His	Ala	Ser	Ser	Arg	Pro	Thr	Cys	Asn	Asp	Gly	Cys	Leu	Thr	Ala	
			270					275					280			
gta	cgc	aac	cac	acc	tgc	gca	ccg	ccc	gcc	tga	cacggcgtca	cggcacggcc				982
Val	Arg	Asn	His	Thr	Cys	Ala	Pro	Pro	Ala							
		285					290									
ggcctgtcgg	caacgaccct	acgccattga	caaaccgacc	gtgccgtttt	tttaatgtcg											1042
gggtggcgga																1052
<210>	2															
<211>	292															
<212>	PRT															
<213>	始旋链霉菌															
<400>	2															
Val	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Asp	Glu	Ala	Thr	
1				5					10					15		
Gly	Gln	Leu	Thr	Gly	Ala	Gly	Ile	Thr	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ala	Asp	
			20					25					30			
Thr	Arg	Leu	Leu	Ala	Ala	His	Ala	Cys	Gln	Val	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	
		35					40					45				

Asp Thr Cys Leu Ala Gly Pro Val Pro Pro Arg Phe Trp His Tyr Val
 50 55 60

Arg Arg Arg Leu Thr Arg Glu Pro Ala Glu Arg Ile Val Gly His Ala
 65 70 75 80

Tyr Phe Met Gly His Arg Phe Asp Leu Ala Pro Gly Val Phe Val Pro
 85 90 95

Lys Pro Glu Thr Glu Glu Ile Thr Arg Asp Ala Ile Ala Arg Leu Glu
 100 105 110

Ala Leu Val Arg Arg Gly Thr Thr Ala Pro Leu Val Val Asp Leu Cys
 115 120 125

Ala Gly Pro Gly Thr Met Ala Val Thr Leu Ala Arg His Val Pro Ala
 130 135 140

Ala Arg Val Leu Gly Ile Glu Leu Ser Gln Ala Ala Ala Arg Ala Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Asn Ala Arg Gly Thr Gly Ala Arg Ile Val Gln Gly Asp Ala
 165 170 175

Arg Asp Ala Phe Pro Glu Leu Ser Gly Thr Val Asp Leu Val Val Thr
 180 185 190

Asn Pro Pro Tyr Ile Pro Ile Gly Leu Arg Thr Ser Ala Pro Glu Val
 195 200 205

Leu Glu His Asp Pro Pro Leu Ala Leu Trp Ala Gly Glu Glu Gly Leu
 210 215 220

Gly Met Ile Arg Ala Met Glu Arg Thr Ala Ala Arg Leu Leu Ala Pro
 225 230 235 240

Gly Gly Val Leu Leu Leu Glu His Gly Ser Tyr Gln Leu Ala Ser Val
 245 250 255

Pro Ala Leu Phe Arg Ala Thr Gly Arg Trp Ser His Ala Ser Ser Arg
 260 265 270

Pro Thr Cys Asn Asp Gly Cys Leu Thr Ala Val Arg Asn His Thr Cys
 275 280 285

Ala Pro Pro Ala
 290

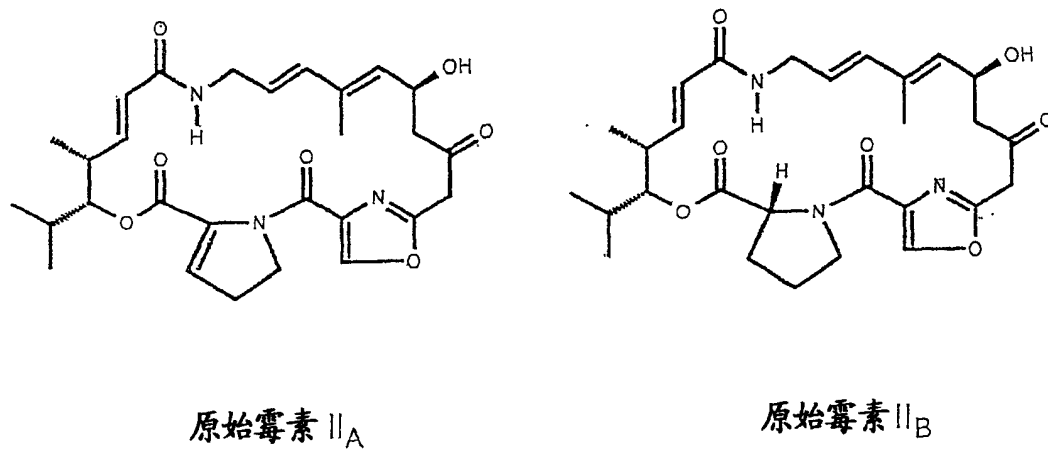
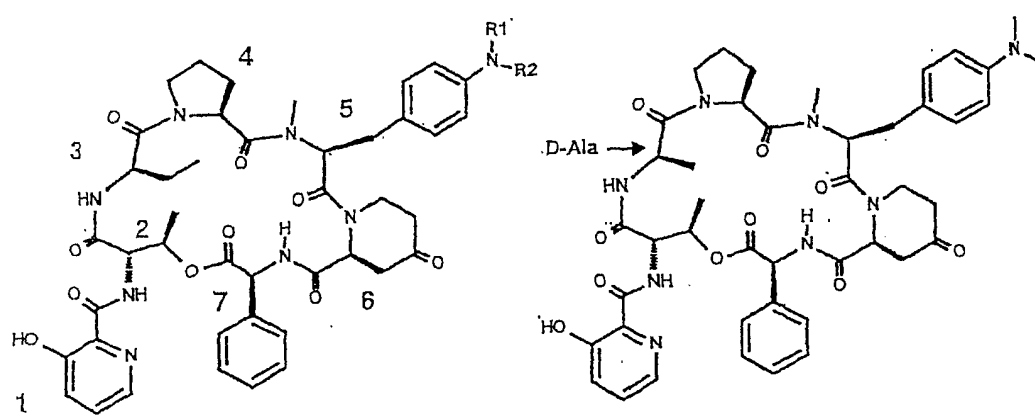


图1



原始霉素_A R1 = R2 = Me
 原始霉素_B R1 = H, R2 = Me
 PINH2 R1 = R2 = H

原始霉素_C

图 2

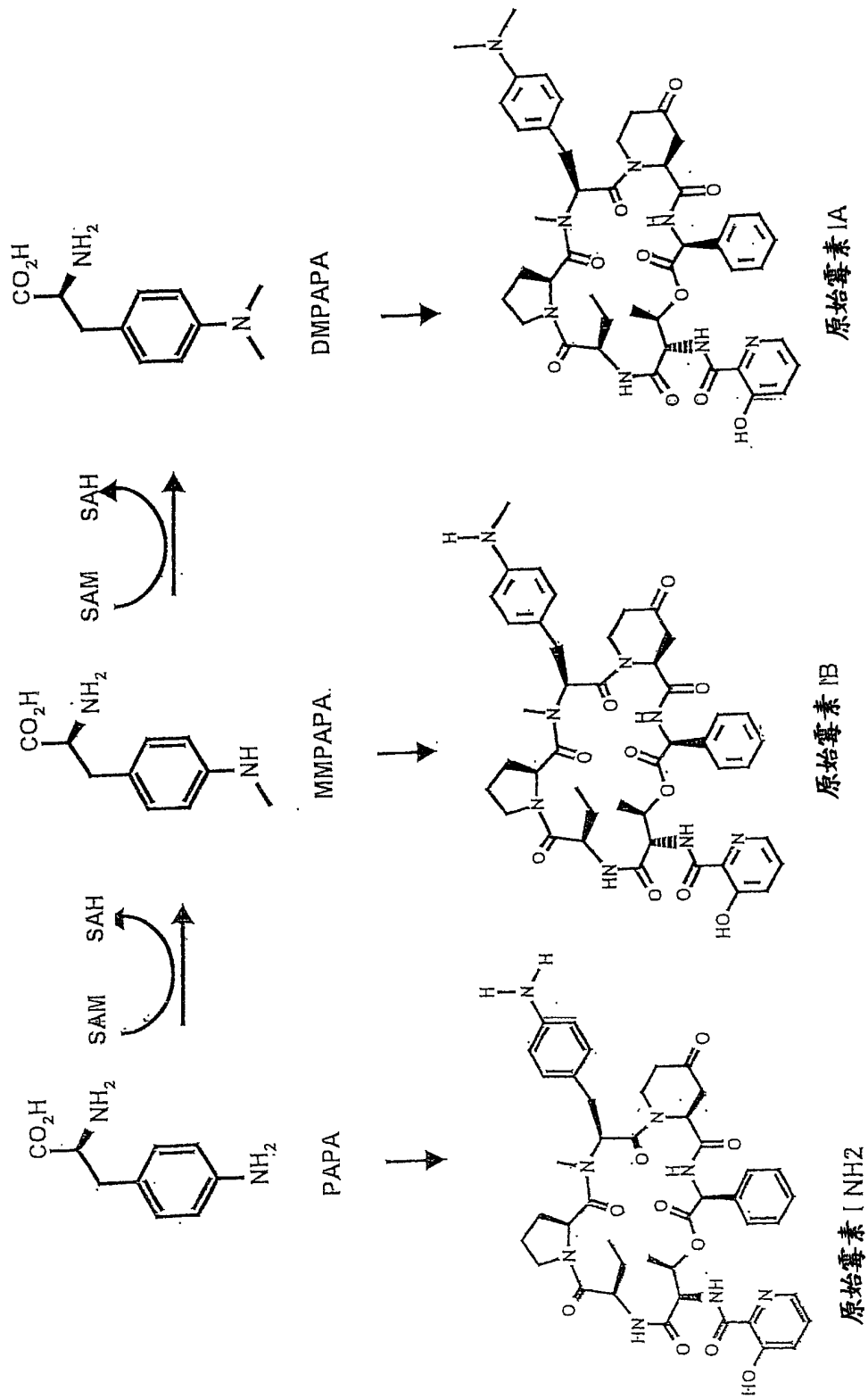


图 3

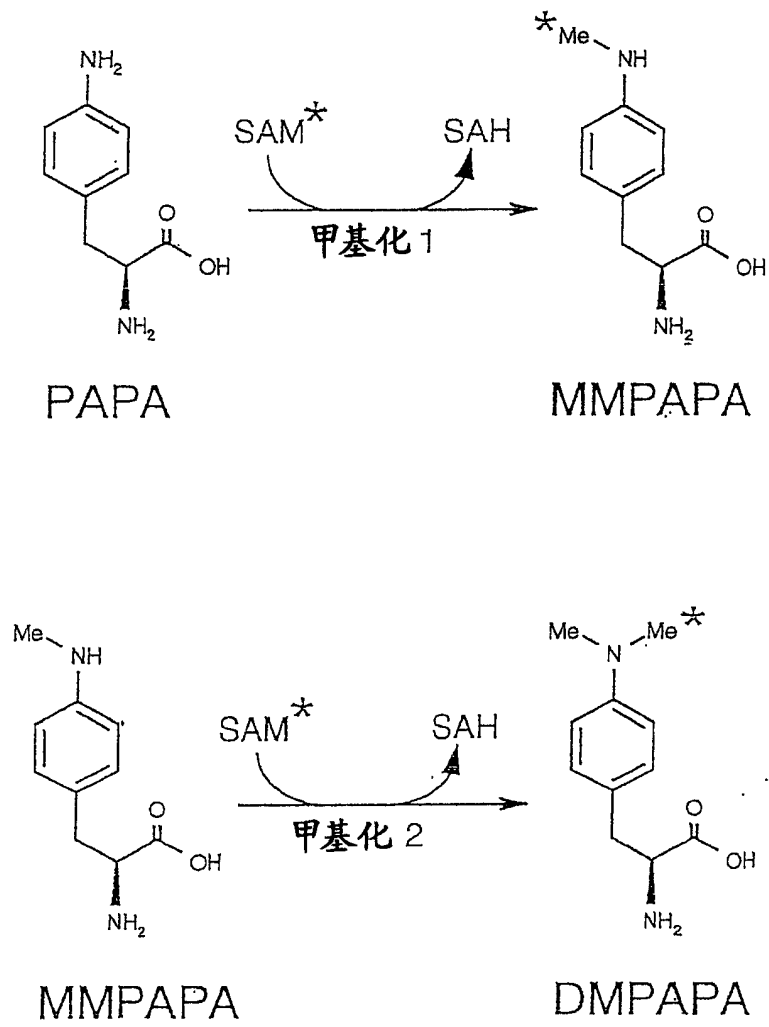


图 4



图 5

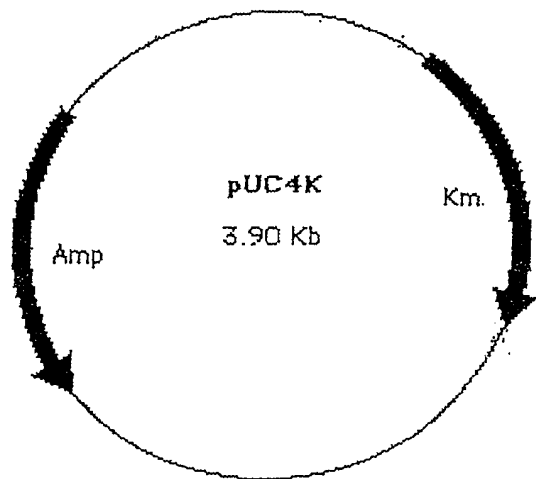


图 6

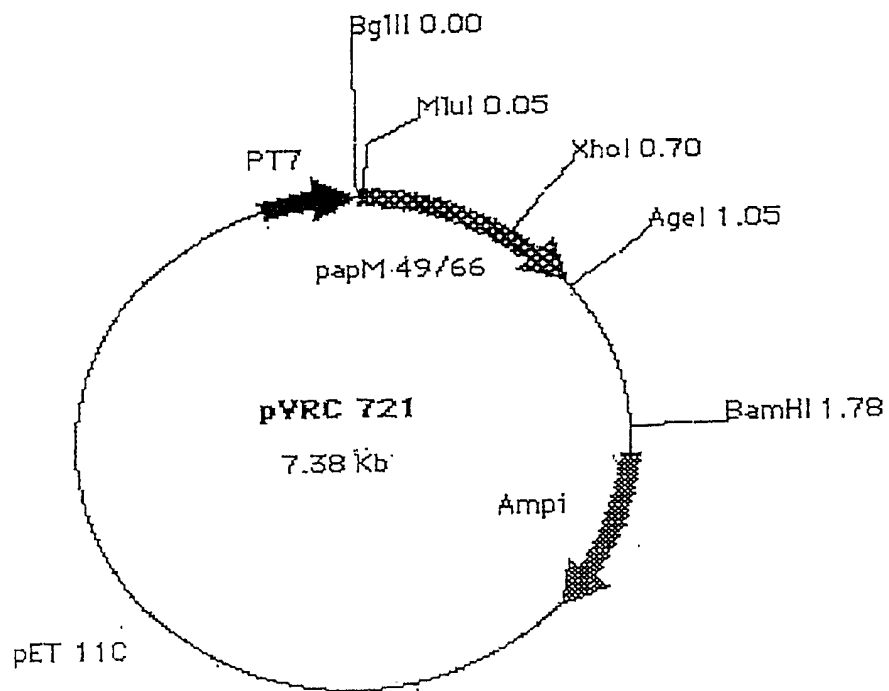


图 8

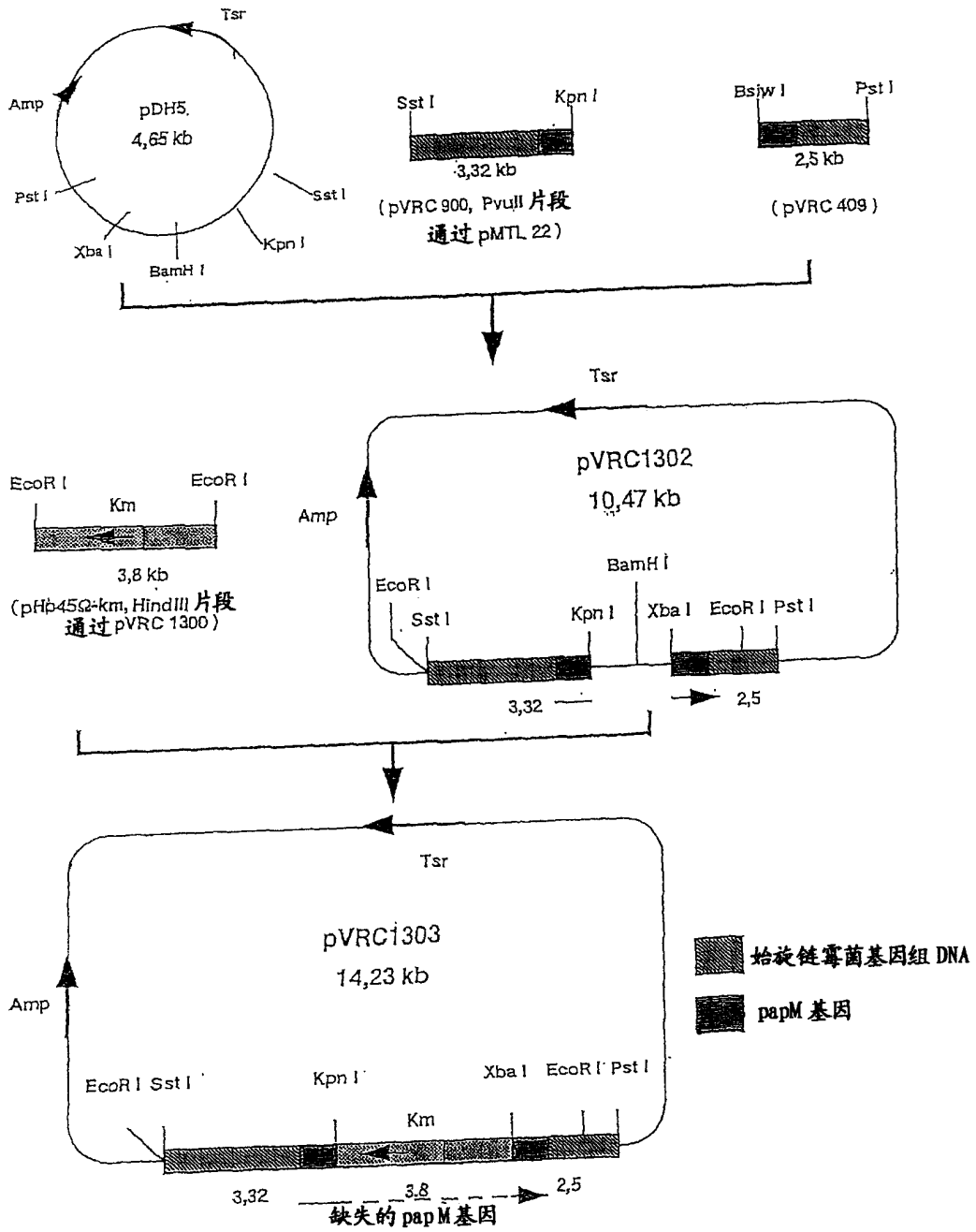


图 9

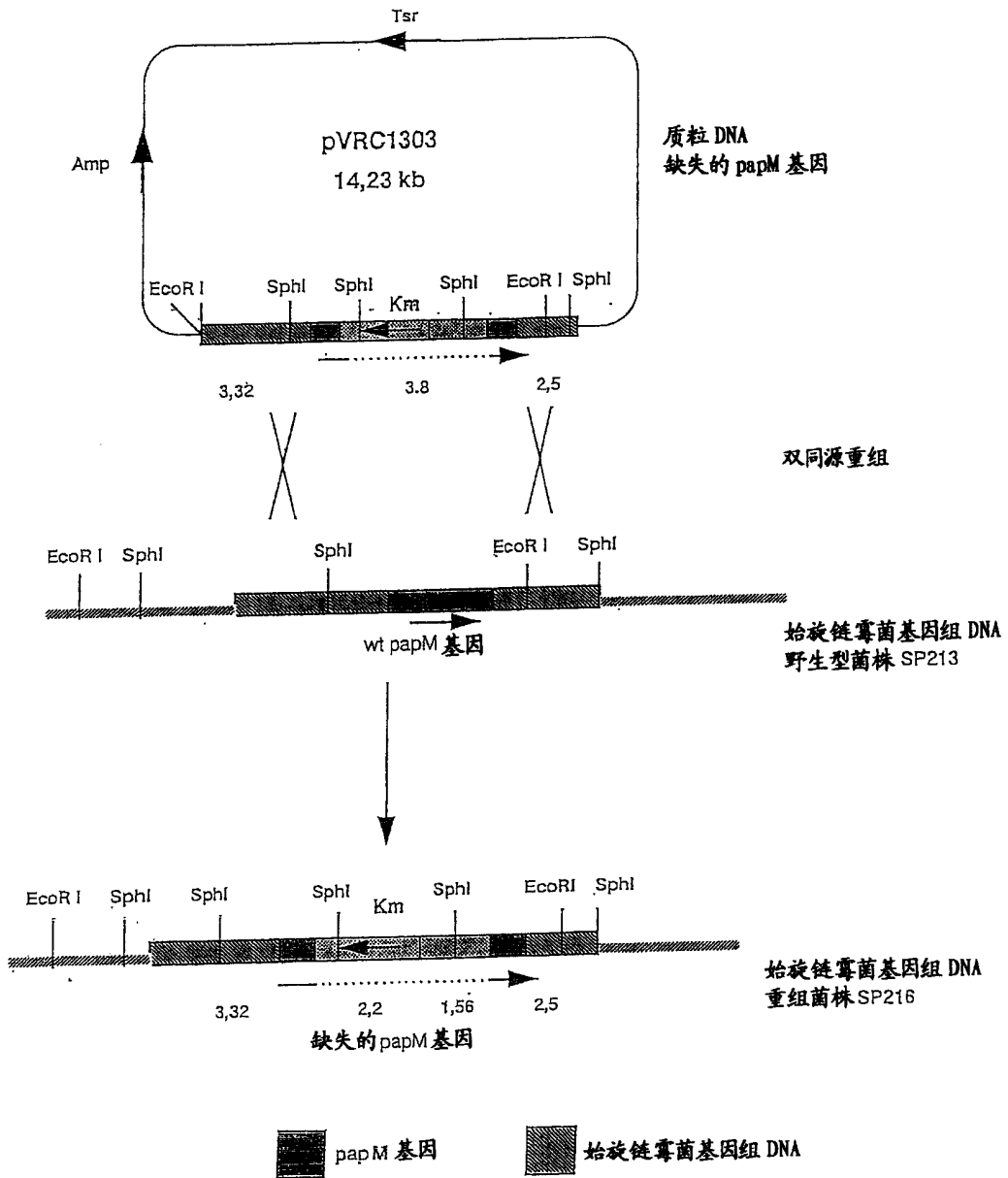


图 10

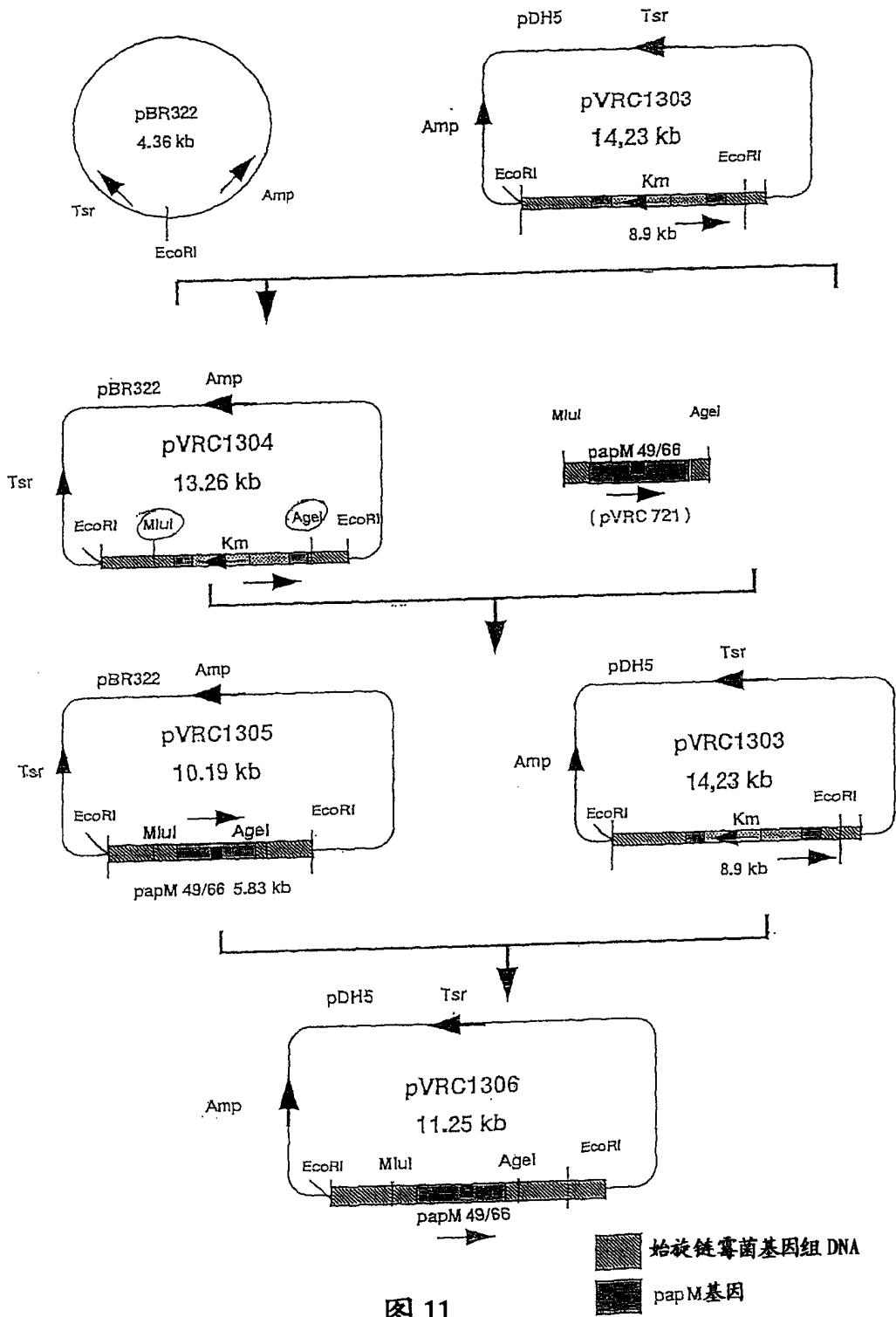


图 11

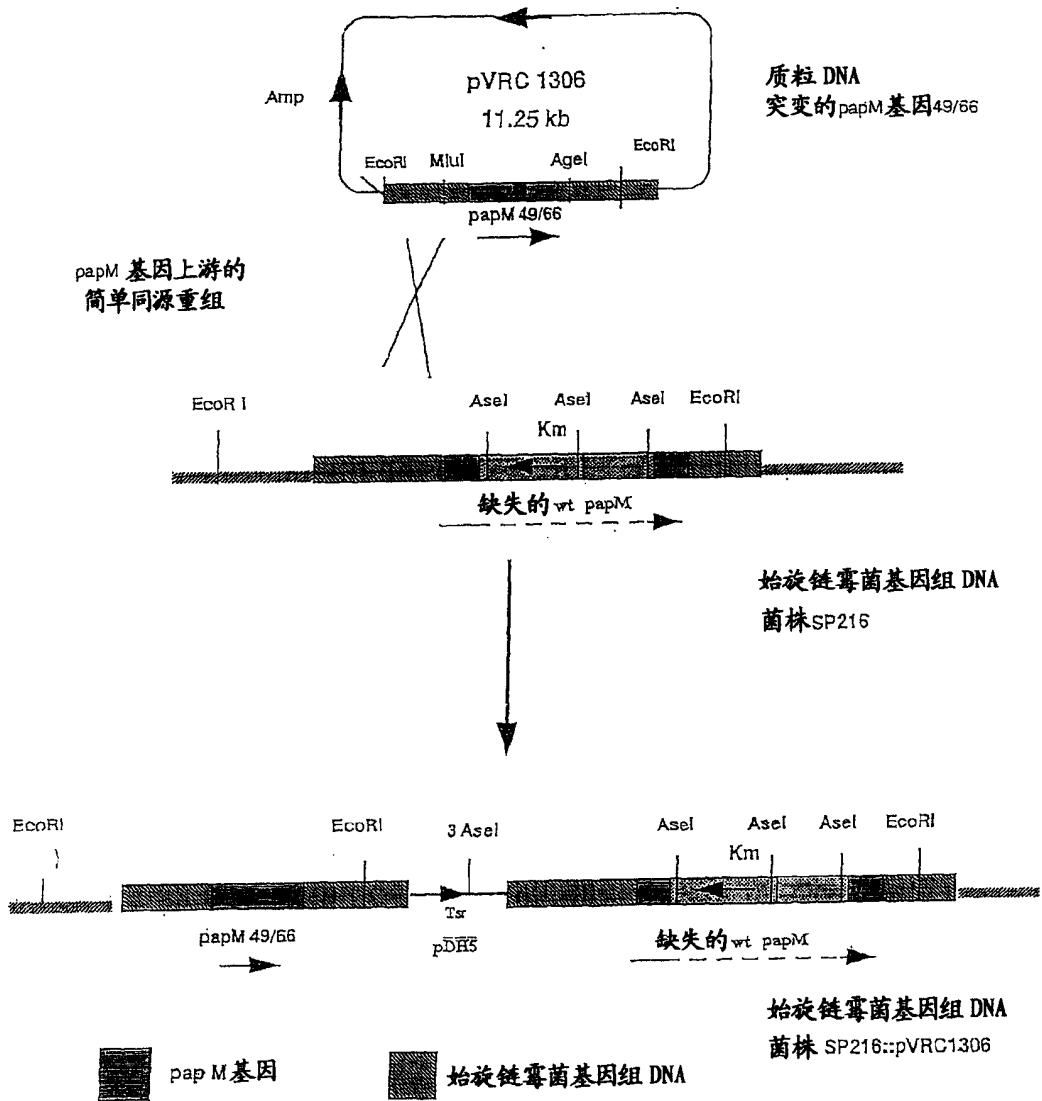


图 12

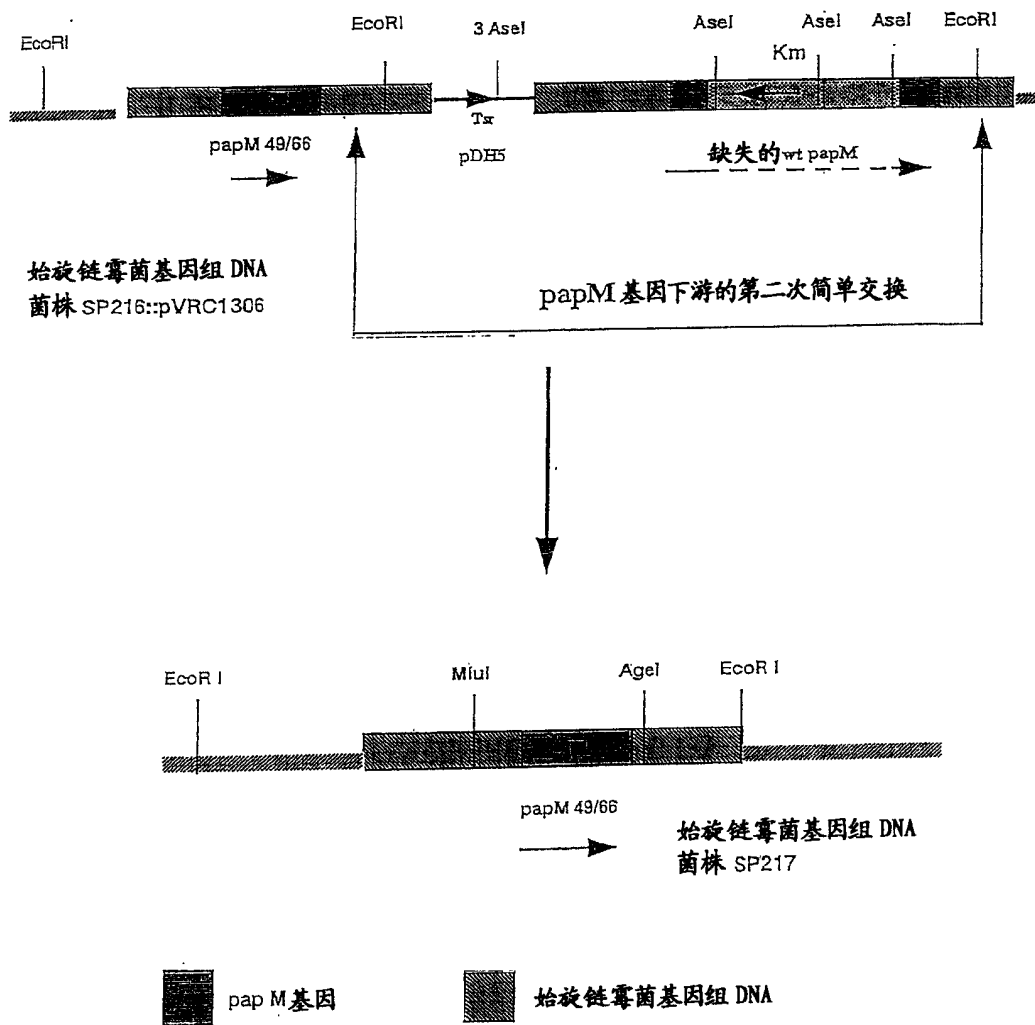


图 13