(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 470 T2** 2005.11.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 099 755 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 470.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP99/03410**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 926 825.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/04134**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.06.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **27.01.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.05.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **22.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.11.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 9/02**

(30) Unionspriorität:
20320098 17.07.1998 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, FR, GB, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Cosmo Oil Co. Ltd., Tokio/Tokyo, JP; Cosmo Research Institute, Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(72) Erfinder:
MASAI, Eiji, Nagaoka-shi, JP; FUKUDA, Masao, Nagaoka-shi, JP; KATAYAMA, Yoshihiro, Nerima-ku, JP; NISHIKAWA, Seiji, Saitama 340-0913, JP; HOTTA, Yasushi, Saitama 340-0913, JP

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGES GEN UND TRANSFORMANT, WELCHER DIESES BEINHALTET**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES FELD

[0001] Diese Erfindung betrifft α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase als ein Enzym, welches α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd in 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure umwandelt, ein Gen welches dieses Enzym codiert, einen rekombinanten Vektor, welcher dieses Enzym enthält, und eine Transformante, welche dieses Gen trägt, sowie außerdem einen Prozeß zur Herstellung des Enzyms und von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure unter Verwendung des Enzyms.

STAND DER TECHNIK

[0002] α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase ist ein Enzym, welches α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd in 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure umwandelt, und eine wichtige Rolle bei der Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure spielt, welches als Rohstoff für Polymere nützlich ist. Daher ist es für die Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure äußerst wichtig, das Gen der α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase zu bestimmen, und des weiteren die von diesem Gen codierte α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase in großem Maßstab herzustellen.

[0003] Andererseits wurden in den vergangenen Jahren bemerkenswerte Entwicklungen der rekombinanten DNA-Technik als Technologie zur Massenproduktion von Proteinen, wie Enzymen, erreicht, resultierend in der erfolgreichen Massenproduktion von zahlreichen Enzymen, physiologisch aktiven Proteinen und dgl. unter Verwendung von rekombinanter DNA-Technologie. Betreffend α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase wurde jedoch bisher das Gen, welches dieses Enzym codiert, nicht isoliert.

[0004] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Massenproduktion von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure durch Isolierung des Gens von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase und der darauffolgenden Verstärkung der Aktivität von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase, codiert durch dieses Gen, zur Verfügung zu stellen.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0005] Die gegenwärtigen Erfinder haben intensive Forschung zur mikrobiologischen Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure betrieben. Als ein Ergebnis waren die vorliegenden Erfinder erfolgreich darin, aus einem Mikroorganismus, welcher α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase enthält, welche α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd in 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure umwandelt, das Gen von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase unter Verwendung von rekombinanter DNA-Technologie zu isolieren und darüber hinaus seine Basensequenz zu bestimmen. Außerdem haben die gegenwärtigen Erfinder auch ein Verfahren zur Bildung eines rekombinanten Vektors des Gens und einer Transformante, welche das Gen enthält, und dann anschließend die Herstellung des Enzyms und 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure gefunden, was zur vorliegenden Erfindung führte.

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt daher α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase mit einer Aminosäuresequenz wie in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 gezeigt, oder einer Aminosäuresequenz, in der in der zuerst genannten Aminosäuresequenz eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, substituiert oder hinzugefügt sind, ein Gen welches das Enzym codiert, ein rekombinanter Vektor, welcher das Gen enthält und eine Transformante, welche das Gen trägt, zur Verfügung.

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zur Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure zur Verfügung, welches die Kultivierung der Transformante in Gegenwart von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd umfaßt.

[0008] Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung des Enzyms zur Verfügung, welches Kultivierung der Transformante und Gewinnung von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase aus der resultierenden Kultur umfaßt.

[0009] Die Verwendung der Transformante gemäß der vorliegenden Erfindung erlaubt die Herstellung von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase in großer Menge, wodurch es möglich wird, die industrielle Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure durchzuführen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0010] Fig. 1 ist ein Diagramm, welches eine Restriktionskarte von Insert-DNA-Fragmenten in Plasmiden zeigt, welche das Gen der α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase, erhalten aus Sphingomonas sp., enthalten, und welches das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenaseaktivität zeigt.

BEVORZUGTE AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

[0011] Obwohl das Isolierungsverfahren des Gens der vorliegenden Erfindung keiner besonderen Limitierung unterliegt, kann zum Beispiel ein Wirt-Vektor-System eines Mikroorganismus verwendet werden. Das Gen kann zum Beispiel unter Verwendung von rekombinanter DNA-Technologie hergestellt werden, wie im folgenden beschrieben wird. Im speziellen wird unter Verwendung eines Mikroorganismus mit der Fähigkeit α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd in 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure umzuwandeln, als DNA-Spender, zunächst genomische DNA aus dem Mikroorganismus extrahiert, und dann mit einer Restriktionsendonuklease in ein DNA-Fragment geschnitten. Auf der anderen Seite werden in einer Vektor-DNA, wie einem Phagen oder einem Plasmid, unter Verwendung einer Restriktionsendonuklease Enden gebildet, zwischen welche das genomische DNA-Fragment eingefügt werden kann. Das genomische DNA-Fragment und die geöffnete Vektor-DNA werden durch eine DNA-Ligase verbunden, wodurch ein rekombinanter Vektor erhalten wird. Der rekombinante Vektor wird in eine Wirtszelle transferiert, und eine Transformante, welche den rekombinanten Zielvektor trägt, wird selektiert. Der rekombinante Zielvektor wird aus der rekombinanten Zelle isoliert, wodurch das Gen gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wird.

[0012] Der DNA-Spender der vorliegenden Erfindung unterliegt keiner besonderen Limitierung, solange es sich um einen Mikroorganismus handelt, welcher die Fähigkeit α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd in 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure umzuwandeln, hat. Beispielhaft sind Sphingomonas-Mikroorganismen, wobei Sphingomonas sp. CR-0300100 und seine Mutante, Sphingomonas sp. CR-0310201 (FERM BP-6748) besonders bevorzugt sind.

[0013] Die Extraktion von genomischer DNA aus dem Mikroorganismus kann bevorzugt durchgeführt werden durch Gewinnen von kultivierten Zellen des Mikroorganismus, Lysieren der Zellen, zum Beispiel mit Protease K, und daran anschließend der Durchführung von Verfahrensschritten wie einer Deproteinierungsbehandlung durch Extraktion mit Phenol, Proteasebehandlung, Ribonukleasebehandlung, Präzipitation genomischer DNA mit einem Alkohol und Zentrifugation – kombiniert wie nötig.

[0014] Das Schneiden der aufgetrennten genomischen DNA in Fragmente kann zum Beispiel durch Verdau der genomischen DNA mit einer Restriktionsendonuklease durchgeführt werden.

[0015] Es ist bevorzugt, einen aus einem Phagen oder Plasmid konstruierten Vektor zu verwenden, welcher in einem Wirtsmikroorganismus autonom replizieren kann, im Hinblick darauf einen rekombinanten Vektor zur Verfügung zu stellen. Bevorzugte Beispiele des Plasmids können pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, Bluescript, pKK223-3, pACYC177, RSF1010 und pKT230 umfassen, welche Escherichia coli als Wirt verwenden. Diese Vektoren werden verwendet, nachdem Enden gebildet wurden, zwischen welchen ein DNA-Fragment inseriert werden kann, zum Beispiel mit einer Restriktionsendonuklease und wobei die Enden optional einer Dephosphorysierung unterworfen werden können.

[0016] Das Zusammenfügen zwischen dem genomischen DNA-Fragment und dem Vektor-DNA-Fragment kann vorzugsweise unter Verwendung einer bekannten DNA-Ligase, zum Beispiel T4 DNA-Ligase oder dgl. durchgeführt werden.

[0017] Als Wirtsmikroorganismus, in welchen der so erhaltene rekombinante Vektor transferiert werden soll, kann jeder Mikroorganismus verwendet werden, soweit er stabile und autonome Replikation des rekombinanten Vektors und stabile Expression der Eigenschaften des fremden Gens erlaubt. Zum Beispiel ist Escherichia coli oder Pseudomonas putida verwendbar.

[0018] Als Verfahren zur Übertragung des rekombinanten Vektors in den Wirtsmikroorganismus kann jede Methode verwendet werden, einschließlich zum Beispiel Konjugation, Elektroporation, die kompetente Zellentechnik, Mikroinjektion und die Partikel-Gun-Technik.

[0019] Selektion der Transformante kann durchgeführt werden unter Verwendung eines ausgewählten Mar-

kers des verwendeten Vektors als Indikator, zum Beispiel, eine Resistenz, welche von der Transformanten durch die Rekombination von DNA erhalten wird. Die Selektion einer Transformante, welche den rekombinanten Zielvektor enthält aus diesen Transformanten kann vorzugsweise zum Beispiel durch Koloniehybridisierung durchgeführt werden, in welcher ein partielles DNA-Fragment des Gens als Sonde verwendet wird. Verwendbare Beispiele eines Labels für diese Sonde können Radioisotope, Digoxigenin, Enzyme und dergleichen umfassen.

[0020] Zur Extraktion des rekombinanten Vektors aus der so selektierten Transformante kann ein Verfahren durchgeführt werden, welches dem Fachmann an sich bekannt ist. Zum Beispiel kann eine alkalische Lyse [Cold Spring Harbor Laroratory Press, Molecular Cloning, Second Edition (1989)) verwendet werden.

[0021] Der extrahierte rekombinante Vektor kann weiter rekombiniert werden, unter Verwendung von rekombinanter DNA-Technologie. Um das Gen der vorliegenden Erfindung aus dem so erhaltenen rekombinanten Vektor auszuschneiden, kann eine Restriktionsendonuklease oder dgl. verwendet werden.

[0022] Die Basensequenz des Gens der vorliegenden Erfindung, welches wie oben beschrieben erhalten wurde, kann zum Beispiel durch Ablesen gemäß der Didesoxy-Methode bestimmt werden. Die Basensequenzen von Genen, welche α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase codieren, sind unter SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:4 gezeigt; die Aminosäuresequenzen oben beschriebenen Enzym, welche von den Basensequenzen abgeleitet sind, sind unter SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:3 gezeigt; und die Basensequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz eines in einem Beispiel isolierten DNA-Fragments, welches nachfolgend beschrieben werden wird, sind unter SEQ ID NO:5 gezeigt.

[0023] SEQ ID NO:1 ist eine partielle Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3. Enzyme gemäß der vorliegenden Erfindung haben eine ähnliche enzymatische Aktivität, unabhängig davon, ob sie die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 oder die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 haben. Es sollte angemerkt werden, daß Enzyme- welche Aminosäuresequenzen haben, die ähnlich zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 sind, abgesehen davon, daß eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, substituiert oder hinzugefügt wurden – und Gene, die die Polypeptide dieser Enzyme codieren insoweit von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind, als diese Polypeptide die Aktivität einer α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase haben.

[0024] Genauso ist SEQ ID NO:2 eine partielle Basensequenz von SEQ ID NO:4. Es sollte auch festgestellt werden, daß Basensequenzen, welche ähnlich zu der unter SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:4 beschriebenen Basensequenz sind, abgesehen davon daß eine oder mehrere Basen deletiert, substituiert oder hinzugefügt wurde, von der vorliegenden Erfindung umfaßt werden.

[0025] Um das Gen der vorliegenden Erfindung zu exprimieren und α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase herzustellen, ist es bloß nötig eine Transformante, welche das Gen der vorliegenden Erfindung trägt, zu kultivieren, zum Beispiel die oben beschriebene Transformante, eine Transformante mit einem rekombinanten Vektor, gebildet durch Einfügen des Gens der vorliegenden Erfindung in einen Expressionsvektor mit einem starken Promotor, eine Transformante mit einem rekombinanten Vektor, gebildet durch Einfügen des Gens der vorliegenden Erfindung in einen Vektor mit einer hohen Anzahl von Kopien in einer Zelle, oder eine Transformante mit einem rekombinanten Vektor, gebildet durch Einfügen des Gens der vorliegenden Erfindung in einen Expressionsvektor mit einem starken Promotor und einer hohen Kopienzahl und daran anschließen die Dehydrogenase aus der Kultur zu gewinnen. In diesem Fall wir die Kultivierung in Abhängigkeit von den Eigenschaften der verwendeten Transformante durchgeführt, zum Beispiel bei pH 5 bis 8 und 20 bis 37°C in einem Kulturmedium, welches eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, Vitamine, etc. enthält.

[0026] Wenn die Transformante gemäß der vorliegenden Anmeldung kultiviert wird, wird α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase mit hoher Ausbeute exprimiert. Demgemäß macht es die Kultivierung der Transformante in Gegenwart von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd möglich 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure effizient zu produzieren. Hier kann α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd als Substrat für das Enzym zu dem Kulturmedium hinzugefügt werden, wenn die Transformante zum Beispiel auch ein Enzym produziert, welches 3,4-Dihydroxybenzoesäure in α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd umwandelt, führt das Hinzufügen von 3,4-Dihydroxybenzoesäure zu dem Kulturmedium und darauffolgende Kultivierung zu der Produktion von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd und dann zu der Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure. Die Bedingungen zur Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure sollten in Abhängigkeit von den Eigenschaften der verwendeten Transformante eingestellt werden.

[0027] Gewinnung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure aus der Kultur wird zum Beispiel durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel durchgeführt.

BEISPIELE

[0028] Die vorliegende Erfindung wird als nächstes spezifischer durch die folgenden Beispiele beschrieben werden. Es sollte jedoch beachtet werden, daß die vorliegende Erfindung in keinster Weise durch die folgenden Beispiele limitiert wird.

REFERENZBEISPIEL 1

(1) Ein Kulturmedium mit der in Tabelle 1 gezeigten Zusammensetzung, welches 0,2 % Syringasäure (syringic acid) enthielt, wurde in 10 ml Aliquots in 21 mm Proberöhrchen gefüllt und es wurden Bodenproben (0,5 g) in die jeweiligen Proberöhrchen gegeben, gefolgt von Kultivierung bei 30°C für 3 Tage.

Tabelle 1

Zusammensetzung des Kulturmediums		Zusammensetzung von sss	
KH_2PO_4	0,85 g	MgO	10,75 g
Na_2HPO_4	4,9 g	$CaCO_3$	2,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,44 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1,12 g
sss (Salzstammlösung)	0,1 ml/l	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,25
		$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,28 g
		H_3BO_3	0,06 g
		koz. HCl	51,3 ml/l

(2) Die Probenröhrchen wurden als nächstes für etwa 5 Minuten still stehengelassen und die etwas trüben Überstände wurden in 0,1 ml Aliquots in frischen Probenröhrchen mit derselben Zusammensetzung subkultiviert, gefolgt von Kultivierung bei 30°C für 3 Tage.
(3) Die obigen Verfahrensschritte wurden 1- bis 2-mal wiederholt. Die letzten Überstände wurden in sterilem destillierten Wasser angemessen verdünnt, wurden auf einem Agarmedium verteilt, welches die Zusammensetzung wie in Tabelle 1 gezeigt hatte und 0,2 % Syringasäure enthielt, und wurden bei 30°C für 3 Tage kultiviert, wodurch Kolonien gebildet wurden.
(4) Die Kolonien wurden mit Zahnstochern auf Agarmedium inokuliert, welches die in Tabelle 1 gezeigte Zusammensetzung hatte und 0,2 % Vanillinsäure enthielt und gewachsene Zellstämme wurden erhalten.
(5) Die auf Vanillinsäure kultivierten Zellstämme wurden wieder auf das Kulturmedium (10 ml), welches die in Tabelle 1 gezeigte Zusammensetzung hatte und 0,2 % Syringasäure enthielt und wurden bei 30°C für 3 Tage kultiviert. Die Kulturen wurden angemessen in sterilisiertem destillierten Wasser verdünnt, auf LB-Agarmedium ausgebreitet und bei 30°C für 1 Tag kultiviert, wodurch Kolonien gebildet wurden.
(6) Die so gebildeten Kolonien wurden auf zwei Arten von Agarmedium, welche die in Tabelle 1 gezeigte Zusammensetzung hatten und 0,2 % Vanillinsäure bzw. 0,2 % Syringasäure enthielten, mit Zahnstochern separat in Abhängigkeit von ihrer Art inokuliert. Gewachsene Zellstämme wurden erhalten.
(7) Ein Zellstamm, welcher in der Lage war auf den beiden Agarmedien, welche Vanillinsäure bzw. Syringasäure enthielten, zu wachsen, wurde erhalten. Der Zellstamm wurde als "CR-0300100" bezeichnet und seine taxonomischen Eigenschaften wurden untersucht. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten.

a. Morphologische Eigenschaften

– Zellgröße und Form	0,5 × 1,1 bis 1,3 µm, Stäbchen
– Sporen keine	keine
– Flagella	polare Flagellation
– Mobilität	+

b. Wachstum auf Agarmedium

– Auf dem Medium gemäß Tabelle 1	glänzende, gelbe, kreisförmige Kolonie

c. Phisiologische Eigenschaften

– Gram-Färbung	–
– Reduktion von Nitratsalzen	–
– Gelatineverflüssigung	+ (schwach)
– O-F-Test	O: +, F: –
– Lebensfähiger Bereich	pH 5,0 bis 7,5, 10°C bis 40°C
– Assimilation von Kohlenstoffquellen	Glucose + Sucrose + Lactose – Glycerin – Stärke – Vanillin + Vanillinsäure + Syringaaldehyd + Syringasäure +
– Cytochromoxidase	+
– Catalase	+

d. Chemotaxonomische Eigenschaften

– GC-Gehalt der DNA (mol%)	68
– Chinon-Typ	Q-10
– Pigment	+ (hydrophobes gelbes Pigment)
– Zellwandlipid	Sphingolipid

3. Andere Eigenschaften

– 3,4-Dihydroxybenzoesäureoxidase	Metaspaltung

[0029] Anhand der oben beschriebenen Eigenschaften wurde der CR-0300100-Stamm als zum Genus Sphingomonas gehörend identifiziert.

REFERENZBEISPIEL 2

(1) Unter Verwendung von 100 ml LB-Medium (Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, Natriumchlorid 5 g, Glucose 1 g/l), wurden Sphingomonas sp. CR-0300100, welcher im Referenzbeispiel 1 erhalten wurde, bei Schütteln und 30°C für 24 Stunden kultiviert. Nachdem Zellen durch Zentrifugation gewonnen wurden, wurden Gesamt-DNAs nach der Marmur-Methode extrahiert (Marmur, J.:J. Mol. Biol. 3, 208–218, 1961) und dann nach einer dem Fachmann an sich bekannten Methode auf gereinigt.
(2) Die in Schritt 1 gewonnenen Gesamt-DNAs von Sphingomonas sp. CR-0300100 wurden mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und SphI komplett verdaut und dann mit dem Vektorplasmid pUC19 gemischt, welches mit dem Restriktionsendonukleasen SalI und SphI komplett verdaut worden war. Die resultierende Mischung wurde mit T4 DNA-Ligase behandelt, so daß ein hybrides Plasmid gebildet wurde.
(3) Das in Schritt (2) erhaltene hybride Plasmid wurde in E. coli HB101 transferiert. Der derartig transformierte Stamm wurde auf LB-Medium verteilt, welches 100 mg/l Ampicillin enthielt, so daß 200 bis 300 Kolonien pro Platte auftreten würden und wurde bei 37°C für 18 Stunden kultiviert.
(4) In dem vorangehenden Schritt gewonnene Kolonien wurden bei einer Inokulierungsdichte von 96 Kolonien pro Platte auf LB-Medium, welches 100 mg/l Ampicillin enthielt, subkultiviert und wurden als Master-

platten verwendet. Durch dieses Vorgehen wurden Kolonien von insgesamt 2000 Stämmen erhalten. Jede dieser Kolonien wurde separat in eine 96-Well-Mikrotiperplatte geimpft, wobei jedes der Wells 0,2 ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin enthielt. Auf einem Mikrotiterplattenschüttler wurde dann die Kultivierung unter Schütteln bei 37°C durchgeführt.
(5) Nach Kultivierung für 18 Stunden wurde zu jedem Well Lysozym hinzugefügt, so daß es eine Endkonzentration von 50 µg/ml erreichte, gefolgt von Inkubation von 37°C für 2 Stunden. Als nächstes wurde eine 20 mM-Lösung von 3,4-Dihydroxybenzoesäure in Aliquots von 2 µl zu den einzelnen Wells hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubation bei 30°C für 5 Minuten.
(6) Nachdem 2 M Natriumhydroxid in 10 µl Aliquots zu den einzelnen Wells hinzugefügt wurde, wurde die Entwicklung von gelber Farbe in einem der 2000 Stämme beobachtet.
(7) Aus dem Stamm, welcher die gelbe Farbe entwickelte wurde ein Plasmid extrahiert, und dessen Spaltungsmuster in bezug auf mehrere Restriktionsendonukleasen wurde untersucht. Dieses Plasmid wurde "pPX150" genannt.

REFERENZBEISPIEL 3

(1) pPX150 wurde mit der Restriktionsendonuklease ApaI geschnitten, wodurch das selbstligierte Plasmid pPX151 hergestellt wurde. Mit diesem Plasmid transformierte E. coli HB101 und mit pPX150 transformierte E. coli HB101 wurden für 18 Stunden in 10 ml-Portionen LB-Medium, welches 100 mg/l Ampicillin enthielt, kultiviert, und Zellen wurden gewonnen. Diese Zellen wurden in 1 ml 50 mM Phosphatpuffer suspendiert und wurden dann durch Ultraschall aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Mischung wurde bei 5000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Ein 20 µl-Aliquot des resultierenden Überstands wurde zu 1 ml Phosphatpuffer, welcher 0,2 mM 3,4-Dihydroxybenzoesäure enthielt, hinzugefügt. Nachdem 0,1 ml 2 M Natriumhydroxid nach einer Inkubation bei 30°C für 5 Minuten hinzugefügt wurde, wurde Bildung einer gelben Farbe auf E. coli HB101 transformiert mit pPX150 beobachtet, jedoch wurde keine Entwicklung einer gelben Farbe auf E. coli HB101 transformiert mit pPX151 beobachtet.
(2) Das Plasmid pUC4K (Pharacia Biotech AB) wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut, mit einem Blunting-Kit (TAKARA SHUZO CO., LTD.) gebluntet, und dann durch Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.
(3) Ein 1,3 kb-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und dann einer dreimaligen Extraktion mit Phenol unterworfen. Die resultierende DNA wurde durch Ethanol-Präzipitation gereinigt.
(4) pPX151 wurde mit der Restriktionsendonuklease ApaI geschnitten und wurde dann mit dem Blunting-Kit (TAKARA SHUZO CO., LTD.) gebluntet. Die gebluntete Mischung und die oben in Schritt 3 erhaltene DNA wurden zusammengemischt und dann einer Ligierungsreaktion mit einem Ligierungs-Kit (TAKARA SHUZO CO., LTD.) unterworfen. Die transformierte DNA wurde in E. coli HB101 transferiert. Als transformierter E. coli HB101 wurde ein Stamm, welcher resistent gegenüber Kanamycin und Ampicillin war, selektiert, und pPX152 wurde als von diesem Stamm getragenes Plasmid erhalten.

REFERENZBEISPIEL 4

(1) Das im vorhergehenden Experiment gewonnene Plasmid pPX152 wurde mit der Restriktionsendonuklease XbaI verdaut und dann durch Elektrophorese auf 1%iger Agarose aufgetrennt, und ein 2,3 kb-Fragment wurde ausgeschnitten. Danach wurde DNA durch die Gefrier- und Auftaumethode extrahiert, komplett mit Phenol extrahiert und durch Präzipitation in Ethanol gereinigt.
(2) Sphingomonas sp. CR-0300100 wurde bei 28°C für 23 Stunden in 500 ml LB Flüssigmedium (enthaltend 25 mg/l Nalidixinsäure (nalidixic acid)) kultiviert, und die Kultur wurde dann für 15 Minuten auf Eis gekühlt.
(3) Zellen wurden bei 4°C und 10 000 Upm für 10 Minuten gewonnen. Anschließend an sanftes Waschen mit 500 ml destilliertem Wasser bei 0°C wurden die Zellen durch Zentrifugation wiedergewonnen. Nachdem die Zellen sanft mit 250 ml destilliertem Wasser bei 0°C gewaschen worden waren, wurden die Zellen durch Zentrifugation gewonnen. Des weiteren wurden die Zellen mit 125 ml destilliertem Wasser bei 0°C sanft gewaschen und durch Zentrifugation gewonnen.
(4) Die Zellen wurden in destilliertem Wasser, welches 10 % Glycerin enthielt, suspendiert und bei 0°C gehalten.
(5) Destilliertes Wasser (4 µl), welches etwa 0,05 µg von der in Schritt (1) oben erhaltenen DNA enthielt, wurde in 0,2 cm-Küvette gegeben, gefolgt von dem Hinzufügen von 40 µl der in Schritt (4) oben erhaltenen kompetenten Zellen. Die resultierende Mischung wurde der Elektroporation bei den Bedingungen 25 µ-F, 2500 V, 12 ms unterworfen.
(6) Die wie oben beschrieben behandelten Zellen wurden komplett in 10 ml LB Flüssigmedium inokuliert, gefolgt von Kultivierung bei 30°C für 6 Stunden. Nach der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation gewonnen, auf einer 25 mg/l Kanamycin enthaltenden LB-Platte verteilt und dann bei 30°C für 48 Stun-

den kultiviert.

(7) Unter den oben Bedingungen wurde ein sehr stark Kanamycin-resistenter Stamm erhalten. Dieser Stamm wurde "Sphingomonas sp. CR-0310201" genannt.

(8) Sphingomonas sp. CR-0310201 und CR-0300100 wurden in 10 ml-Portionen LB-Medium für 24 Stunden kultiviert und Zellen wurden gewonnen. Diese Zellen wurden in 1 ml 50 mM-Phosphatpuffer suspendiert und wurden dann durch Ultraschall aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Mischung wurde bei 5000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Ein 100 µl-Aliquot des resultierenden Überstands wurde zu 1 ml Phosphatpuffer, welcher 0,2 mM 3,4-Dihydroxybenzoesäure enthielt, hinzugefügt. Wenn 0,1 ml von 2 M Natriumhydroxid nach einer Inkubation bei 30°C für 5 Minuten hinzugefügt wurde, wurde die Entwicklung einer gelben Farbe auf CR-0300100 beobachtet, aber auf CR-031201 wurde die Entwicklung einer gelben Farbe nicht beobachtet. CR-0310201 zeigte exakt die gleichen taxonomischen Eigenschaften wie CR-0300100, außer daß CR-0310201 nicht die oben genannten Eigenschaften, Resistenz gegen Kanamycin und Assimilierbarkeit von Vanillinsäure, hatte. Dieser Stamm wurde als FERM BP-6748 gemäß dem Budapester Vertrag beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (Adresse: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japan) hinterlegt (Datum der Originalhinterlegung: 4. Februar 1998).

BEISPIEL 1: (Analyse der Aminosäuresequenz von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase)

[0030] Sphingomonas sp. CR-0310201 wurde bei 30°C für 24 Stunden unter aeroben Bedingungen auf LB-Flüssigmedium kultiviert, und Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen. In bezug auf den so gewonnenen Zellstamm wurde eine Zellaufschlußbehandlung durch Ultraschall bei 150 W für 10 Minuten durchgeführt, gefolgt von Zentrifugation bei 100 000 g für 30 Minuten.

[0031] Der Überstand wurde einer Ammoniumsulfat-Fraktionierung unterworfen. Fraktionen, welche Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 30 bis 70 Gew.% entsprachen, wurden gesammelt, und die Enzyme wurden durch schwache anionische Austauschchromatographie [Perseptiv Biosystems, Inc. PI (Polyethylimin)-Säule], stark anionische Austauschchromatographie [Perseptive Biosystems, Inc. HQ (quaternäres Polyethylimin)], hydrophobische Chromatographie (Pharmacia AB, "Phenyl Sepharose CL-4B") und Adsorptionschromatographie (Hydroxyapatit), gereinigt. Fraktionen mit der Aktivität von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase wurden gesammelt.

[0032] Das gereinigte Produkt, welches über die Säulen auf gereinigt worden war, wurde als einzelne Bande durch SDS-PAGE nachgewiesen, und es wurde somit bestätigt, daß es sich um ein einzelnes Enzym handelte.

[0033] Partielle Aminosäuresequenzen der so isolierten α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase wurden durch einen Aminosäuresequenzer (hergestellt von Applied Biosystems, Inc.) analysiert. Die so bestimmten partiellen Aminosäuresequenzen des Enzyms sind unter SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 gezeigt.

[0034] Im übrigen wurde die Aktivität von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase bestimmt, wie im folgenden beschrieben wird.

(1) Auf dem in Tabelle 1 präsentierten Medium, enthaltend 2 g/l Parahydroxybenzoesäure, wurde Pseudomonas testosteroni JMC5832 im Dunklen unter Schütteln bei 30°C für 24 Stunden kultiviert.

(2) Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen, in einem Natriumphosphatpuffer bei pH 7,5 suspendiert, einer Zelldisruptionsbehandlung durch Ultraschall bei 150 W für 10 Minuten unterworfen, und dann bei 10 000 g für 30 Minuten zentrifugiert.

(3) Zu dem wie oben beschrieben erhaltenen Überstand wurde eine gleiche Menge von Ethanol hinzugefügt, gefolgt von Zentrifugation bei 10 000 g für 10 Minuten. Es wurde zu dem so erhaltenen Überstand Ethanol hinzugefügt, so daß die Ethanol-Konzentration 70 % (V/V) erreichte, gefolgt von weiterer Zentrifugation bei 10 000 g für 10 Minuten.

(4) Ein Präzipitat, welches in dem vorherigen Schritt erhalten worden war, wurde in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5), welcher 10 % Ethanol enthielt, aufgelöst. Unter Verwendung eines 200 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,5), enthaltend 10 % Ethanol, wurde eine Metaspaltungs-Enzymfraktion von 3,4-Dihydroxybenzoesäure durch eine DEAE-Cellulosesäule erhalten.

(5) 50 µl der Metaspaltungs-Enzymlösung von 3,4-Dihydroxybenzoesäure, welche wie oben beschrieben erhalten worden war, wurden zu 0,9 ml eines 50 mM Tris-HCl-Puffers (pH 8,1), welcher 0,2 mM 3,4-Dihydroxybenzoesäure enthielt, hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde bei 37°C inkubiert, während die Absorption bei 410 nm durch ein Spektrophotometer (hergestellt von SHIMADZU CORP.; "UV-2100") ge-

messen wurde. Sobald die Absorption konstant wurde, wurden 50 µl einer α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenaselösung (1 mg in bezug auf Proteingewicht) hinzugefügt. Nach Bestätigung, daß die Absorption durch diese Prozedur unverändert blieb, wurden 20 µl NADP (100 mM-Lösung) hinzugefügt, und eine Abnahme der Absorption bei 410 nm wurde für 100 s gemessen. Aus der NADP-abhängigen Abnahme der Menge von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd wurde die Aktivität von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase bestimmt.

BEISPIEL 2: Klonierung des Gens codierend für α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase

(1) Herstellung einer Genbibliothek

[0035] Sphingomonas sp. CR-0310201 wurde in LB-Medium inokuliert (Trypton: 10 g/l, Hefeextrakt: 5 g/l, NaCl: 5 g/l, pH 7,0), welches 5 g/l Glucose enthielt und dann über Nacht bei 28°C kultiviert, wodurch eine Vorkultur hergestellt wurde. Die Vorkultur wurde in ein ähnliches Kulturmedium wie das oben beschriebene inokuliert, welches in einem Kolben neu zur verwendet gestellt wurde, und wurde erneut über Nacht bei 28°C kultiviert. Zellen wurden durch Zentrifugation der Kultur gewonnen.

[0036] Nachdem die Zellen in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert worden waren, wurde die resultierende Suspension bei 37°C für eine Stunde mit einer Endkonzentration von 0,5 % SDS und einer Endkonzentration von 100 µg/ml Protease K behandelt. Mit der so behandelten Suspension wurde 1/6 Volumen von 5 M Natriumchlorid gemischt. Dann wurde 1/10 Volumen von 10%igem CTAB (Hexydecyl-trimethylammoniumbromid) und 0,7 M Natriumchlorid hinzugefügt, und die resultierende Mischung wurde bei 65°C für 10 Minuten stehengelassen. Die Mischung wurde mit einer gleichen Menge von Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, und die resultierende wäßrige Schicht wurde mit einer gleichen Menge von Phenol-Chloroform extrahiert. Genomische DNA, welche in der wäßrigen Schicht enthalten war, wurde durch Ethanol-Präzipitation erhalten, und nach der Trocknung bei verringertem Druck wurde TE hinzugefügt, um dieselbe aufzulösen.

[0037] Die genomische DNA wurde partiell mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (Produkt von TAKARA SHUZO CO., LTD.) verdaut, gefolgt von Elektrophorese auf 1%iger Agarose (Produkt von WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., "Agarose 1600"). TAE [Cold Spring Harbor Laboratory Press, Molecular Cloning, zweite Auflage (1989)] wurde als Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel 15 Minuten in 1 µg/ml Ethidiumbromid eingetaucht und mit Wasser gewaschen und dann wurde die Fluoreszenz von DNA-Fragmenten durch UV-Beleuchtung nachgewiesen. Als Größenmarker wurden EcoRI- und HindIII-Verdauungsprodukte (Produkte von TAKARA SHUZO CO., LTD.) von λ-Phagen-DNA zur selben Zeit der Elektrophorese unterworfen, und aus der zurückgelegten Strecke der DNA-Fragmente wurden die Molekulargewichte der Verdauprodukte der genomischen DNA bestimmt.

[0038] Agarosegel, welches partielle EcoRI-Verdauprodukte der genomischen DNA enthielt, wobei jene partiellen Verdauprodukte 1 bis 3 kbp waren, wurde ausgeschnitten, und Reinigung der DNA-Fragmente wurde durch das Ultrazentrifugationsverfahren unter Verwendung von Cäsiumchlorid durchgeführt.

[0039] Das Vektorplasmid pUC19 wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI komplett verdaut (Produkt von TAKARA SHUZO CO., LTD.). Alkalische Phosphatase (bakterielle alkalische Phosphatase) (Produkt von TAKATA SHUZO CO., LTD.) wurde zu der Reaktionsmischung hinzugefügt und die Enddephosphorylierung des mit der Restriktionsendonuklease verdauten Vektorplasmids wurde durchgeführt.

[0040] Zu der Reaktionsmischung wurden 1/10 Volumen 3M Natriumphosphat (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde für 2 Stunden bei –80°C gekühlt und dann bei 9000 g für 10 Minuten zentrifugiert, wodurch Pellets von Vektor-DNA erhalten wurden. 70%iges Ethanol wurde zweimal in einer Menge hinzugefügt, welche benötigt wurde, um die Wand eines Zentrifugationsröhrchens zu spülen. Nachdem die Spülungen einfach entfernt worden waren, wurde die Vektor-DNA bei verringertem Druck getrocknet. Die getrocknete Vektor-DNA wurde in TE aufgelöst.

[0041] Die oben beschriebenen 1 bis 3 kbp-DNA-Fragmente von Sphingomonas sp. CR-0310201 und die Vektor-DNA wurden unter Verwendung von T4-Ligase (Produkt von TAKARA SHUZO CO., LTD.) ligiert.

[0042] Kompetente E. coli HB101-Zellen wurden unter Verwendung von 100 mM Calciumchlorid hergestellt, und wurden dann mit der T4-Ligasereaktionsmischung transformiert. Die E. coli-Zellen wurden auf LB-Plattenmedium (welches durch Hinzufügen von 15 g/l Agar zu LB hergestellt worden war), welches mit Ampicillin mit

einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt worden war, verteilt, gefolgt von Übernachtkultur bei 37°C. Gebildete Kolonien wurden als Genbibliothek von Sphingomonas sp. CR-0310201, erhalten unter Verwendung von E. coli HB101 als Wirt, gewonnen.

(2) Herstellung einer Gen-Sonde, codierend α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase

[0043] Sphingomonas sp. CR-0310201 wurde in ein Kulturmedium (Polypepton: 5 g/l, Hefeextrakt: 0,5 g/l, Fleischextrakt: 5 g/l, Natriumchlorid: 2 g/l, pH 7,0) in einem Teströhrchen gegeben, und dann über Nacht bei 28°C kultiviert, wodurch eine Vorkultur hergestellt wurde. Die Vorkultur wurde auf ein Kulturmedium, ähnlich dem oben beschriebenen, inokuliert, welches in einem Kolben neu zur Verfügung gestellt worden war und wurde wieder über Nacht bei 28°C kultiviert. Zellen wurden durch Zentrifugation der Kultur gewonnen.

[0044] Nach Suspendieren der Zellen in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurde die resultierende Suspension bei 37°C für 1 Stunde mit einer Endkonzentration von 0,5 % SDS und einer Endkonzentration von 100 µg/ml Protease K behandelt. Mit der so behandelten Suspension wurde 1/6 Volumen 5 M Natriumchlorid gemischt. Dann wurde 1/10 Volumen 10%iges CTAB (Hexadexyl-trimethylammoniumbromid) und 0,7 M Natriumchlorid hinzugefügt, und die resultierende Mischung wurde bei 65°C für 10 Minuten stehengelassen. Die Mischung wurde mit einer gleichen Menge von Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, und die resultierende wäßrige Phase wurde mit einer gleichen Menge von Phenol-Chloroform extrahiert. Genomische DNA, welche in der Wasserphase enthalten war, wurde durch Ethhanolpräzipitation erhalten, und nach Trocknen unter reduziertem Druck wurde TE hinzugefügt, um dieselbe aufzulösen.

[0045] Unter Verwendung partieller Aminosäuresequenzen wie in SEQ ID NO:6 bzw. SEQ ID NO:7 gezeigt, des Gens, welches für α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase codiert, wurden partielle Basensequenzen des Gens der α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase invers translatiert, wobei besagtes Gen diese Aminosäuresequenzen codierte. Im Hinblick auf die partielle Amplifizierung des Gens durch PCR wurden synthetische Nukleotide mit den Basensequenzen wie in SEQ ID NO:8 bzw. SEQ ID NO:9 gezeigt, durch chemische Synthese hergestellt, und wurden als gepaarte PCR-Primer erhalten. Unter Verwendung von genomischer DNA von Sphingomonas sp. CR-0310201 als DNA-Template wurden unter Verwendung dieser Primer partielle DNA-Fragmente des Gens von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase durch PCR amplifiziert.

[0046] Im übrigen wurde diese PCR wie nachfolgen beschrieben durchgeführt. Zunächst wurde eine Reaktionsmischung, enthaltend 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM Natriumchlorid, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,001 % (G/V) Gelatine, 2 µM gemischte dNTP-Lösung, 40 ng/µl der genomischen DNA und 1 µM der PCR-Primer hergestellt. Nach Hitzebehandlung der Reaktionsmischung bei 92°C für 5 Minuten wurde hitzeresistente DNA-Polymerase (Produkt von TAKARA SHUZO CO., LTD., "TaKaRa Taq") hinzugefügt, so daß ihre Konzentration 0,05 U/µl erreichte, und die resultierende Mischung wurde bei 40°C für 6 Minuten belassen. Nachdem eine Kettenreaktion, welche aus einer thermischen Denaturierungsreaktion bei 94°C für 30 Sekunden, einer Annealing-Reaktion bei 40°C für 2 Minuten, und einer Verlängerungsreaktion bei 72°C für 30 Sekunden bestand, 40-mal wiederholt worden war, wurde die Reaktion bei 72°C für 5 Minuten durchgeführt.

[0047] Das Plasmid pPCCH1, worin das etwa 600 bp-amplifizierte DNA-Fragment mit dem Vektorplasmid pUC19 ligiert war, wurde hergestellt. Unter Verwendung von pPCCH1 als DNA-Vorlage, wurden partielle DNA-Fragmente des Gens von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase durch PCR amplifiziert, unter Verwendung derselben PCR-Primer wie oben beschrieben. In der zweiten PCR wurde eine Kettenreaktion, welche aus einer thermischen Denaturierungsreaktion bei 94°C für 30 Sekunden, einer Annealing-Reaktion bei 40°C für 2 Minuten, und einer Verlängerungsreaktion bei 72°C für 30 Sekunden, 40-mal wiederholt, und die Reaktion wurde dann bei 72°C für 5 Minuten durchgeführt. Das so erhaltene Amplifizierungsprodukt wurde der Elektrophorese unterworfen, und amplifizierte DNA, deren Molekulargewicht sich infolge von Einfügung von Digoxigenin-markierter Nukleinsäure erhöht hatte, wurde aufgetrennt, ausgeschnitten und als eine α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase-Gensonde gewonnen.

(3) Bereitstellung eines Plasmids, enthaltend das Gen von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase

[0048] Etwa 2000 Stämme von E. coli HB101, welche die Bibliothek von Sphingomonas sp. CR-0310201 bildeten, wobei besagte Bibliothek oben in Schritt (1) erhalten worden war, wurden jeder separat mit Zahnstochern in Kulturmedium inokuliert, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, mit einer Inokulierungsgröße von etwa 200 Zellen pro 9 cm Petrischale. Nach statischer Inkubation bei 37°C für 6 Stunden wurden Kolonien auf Ny-

lonmembranen repliziert, und Kolonien welche mit der oben in Schritt (2) erhaltenen Sonde hybridisieren konnten wurden unter Verwendung eines DIG-Detektions-Kit (Produkt von Boehringer Mannheim Corp.) selektiert. Die selektierten E. coli-Stämme trugen das Plasmid pCHMS01.

(4) Messung von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenaseaktivität der Transformanten

[0049] E. coli-Stämme – welche das Plasmid pCHMS01 bzw. aus pCHMS01 unter Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen hergestellte Plasmide enthielten – wurden bezüglich α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenaseaktivität gemessen (**Fig. 1**). Als Ergebnis wurde festgestellt, daß das Gen von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase auf pCHMS01, pCHMS02 und pCHMS03 effizient exprimiert wurde.

[0050] Die Messung der α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenaseaktivität, welche jede dieser oben beschriebenen Transformanten besaß, wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. In 50 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit Ampicillin und IPTG mit Endkonzentrationen von 100 μg/ml bzw. 1 mM, wurde E. coli JM109, welches pCHMS01, pCHMS02, pCHMS03 oder pCHMS04 enthielt, unter Schütteln für 24 Stunden in 100 ml LB-Medium, enthaltend 100 μg/ml Ampicillin, kultiviert. Nach Gewinnen der Zellen durch Zentrifugation wurden die Zellen zweimal mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) gewaschen und wurden dann in 5 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) suspendiert. Zellaufschluß durch Ultraschall wurde bei 150 W für 10 Minuten durchgeführt, wodurch ein zellfreier Extrakt erhalten wurde. Unter Verwendung diese zellfreier Extrakts als Enzymlösung wurde die Messung von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenaseaktivität wie in Beispiel 1 durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde durch HPLC ("BONDASPHEARE C18 Säule", mobile Phase: 2 % Essigsäure, 20 % Methanol, 78 % destilliertes Wasser) analysiert, und Bildung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure wurde bestätigt.

(5) Analyse der Basensequenz des Gens von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase

[0051] Als nächstes wurde die Analyse der Basensequenz des eingefügten DNA-Fragments von etwa 1,4 kbp unter Verwendung des rekombinanten Plasmid pCHMS02 durchgeführt. In dieser Analyse der Basensequenz wurde eine Sequenzierungsreaktion nach der M13 Didesoxy-Methode [Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463–5467 (1977)] unter Verwendung eines T7-Sequenzierkits (Produkt von Pharmacia Biotech AB) durchgeführt, und ein automatisierter Laser-Fluoreszenzsequenzer (hergestellt von Pharmacia Biotech AB) wurde verwendet. Als Ergebnis der Analyse der Basensequenz wurde nur ein offener Leserahmen von 945 bp auf dem DNA-Fragment gefunden.

[0052] Die Basensequenz des Gens, codierend α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd-Dehydrogenase, wurde analysiert, wobei besagtes Gens wie oben beschrieben erhalten worden war. Die Basensequenz und die codierte Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO:5 gezeigt.

INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

[0053] Die vorliegende Erfindung ist besonders nützlich für die Herstellung, insbesondere die Massenherstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure, welche als Rohstoff für Polymere verwendet wird.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Cosmo Research Institute (weitere 6 Anmelder)

<120> Neue Gene und dieselben enthaltende transformierte Zellen

<130> FP-COS-003

<150> JP P1988-23200
<151> 1988-07-17

<160> 9

<210> 1
<211> 280
<212< PRT
<213> Sphingomonas sp. CR-0310201

<400> 1

Met Arg Ile Ala Leu Ala Gly Ala Gly Ala Phe Gly Glu Lys His Leu
5 10 15
Asp Gly Leu Lys Asn Ile Asp Gly Val Glu Ile Val Ser Ile Ile Ser
20 25 30
Arg Lys Ala Glu Gln Ala Ala Glu Val Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Lys
35 40 45
His Ser Gly Thr Asp Leu Ser Glu Ala Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp

50 55 60

Ala Val Ile Leu Cys Thr Pro Thr Gln Met His Ala Glu Gln Ala Ile

65 70 75 80

Ala Cys Met Asn Ala Gly Lys His Val Gln Val Glu Ile Pro Leu Ala

85 90 95

Asp Ser Trp Ala Asp Ala Glu Ala Val Met Lys Lys Ser Gln Glu Thr

100 105 110

Gly Leu Val Cys Met Val Gly His Thr Arg Arg Phe Asn Pro Ser His

115 120 125

Gln Tyr Ile His Asn Lys Ile Val Ala Gly Glu Leu Ala Ile Gln Gln

130 135 140

Met Asp Val Gln Thr Tyr Phe Phe Arg Arg Lys Asn Met Asn Ala Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

His Thr Val Asp Leu Phe Ala Tyr Gln Ala Gly Lys Ile Val Gln Ala

180 185 190

Asn Ala Val Gln Gly Pro Ile His Pro Glu Leu Gly Ile Ala Met Asp

195 200 205

Met Ser Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr Gly Ala Ile Cys Thr Leu Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Cys Asp Asn Gly Thr Trp Ile Ala Arg Tyr Asp Asp Leu Val Thr Gly

245 250 255

Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val Asp Val Ser Met Asn Gly

260 265 270

Ile Glu Leu Gln Asp Arg Glu Phe
275 280

<210> 2
<211> 840
<212> DNA
<213> Sphingomonas sp. CR-0310201

<400> 2

atgagaatag ctctcgcagg cgccggcgca ttcggcgaaa aacatctcga cggtctcaag 60
aatatcgacg gcgtcgagat cgtctcgatc atcagccgca aggccgagca ggccgcggaa 120
gtcgccgcga aatatggcgc gaagcacagc ggcaccgatc tttccgaagc gcttgcccgt 180
gacgatgtcg acgcggtgat cctctgcacc cccacccaga tgcatgccga gcaggccatt 240
gcctgcatga atgccggcaa gcatgtccag gtggaaatcc cgctggcgga cagctgggcc 300
gatgccgaag cggtgatgaa gaagagccag gaaaccggcc tcgtctgcat ggtcggccac 360
acccgccgct tcaacccgag ccaccagtat atccacaaca agatcgtggc cggcgagctc 420
gccatccagc agatggacgt gcagacctat ttcttccgcc gcaagaacat gaacgccaag 480
ggcgagccgc ggtcctggac ggaccatctg ctctggcacc atgccgcgca cacggtggac 540
ctgttcgctt atcaggccgg caagatcgtg caggccaatg ccgtgcaggg gccgatccat 600
cccgagctcg gcatcgccat ggacatgtcg atccagctca agagcgagac gggcgcgatc 660
tgcaccctgt ccctctcgtt caacaatgac gggccgctcg gcaccttctt ccgctacatc 720
tgcgacaacg gcacctggat cgcgcgctac gacgatctgg tgaccggcaa ggaagaaccc 780
gtggacgtca gcaaggtcga cgtgtcgatg aacgggatcg agctgcagga tcgggaattc 840

<210> 3
<211> 315
<212> PRT
<213> Sphingomonas sp. CR-0310201

<400> 3

Met Arg Ile Ala Leu Ala Gly Ala Gly Ala Phe Gly Glu Lys His Leu
5 10 15
Asp Gly Leu Lys Asn Ile Asp Gly Val Glu Ile Val Ser Ile Ile Ser
20 25 30
Arg Lys Ala Glu Gln Ala Ala Glu Val Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Lys
35 40 45
His Ser Gly Thr Asp Leu Ser Glu Ala Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp
50 55 60
Ala Val Ile Leu Cys Thr Pro Thr Gln Met His Ala Glu Gln Ala Ile
65 70 75 80
Ala Cys Met Asn Ala Gly Lys His Val Gln Val Glu Ile Pro Leu Ala
85 90 95
Asp Ser Trp Ala Asp Ala Glu Ala Val Met Lys Lys Ser Gln Glu Thr
100 105 110
Gly Leu Val Cys Met Val Gly His Thr Arg Arg Phe Asn Pro Ser His
115 120 125
Gln Tyr Ile His Asn Lys Ile Val Ala Gly Glu Leu Ala Ile Gln Gln
130 135 140
Met Asp Val Gln Thr Tyr Phe Phe Arg Arg Lys Asn Met Asn Ala Lys
145 150 155 160
Gly Glu Pro Arg Ser Trp Thr Asp His Leu Leu Trp His His Ala Ala
165 170 175
His Thr Val Asp Leu Phe Ala Tyr Gln Ala Gly Lys Ile Val Gln Ala
180 185 190

Asn Ala Val Gln Gly Pro Ile His Pro Glu Leu Gly Ile Ala Met Asp
195 200 205

Met Ser Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr Gly Ala Ile Cys Thr Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Phe Asn Asn Asp Gly Pro Leu Gly Thr Phe Phe Arg Tyr Ile
225 230 235 240

Cys Asp Asn Gly Thr Trp Ile Ala Arg Tyr Asp Asp Leu Val Thr Gly
245 250 255

Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val Asp Val Ser Met Asn Gly
260 265 270

Ile Glu Leu Gln Asp Arg Glu Phe Ile Ala Ala Ile Arg Glu Gly Arg
275 280 285

Glu Pro Asn Ser Ser Val Ala Arg Val Leu Asp Cys Tyr Arg Val Leu
290 295 300

Gly Glu Leu Glu Val Gln Leu Glu Lys Gln Gly
305 310 315

<210> 4
<211> 945
<212> DNA
<213> Sphingomonas sp. CR-0310201
<400> 4

atgagaatag ctctcgcagg cgccggcgca ttcggcgaaa aacatctcga cggtctcaag 60

aatatcgacg gcgtcgagat cgtctcgatc atcagccgca aggccgagca ggccgcggaa 120

gtcgccgcga aatatggcgc gaagcacagc ggcaccgatc tttccgaagc gcttgcccgt 180

gacgatgtcg acgcggtgat cctctgcacc cccacccaga tgcatgccga gcaggccatt 240

gcctgcatga atgccggcaa gcatgtccag gtggaaatcc cgctggcgga cagctgggcc 300

gatgccgaag cggtgatgaa gaagagccag gaaaccggcc tcgtctgcat ggtcggccac 360

acccgccgct tcaacccgag ccaccagtat atccacaaca agatcgtggc cggcgagctc 420

gccatccagc agatggacgt gcagacctat ttcttccgcc gcaagaacat gaacgccaag 480

ggcgagccgc ggtcctggac ggaccatctg ctctggcacc atgccgcgca cacggtggac 540

ctgttcgctt atcaggccgg caagatcgtg caggccaatg ccgtgcaggg gccgatccat 600

cccgagctcg gcatcgccat ggacatgtcg atccagctca agagcgagac gggcgcgatc 660

tgcaccctgt ccctctcgtt caacaatgac gggccgctcg gcaccttctt ccgctacatc 720

tgcgacaacg gcacctggat cgcgcgctac gacgatctgg tgaccggcaa ggaagaaccc 780

gtggacgtca gcaaggtcga cgtgtcgatg aacgggatcg agctgcagga tcgggaattc 840

atcgcggcga tccgcgaagg tcgcgagccc aattcgtcgg tggcgagagt gctcgattgc 900

tatcgggtgc tgggcgaact cgaggtccag ctcgaaaagc agggc 945

<210> 5

<211> 1174

<212> DNA

<213> Sphingomonas sp. CR-0310201

<400> 5

ctcgagggga gagggttggg agaggggtcg ccacgctgcg gcgtgtcagc ccgctcctct 60

cctccccgcc ccccttcccg gccctctccc tcgcaggtga gagggcgctc atgtgaaagg 120

actgcccc atg aga ata gct ctc gca ggc gcc ggc gca ttc ggc gaa aaa 170

Met Arg Ile Ala Leu Ala Gly Ala Gly Ala Phe Gly Glu Lys

1 5 10

cat ctc gac ggt ctc aag aat atc gac ggc gtc gag atc gtc tcg atc 218

His Leu Asp Gly Leu Lys Asn Ile Asp Gly Val Glu Ile Val Ser Ile

15 20 25 30

atc agc cgc aag gcc gag cag gcc gcg gaa gtc gcc gcg aaa tat ggc 266
Ile Ser Arg Lys Ala Glu Gln Ala Ala Glu Val Ala Ala Lys Tyr Gly
35 40 45

gcg aag cac agc ggc acc gat ctt tcc gaa gcg ctt gcc cgt gac gat 314
Ala Lys His Ser Gly Thr Asp Leu Ser Glu Ala Leu Ala Arg Asp Asp
50 55 60

gtc gac gcg gtg atc ctc tgc acc ccc acc cag atg cat gcc gag cag 362
Val Asp Ala Val Ile Leu Cys Thr Pro Thr Gln Met His Ala Glu Gln
65 70 75

gcc att gcc tgc atg aat gcc ggc aag cat gtc cag gtg gaa atc ccg 410
Ala Ile Ala Cys Met Asn Ala Gly Lys His Val Gln Val Glu Ile Pro
80 85 90

ctg gcg gac agc tgg gcc gat gcc gaa gcg gtg atg aag aag agc cag 458
Leu Ala Asp Ser Trp Ala Asp Ala Glu Ala Val Met Lys Lys Ser Gln
95 100 105 110

gaa acc ggc ctc gtc tgc atg gtc ggc cac acc cgc cgc ttc aac ccg 506
Glu Thr Gly Leu Val Cys Met Val Gly His Thr Arg Arg Phe Asn Pro
115 120 125

agc cac cag tat atc cac aac aag atc gtg gcc ggc gag ctc gcc atc 554
Ser His Gln Tyr Ile His Asn Lys Ile Val Ala Gly Glu Leu Ala Ile
130 135 140

cag cag atg gac gtg cag acc tat ttc ttc cgc cgc aag aac atg aac 602
Gln Gln Met Asp Val Gln Thr Tyr Phe Phe Arg Arg Lys Asn Met Asn
145 150 155

gcc aag ggc gag ccg cgg tcc tgg acg gac cat ctg ctc tgg cac cat 650
Ala Lys Gly Glu Pro Arg Ser Trp Thr Asp His Leu Leu Trp His His
160 165 170

```
gcc gcg cac acg gtg gac ctg ttc gct tat cag gcc ggc aag atc gtg   698
Ala Ala His Thr Val Asp Leu Phe Ala Tyr Gln Ala Gly Lys Ile Val
175                 180                 185                 190

cag gcc aat gcc gtg cag ggg ccg atc cat ccc gag ctc ggc atc gcc   746
Gln Ala Asn Ala Val Gln Gly Pro Ile His Pro Glu Leu Gly Ile Ala
                195                 200                 205

atg gac atg tcg atc cag ctc aag agc gag acg ggc gcg atc tgc acc   794
Met Asp Met Ser Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr Gly Ala Ile Cys Thr
            210                 215                 220

ctg tcc ctc tcg ttc aac aat gac ggg ccg ctc ggc acc ttc ttc cgc   842
Leu Ser Leu Ser Phe Asn Asn Asp Gly Pro Leu Gly Thr Phe Phe Arg
        225                 230                 235

tac atc tgc gac aac ggc acc tgg atc gcg cgc tac gac gat ctg gtg   890
Tyr Ile Cys Asp Asn Gly Thr Trp Ile Ala Arg Tyr Asp Asp Leu Val
    240                 245                 250

acc ggc aag gaa gaa ccc gtg gac gtc agc aag gtc gac gtg tcg atg   938
Thr Gly Lys Glu Glu Pro Val Asp Val Ser Lys Val Asp Val Ser Met
255                 260                 265                 270

aac ggg atc gag ctg cag gat cgg gaa ttc atc gcg gcg atc cgc gaa   986
Asn Gly Ile Glu Leu Gln Asp Arg Glu Phe Ile Ala Ala Ile Arg Glu
                275                 280                 285

ggt cgc gag ccc aat tcg tcg gtg gcg aga gtg ctc gat tgc tat cgg   1034
Gly Arg Glu Pro Asn Ser Ser Val Ala Arg Val Leu Asp Cys Tyr Arg
            290                 295                 300

gtg ctg ggc gaa ctc gag gtc cag ctc gaa aag cag ggc tgaaaacctg   1083
Val Leu Gly Glu Leu Glu Val Gln Leu Glu Lys Gln Gly
        305                 310                 315
```

caccggaatg aaacggaagc cttgccggag caatctggca aggctttttt cttggcggca 1143

ggcacgccgt cattgcatca tggcggtgga a 1174

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Sphingomonas sp. CR-0310201

<400> 6

Asp Asp Val Asp Ala Val Ile Leu Cys
1 5

<210> 7
<211> 12
<212> DNA
<213> Sphingomonas sp. CR-0310201

<400> 7

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

<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche SEQ ID NO:

<400> 8

acgcggtgat cctctgc 17

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 9

cttgctgacg tccacgg 17

Patentansprüche

1. α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd Dehydrogenase mit einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NO:1 oder 3 dargestellt wird, oder einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NO:1 oder 3 mit einer Deletion, Substitution oder Addition von einer oder mehreren Aminosäuren dargestellt wird, und die α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd Dehydrogenase-Aktivität besitzt.

2. Gen kodierend ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz hat, die durch SEQ ID NO:1 oder 3 dargestellt wird, oder eine Aminosäuresequenz mit einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID NO:1 oder 3 mit einer Deletion, Substitution oder Addition von einer oder mehreren Aminosäuren dargestellt wird, und die α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd Dehydrogenase-Aktivität besitzt.

3. Gen gemäß Anspruch 2, welches eine Basensequenz hat, die durch SEQ ID NO:2 oder 4 dargestellt wird, eine Basensequenz, die durch SEQ ID NO:2 oder 4 mit einer Deletion, Substitution oder Addition von einer oder mehreren Basen dargestellt wird, oder eine Basensequenz, die komplementär mit der zuerst oder als zweites genannten Basensequenz ist, welche für ein Protein mit α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd Dehydrogenase-Aktivität kodiert.

4. Rekombinanter Vektor umfassend ein Gen gemäß Anspruch 2 oder 3.

5. Transformante, die ein Gen gemäß Anspruch 2 oder 3 trägt.

6. Verfahren zur Herstellung einer α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd Dehydrogenase, welches das Kultivieren einer Transformante gemäß Anspruch 5 und das Einsammeln des Enzyms aus der erhaltenen Kultur umfaßt.

7. Verfahren zur Herstellung von 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure, welches das Kultivieren einer Transformante gemäß Anspruch 5 in Gegenwart von α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäure-ε-semialdehyd umfaßt.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

