(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年7 月11 日 (11.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/053746 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/52, C12P 7/04, C12N 1/19, 1/21

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11214

(22) 国際出願日: 2001 年12 月20 日 (20.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-403067
2000 年12 月28 日 (28.12.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): トヨタ自動車株式会社 (TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市 トヨタ町１番地 Aichi (JP).

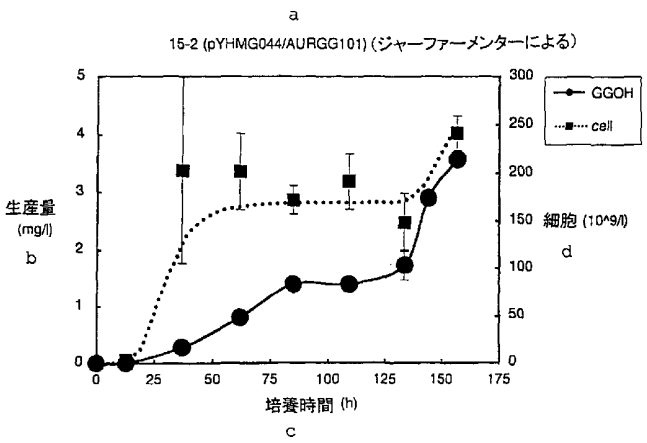
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大音 徳 (OHTO,Chikara) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市 トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 小畑 充生 (OBATA,Shusei) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市 トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 村松 正善 (MURAMATSU,Masayoshi) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市 トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 仁志 聖彦 (NISHI,Kiyohiko) [JP/JP]; 〒840-2193 佐賀県 佐賀郡 諸富町大字諸富津４５０番地 味の素株式会社 九州工場内 Saga (JP). 戸塚 一彦 (TOTSUKA,Kazuhiko) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都 中央区 京橋一丁目１５番１号 味の素株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI,Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PRENYL ALCOHOL

(54) 発明の名称: プレニルアルコールの製造方法



a...15-2 (pYHMG044/AURGG101) BY JAR FERMENTER
b...PRODUCTIVITY (mg/l)
c...CULTURE TIME (h)
d...CELL COUNT (10^9/l)

(57) Abstract: A process for producing prenyl alcohol characterized by comprising constructing a recombinant by transferring an expression recombinant DNA or a DNA for genome integration, which contains prenyl diphosphate synthase gene or a variant gene thereof, into a host, culturing the resultant recombinant and then collecting prenyl alcohol from the culture medium thus obtained.

(57) 要約:

プレニル二リン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA 又はゲノムインテグレート用 DNA を、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコールの製造方法。

WO 02/053746 A1

(81) 指定国 *(国内)*: CA, CN, IN, JP, US.

(84) 指定国 *(広域)*: **ヨーロッパ特許** (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— **国際調査報告書**

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

プレニルアルコールの製造方法

技術分野

本発明は、プレニルアルコールの製造方法に関する。

背景技術

生体内でのテルペノイド（イソプレノイド）合成は、アリル性二リン酸基質にイソペンテニル二リン酸（isopentenyl diphosphate）(IPP, C_5)を順次縮合することによって直鎖プレニル二リン酸であるゲラニル二リン酸（geranyl diphosphate (GPP, C_{10}))、ファルネシル二リン酸（farnesyl diphosphate (FPP, C_{15}))、ゲラニルゲラニル二リン酸（geranylgeranyl diphosphate (GGPP, C_{20})）が生合成されるところから始まる（図1)。図1において、枠で囲まれた文字が酵素を表す。hmgRはヒドロキシメチルグルタリル-CoA（hydroxymethyl glutaryl-CoA：HMG-CoA）還元酵素、GGPSはGGPP合成酵素、FPSはFPP合成酵素を示す。

プレニル二リン酸のなかでも、FPPは最も重要な生合成中間体であり、膨大な種類のテルペノイド類、例えば、エルゴステロール（プロビタミンD_2）を含むステロイド類、キノン（ビタミンK, VK）の側鎖、セスキテルペン類、スクアレン（SQ)、ファルネシル化タンパク質のアンカー分子、天然ゴムなどの合成前駆体である。

GGPPもまた、生体内では重要な生合成中間体であり、レチノール（ビタミンA, VA)、β-カロテン（プロビタミンA)、フィロキノン（ビタミンK_1, VK_1)、トコフェロール類（ビタミンE, VE)、ゲラニルゲラニル化タンパク質のアンカー分子、葉緑素の側鎖、ジベレリン、アーキアのエーテル型脂質などを始めとする化合物の生合成に必須である。

FPP、GGPPのアルコール誘導体であるファルネソール(farnesol)(FOH, C_{15})、ゲラニルゲラニオール（geranylgeraniol） (GGOH, C_{20})や、その異性体であるネロリドール(nerolidol)(NOH, C_{15})等は、香料として用いられる精油中の芳香物質として知られるが、薬理作用物質として有用な上記ビタミン類をはじめとする

化合物の合成出発物質としてもまた重要な物質である（図1）。

従って、*cis-,trans* ((*Z*)-, (*E*)-)異性体混合物でないいわゆる活性型プレニルアルコールの純品を大量に生産できる系の確立が望まれている。

IPPの生体内での合成は、すべてメバロン酸経路（アセチル補酵素A（acetyl-CoA）からメバロン酸を経てIPPを合成する経路）によると考えられてきたが、1980年代末より、M. Rohmerらがバクテリアを用いて新しいIPP合成経路を明らかにした。これは、非メバロン酸経路又はDXP(1-deoxyxylulose 5-phosphate)経路と呼ばれており、グリセルアルデヒド3-リン酸とピルビン酸から1-deoxyxylulose 5-phosphateを経てIPPを合成する経路である。

GGOHは、現在化学合成法により合成されている（例えば特開平8-133999号公報参照）。しかし、より炭素鎖の短いFOHやNOHと比べGGOHの化学合成はステップ数が多く、コストがかかる。また、化学合成法で合成されるGGOHは、一般的には炭素骨格が同じであるが、二重結合が(*E*)-型(*trans*型)と(*Z*)-型(*cis*型)の混合物として得られる。(*E,E,E*)-GGOH(以下(*all-E*)-GGOHと略す)は生物の代謝経路で合成される形であり、工業的利用価値を有する。(*all-E*)-GGOHを純粋な形で得るためには、カラムクロマトグラフィーや精密蒸留などを利用した精製が必要である。しかし、熱的に不安定なアリルアルコール(allylalcohol)であるGGOHの精密蒸留は困難である。また、カラムクロマトグラフィーによる精製は、多量の溶媒充填剤を必要とし、順次溶出してくる各画分を分析しながら回収し、さらに溶媒を除去しなければならないなど、操作が煩雑でコストも高く、工業実施には適さない。そこで、(*E*)-、(*Z*)-幾何異性体の生成制御や反応産物の繰り返し構造などの特徴から、(*all-E*)-GGOHの生合成法が望まれているが確立されていない。GGOH合成基質は、例えば出芽酵母であるサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の細胞内ではメバロン酸経路を経て供給されるが、そのキー酵素と考えられるHMG-CoA還元酵素を利用しても、FPP合成を経由するスクアレン合成能が上がることしか知られていない(特開平5-192184号公報； Donald et al. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63, 3341-3344)。また、ステロール取り込み能を獲得した特別な出芽酵母のスクアレン合成酵素遺伝子欠損株を培養しても、培養液1リットルあたり1.3mgのFOHの蓄積が知られてい

るだけであり(Chambon *et al.*(1990) Curr. Genet. 18, 41-46)、NOH の生合成法は知られていない。GGOH の生合成に関しては、特開平 9-238692 号公報において、植物細胞培養により 1 リットル培養液あたり 0.66～3.25mg の生産が報告されているが、工業化には適さない高価な植物細胞培養用培地が必要であり、培養にも光が必要であり、従来の精油等の天然物からの GGOH 調製に比べても実用的でなく、より工業化に適した生合成法、例えば微生物培養による生合成法は全く知られていない。

発明の開示

本発明は、プレニル二リン酸合成酵素遺伝子を含む発現用組換え DNA により形質転換された組換え体を培養することによるプレニルアルコールの製造方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、発酵工業に古来から広く用いられ、メバロン酸経路あるいは DXP 経路を経てプレニル二リン酸合成を行い、遺伝子組換えに関する様々な手法が駆使できる宿主、例えば単細胞真核生物（特に酵母）または原核生物（例えばバクテリア、特に大腸菌）を実験材料にして、プレニル二リン酸合成に関わる酵素の遺伝子導入によるプレニルアルコール生産系の開発を行った。酵母でプレニル二リン酸合成に関わる酵素の遺伝子（HMG-CoA 還元酵素遺伝子を代表とするメバロン酸経路関連酵素の遺伝子や IPPΔイソメラーゼ遺伝子、各種プレニル二リン酸合成酵素遺伝子、またはそれらの変異型または融合型遺伝子）を宿主細胞内で人為的に発現させる系を構築するために、恒常発現型又は誘導発現型転写プロモーターを含み、各種栄養要求性マーカーを持った発現シャトルベクターの作製を行い、これに目的の遺伝子又はその変異型遺伝子を組み込み、これを宿主細胞へ導入した。そして、その培養物からプレニルアルコール（特にゲラニルゲラニオール）を得、上記目的を達成することに成功し、本発明を完成するに至った。バクテリア、特に大腸菌では、既存のベクターを用いプレニル二リン酸合成に関わる酵素の遺伝子（例えば FPP 合成酵素変異型遺伝子や IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子）を宿主細胞に導入しその培養物を脱リン酸化した後ゲラニルゲラニオール を得、上記目的を達成することに

成功し本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA を、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコール（例えばゲラニルゲラニオール）の製造方法。

(2) プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA と、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA とを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコールの製造方法。

(3) プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA と、イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA とを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からゲラニルゲラニオールを採取することを特徴とするゲラニルゲラニオールの製造方法。

(4) プレニルニリン酸合成酵素遺伝子としては、以下の(a)及び(b)の遺伝子並びに(c)及び(d)の融合遺伝子からなる群から選択されるいずれかのものが挙げられる。

(a) ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(b) ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(c) ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子と、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子との融合遺伝子

(d) 上記(a)若しくは(b)の遺伝子又は(c)の融合遺伝子に、さらに His Asp Glu Leu で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が付加された融合遺伝子

また、ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子としては、配列番号２又は４に示されるアミノ酸配列をコードするものが挙げられ、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子としては、配列番号６に示されるアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。

(5) ヒドロキシメチルグルタリル-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA を、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からゲラニルゲラニオールを採取することを特徴とするゲラニルゲラニオールの製造方法。

(6) ヒドロキシメチルグルタリル-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA と、以下の(e)～(j)からなる群から選択されるいずれかの遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA とを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からゲラニルゲラニオールを採取することを特徴とするゲラニルゲラニオールの製造方法。

(e) イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子

(f) メバロン酸キナーゼ遺伝子

(g) アセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ遺伝子

(h) ヒドロキシメチルグルタリル-CoA 合成酵素遺伝子

(i) メバロンリン酸キナーゼ遺伝子

(j) メバロンニリン酸脱炭酸酵素遺伝子

(7) 上記方法によれば、ゲラニルゲラニオールは、少なくとも 0.05mg/l の濃度で生産することができる。ここで、宿主としては酵母（例えばサッカロマイセス・セレビシエ）又は大腸菌が挙げられる。サッカロマイセス・セレビシエは、例えばサッカロマイセス・セレビシエ A451 株、YPH499 株、YPH500 株、W303-1A 株若しくは W303-1B 株又はこれらに由来する株などを好ましく使用することができる。

(8) 前記(a)及び(b)の遺伝子並びに(c)及び(d)の融合遺伝子からなる群から選択されるいずれかのもの、並びに転写プロモーター及び転写ターミネーターを含む発現用組換え DNA。

(9) 転写プロモーターとしては、*ADH1* プロモーター、*TDH3*（*GAP*）プロモー

ター、*TEF2* プロモーター、*GAL1* プロモーター及び *tac* プロモーターからなる群から選ばれるいずれかのものが挙げられ、転写ターミネーターとしては、*CYC1* ターミネーターが挙げられる。

(10) 前記組換え DNA を宿主に導入してなる組換え体。

宿主は、前記と同様である。

(11) 以下の(i)-(vi)のいずれかの成分を含む培地を用いてプレニルアルコールの生産力を有する微生物を培養し、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコールの製造方法。

(i) 糖

(ii) アルコール

(iii) アンモニアガス、アンモニア水及び又はアンモニウム塩

(iv) 水酸化ナトリウムと硫酸との混合物

(v) KH_2PO_4、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、コーンスティープリカー、塩化カルシウム及び界面活性剤の混合物

(vi) 上記(i)-(v) のうち 2 種以上の混合物

上記（11）の製造方法において、以下の(i)、(ii)若しくは(iii)の成分又はこれらの 2 種以上の混合物を含む溶液をフィード液として培養することができる。

(i) 糖

(ii) アルコール

(iii) アンモニアガス、アンモニア水及び又はアンモニウム塩

上記フィード液成分と添加について、例えば以下の方法を取ることができる。

培養開始後 12 - 24 時間までのフィード液中の炭素源成分をグルコースのみにしておき、培養開始後 12 - 24 時間経過後フィード液の炭素源成分をエタノールを含む成分に切り替えて培養する。このとき、培養開始後 12 - 24 時間以降のフィード液の炭素源成分中の全炭素源成分に対するエタノールの割合を 50%以上、又は、培養開始後 12 - 24 時間以降のフィード液の炭素源成分中の炭素源成分をエタノールのみにすることができる。

ここで、「フィード」とは、培養時間中、所定の溶液または成分を培養液中に任意の方法で流入あるいは添加させることを意味し、一つの培養槽に対しある成分を流入あるいは添加させる培養方法を「フェドバッチ培養」と言う。

また、培養物中に蓄積するプレニルアルコールの濃度は少なくとも 0.1 g/l 以上、好ましくは 1 g/L 以上である。プレニルアルコールとしては、ゲラニルゲラニオールが挙げられ、微生物としてはサッカロマイセス・セレビシエなどの酵母が挙げられる。本発明において、サッカロマイセス・セレビシエは、サッカロマイセス・セレビシエ A451 株、YPH499 株、YPH500 株、W303-1A 株若しくは W303-1B 株又はこれらに由来する株を使用することができる。

さらに、上記(11)の製造方法において、微生物は組換え体であることが好ましい。このような組換え体としては、以下の a)又は b)のものを例示することができる。

a) メバロン酸経路関連遺伝子若しくはその変異型遺伝子、又はプレニル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA を、宿主に導入して作製されたもの

b)プレニル二リン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA と、メバロン酸経路関連遺伝子若しくはその変異型遺伝子を含む、発現用組換え DNA 又はゲノムインテグレート用 DNA とを、宿主に導入して作製されたもの

宿主は、サッカロマイセス・セレビシエ、例えばサッカロマイセス・セレビシエ A451 株、YPH499 株、YPH500 株、W303-1A 株若しくは W303-1B 株又はこれらに由来する株を例示することができる。

メバロン酸経路関連遺伝子としてはヒドロキシメチルグルタリル-CoA 還元酵素遺伝子（例えば *HMG1* 遺伝子）が挙げられる。

プレニル二リン酸合成酵素遺伝子としては、以下の(a)及び(b)の遺伝子並びに(c)及び(d)の融合遺伝子からなる群から選択されるいずれかのものが挙げられる。

(a) ファルネシル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(b) ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(c) ファルネシル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子と、ゲラ

ニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子との融合遺伝子

(d) 上記(a)若しくは(b)の遺伝子又は(c)の融合遺伝子に、さらに His Asp Glu Leu で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が付加された融合遺伝子

さらに、本発明において使用できる微生物は、原栄養体株、二倍体細胞、又は原栄養体株かつ二倍体細胞である。

さらに、本発明においては、培地を pH 制御することを特徴とする。pH 制御は、例えばアンモニウムガス、アンモニウム塩溶液、水酸化ナトリウム溶液又は硫酸を用いて行われる。

以下、本発明を詳細に説明する。本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2000-403067 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

本発明者は、代謝工学的な手法を用い、生体内で活性型プレニルアルコール、特に(*all-E*)-ゲラニルゲラニオール（以下「GGOH」という）を生産させる系の開発に臨んだ。

GGOH は、ゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）を前駆体としていると考えられており、一般には、単純に GGPP 合成酵素活性を増大させてもイソペンテニル二リン酸（isopentenyl diphosphate, IPP）及びジメチルアリル二リン酸（(3,3-Dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)から GGPP への合成が速まるだけで GGOH が生産されることは予測できない（図 1)。また、生体内で GGPP はカロテノイドやプレニル化タンパク質などの各種最終産物合成の前駆体としてしか知られておらず（図 1)、仮に GGPP 合成速度を増大させてもそれら最終産物濃度が上昇すると予想され、工業的に価値のある GGPP 合成系を確立できるかどうかはわからない。また、キー酵素である HMG-CoA 還元酵素活性を増大させたりその他の上記(e)～(j)に記載した酵素の酵素活性を増大させることによってメバロン酸経路のキー酵素である HMG-CoA 還元酵素の発現量を増大させても、FPP 合成の方向に効果が出るのか GGPP 合成の方向に効果が出るのか予想できず、GGPP 合成には効果が期待できなかった。さらに、現在までの情報からは、FOH 前駆体のファルネシル二リン酸（FPP）合成を触媒する FPP 合成酵素遺伝子の発現が、

GGOHの生産に効果があるという予想も成り立たない（図1）。

本発明においては、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子、HMG-CoA還元酵素遺伝子及び/又はIPPΔ-イソメラーゼ遺伝子を宿主細胞に導入できるよう組換えDNAを構築し、さらに組換え体を作製し、プレニルアルコール、特にGGOHの大量生産系を開発したものである。

1．発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNA断片の作製

本発明において、宿主を形質転換するための発現用組換えDNAは、その1つとしてプレニルニリン酸合成酵素遺伝子に、転写プロモーター及び転写ターミネーターDNAを連結又は挿入することにより得ることができる。また、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子に、予め転写プロモーター及び転写ターミネーターが連結された遺伝子発現カセットを作製しておいて、これをベクターに組み込むこともできる。連結及び挿入の順序は任意であるが、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子の上流に転写プロモーターを連結し、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子の下流に転写ターミネーターを連結することが好ましい。本発明においては、適当なDNA、例えばベクターDNAに順次プレニルニリン酸合成酵素遺伝子、転写プロモーター及び転写ターミネーターを組み込んでもよく、転写方向が考慮されていれば順不同で組み込んでもよい。

プレニルニリン酸合成酵素遺伝子としては、ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子（FPP合成酵素遺伝子という）又はゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子（GGPP合成酵素遺伝子という）が挙げられる。FPP合成酵素遺伝子としては、例えばサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)*ERG20*（配列番号1）、エッシェリシア・コーライ(*Escherichia coli*)*ispA*（配列番号3）、バチルス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のFPP合成酵素遺伝子（特開平5-219961号公報、米国特許5,786,192号）が挙げられる。また、GGPP合成酵素遺伝子としては、例えばサッカロマイセス・セレビシエ*BTS1*（配列番号5）、スルフォロバス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)*crtE*（特開平7-308913号公報、米国特許5,773,273号）、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)*Tth* GGPS遺伝子（特開平9-107974号公報、米国特許6,107,072号）が挙げられる。これらの遺伝子は、公知の遺伝子単離方

法により、又は市販のキットを用いて得ることができる。また、本発明においては、FPP 合成酵素遺伝子の変異体（変異型遺伝子）、GGPP 合成酵素遺伝子の変異体を使用することも可能である。

また、本発明においては、GGPP 合成酵素遺伝子又はその変異型と FPP 合成酵素遺伝子又はその変異型との融合遺伝子を含むベクターを構築しておいて、GGPP 合成酵素遺伝子及び FPP 合成酵素遺伝子の発現により生産されるポリペプチドが融合タンパク質になるように、両遺伝子を結合させることもできる。本発明において、このような 2 種類以上の遺伝子を結合させ、発現産物が融合タンパク質になるように構築した遺伝子を「融合遺伝子」という。融合遺伝子を作製するには、一方の DNA を適当な制限酵素で切断し、これに、同じ制限酵素で切断しておいた他方の DNA を、該 DNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列の読み枠がずれないように連結する方法などが採用される。

さらに、本発明においては、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子又は前記融合遺伝子の発現により生産されるタンパク質の C 末端に小胞体移行シグナル（His Asp Glu Leu で表されるアミノ酸配列（配列番号 24）：以下「HDEL 配列」という）が付加するように、当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を上記プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又は融合遺伝子に付加させて改変した遺伝子を作製することもできる。

さらに、本発明においては、ヒドロキシメチルグルタリル Co-A（hydroxymethyl glutaryl-CoA：HMG-CoA）還元酵素遺伝子（配列番号 7）又はその変異型遺伝子を、単独で、あるいは上記プレニルニリン酸合成酵素遺伝子（融合遺伝子を含む）との融合遺伝子として宿主に導入し発現させて、プレニルアルコール（特に GGOH）を生産することもできる。さらに、上記プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又は融合遺伝子と、HMG-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子とを宿主に導入し、共発現させることもできる。HMG-CoA 還元酵素遺伝子としては、サッカロマイセス・セレビシエ *HMG1*、*HMG2* が挙げられる。

上記プレニルニリン酸合成酵素遺伝子の変異型や HMG-CoA 還元酵素遺伝子の変異型等は、その一部の領域（例えば HMG-CoA 還元酵素遺伝子では最大で 2217 塩基）が欠損した欠失型や、野生型遺伝子又はこれら欠失型遺伝子の塩基配

列のうち１個又は数個～十数個の塩基が欠失、置換又は付加した変異型遺伝子でもよい。従って、変異型遺伝子によりコードされるアミノ酸配列においても、天然型プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列（FPP 合成酵素：配列番号２又は４；GGPP 合成酵素：配列番号６)、又は天然型 HMG-CoA 還元酵素のアミノ酸配列（配列番号８）のうち１個又は数個（例えば１個～10 個、好ましくは１個～３個）のアミノ酸に欠失、置換又は付加等の変異が生じてもよく、天然型 HMG-CoA 還元酵素のアミノ酸配列（配列番号８）のうち最大で 739 個のアミノ酸が欠失した欠失型や、これら欠失型酵素から 1 個又は数個（例えば 1 個～10 個、好ましくは１個～３個）のアミノ酸に欠失、置換又は付加等の変異が生じてもよい。具体的には、HMG-CoA 還元酵素遺伝子の野性型若しくは図 2B に例示するような欠失型遺伝子、又はそれらにコードされる酵素のアミノ酸配列において、たとえば図２A に示される箇所の塩基又はアミノ酸の置換が、１～10 箇所の範囲で部位特異的に生じていてもよい。さらに、天然型プレニルニリン酸合成酵素遺伝子（例えば配列番号１、３、５）又は天然型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子（配列番号７）を PCR で増幅させる場合において、Taq DNA ポリメラーゼ等の忠実性(fidelity)の低い DNA ポリメラーゼを用いた PCR(polymerase chain reaction)で野性型 DNA を増幅させた DNA 断片に生じる塩基の置換変異を「PCR エラー」といい、例えば、野生型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子（配列番号７）を鋳型に用いたときの PCR エラーによる塩基の置換変異に起因するコードされるポリペプチドの置換変異を有する HMG-CoA 還元酵素遺伝子（「*HMG1'*」とする）も、本発明において使用することができる。野性型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子（配列番号７）を鋳型にしたときの、PCR エラーによる塩基の置換の態様を図 2A に示す。*HMG1'*は配列番号９に示す塩基配列を有しており、これによってコードされるアミノ酸配列を配列番号 10 に示す。図 2A において、ヌクレオチドの変異は、置換前の塩基（1 文字表記)、HMG-CoA 還元酵素遺伝子の開始コドンの第 1 塩基を 1 としたときの塩基番号、置換後の塩基（1 文字表記）の順で表示してある。アミノ酸の変異は、PCR エラー型 HMG-CoA 還元酵素のアミノ酸配列において、置換前のアミノ酸残基（１文字表記)、HMG-CoA 還元酵素のアミノ酸番号、置換後のアミノ酸残基（１文字表記）の順で表示してある。さらに、上記 PCR エラ

一型の塩基配列を部位特異的変異誘発法等により一部修正することもでき、このような修正型の HMG-CoA 還元酵素遺伝子も、本発明において使用することができる。PCR エラーによる塩基の置換の態様を図 2A に示す。さらに、上記 PCR エラー型の塩基配列を部位特異的変異誘発法等により一部修正することもでき、このような修正型の HMG-CoA 還元酵素（配列番号 12）をコードする遺伝子（配列番号 11）も、本発明において使用することができる。

また、HMG-CoA 還元酵素の膜貫通ドメインと予想されている領域を欠損させた欠失体をコードする HMG-CoA 還元酵素遺伝子（PCR エラー型を含む）として、例えば、PCR エラー型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子 *HMG1'*の欠失型遺伝子 *HMG1Δ*の例を示す（図 2B）。最上段は欠失のない遺伝子 *HMG1'*である。細線（－）で表した部分は欠失した領域である。それぞれの欠失型遺伝子において、*HMG1'*遺伝子（配列番号 9）のうちどの領域を欠失させたのかを表 1 に示す。*HMG1'*欠失型遺伝子は、欠失のパターンに従って *HMG1Δ*xxy で表す。xx は欠失のパターンを、y は作業番号（任意の数字）を表す。図 2B には、*HMG1Δ*02y の例として「Δ026」を表示した（他の欠失パターンのものも同様に表示した）。

表1 欠失の態様

欠失型名称	プライマー1	プライマー2	プラスミド	推定膜貫通ドメインの欠失	欠失領域	欠失後の配列
HMG1Δ02y	HMG1(558-532)	HMG1(799-825)	pYHMG02X	#2-#3	第559塩基～第798塩基	配列番号13
HMG1Δ04y	HMG1(1191-1165)	HMG1(1267-1293)	pYHMG04X	#6	第1192塩基～第1266塩基	配列番号14
HMG1Δ05y	HMG1(1380-1354)	HMG1(1573-1599)	pYHMG05X	#7	第1381塩基～第1572塩基	配列番号15
HMG1Δ06y	HMG1(558-532)	HMG1(1267-1293)	pYHMG06X	#2-#6	第559塩基～第1266塩基	配列番号16
HMG1Δ07y	HMG1(558-532)	HMG1(1573-1599)	pYHMG07X	#2-#7	第559塩基～第1572塩基	配列番号17
HMG1Δ08y	HMG1(27-1)	HMG1(1573-1599)	pYHMG08X	#1-#7	第27塩基～第1572塩基	配列番号18
HMG1Δ10y	HMG1(27-1)	HMG1(1816-1842)	pYHMG10X	#1-#7(-605 aa)	第27塩基～第1815塩基	配列番号19
HMG1Δ11y	HMG1(27-1)	HMG1(1891-1917)	pYHMG11X	#1-#7(-631 aa)	第27塩基～第1890塩基	配列番号20
HMG1Δ12y	HMG1(27-1)	HMG1(1990-2016)	pYHMG12X	#1-#7(-663 aa)	第27塩基～第1989塩基	配列番号21
HMG1Δ13y	HMG1(27-1)	HMG1(2218-2244)	pYHMG13X	#1-#7(-739 aa)	第27塩基～第2217塩基	配列番号22

	プライマー配列	
HMG1(27-1)	5' TTT CAG TCC CTT GAA TAG CGG CGG CAT 3'	配列番号77
HMG1(558-532)	5' GTC TGC TTG GGT TAC ATT TTC TGA AAA 3'	配列番号61
HMG1(799-825)	5' CAC AAA ATC AAG ATT GCC CAG TAT GCC 3'	配列番号78
HMG1(1191-1165)	5' AGA AGA TAC GGA TTT CTT TTC TGC TTT 3'	配列番号79
HMG1(1267-1293)	5' AAC TTT GGT GCA AAT TGG GTC AAT GAT 3'	配列番号80
HMG1(1380-1354)	5' TTG CTC TTT AAA GTT TTC AGA GGC ATT 3'	配列番号81
HMG1(1573-1599)	5' CAT ACC AGT TAT ACT GCA GAC CAA TTG 3'	配列番号62
HMG1(1816-1842)	5' GCA TTA TTA AGT AGT GGA AAT ACA AAA 3'	配列番号82
HMG1(1891-1917)	5' CCT TTG TAC GCT TTG GAG AAA AAA TTA 3'	配列番号83
HMG1(1990-2016)	5' TCT GAT CGT TTA CCA TAT AAA AAT TAT 3'	配列番号84
HMG1(2218-2244)	5' AAG GAT GGT ATG ACA AGA GGC CCA GTA 3'	配列番号85

さらに、本発明においては、イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ（IPPΔ-イソメラーゼ）遺伝子を上記プレニルニリン酸合成酵素遺伝子またはその変異型遺伝子とともに導入することによって、プレニルアルコール、特にGGOHを生産することもできる。IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子としては、大腸菌由来の*idi*（配列番号32）が、プレニルニリン酸合成酵素変異型遺伝子としては大腸菌由来の*ispA*m各変異型遺伝子(Y79M：配列番号37, Y79E：配列番号35, Y79D：配列番号33）やバシラス・ステアロサーモフィラス由来の*fps*m(Y81M; 配列番号39)がそれぞれ挙げられる。この*ispA*由来の変異型遺伝子は、野生型FPP合成酵素（配列番号4）の第79番目のアミノ酸残基TyrがAsp(配列番号34)、Glu(配列番号36)又はMet(配列番号38)に置換変異した変異型酵素をコードしている。

使用されるDNAは、宿主細胞に遺伝的に保持される可能性のあるものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、バクテリオファージ、レトロトランスポゾンDNA、酵母人工染色体DNA（YAC:yeast artificial chromosome）等が挙げられる。また、ゲノムインテグレーションによる導入のための発現用組換えDNA断片としては、複製機能は必要ではなく、PCR法又は化学合成により作製されたものを使用することが可能である。

プラスミドDNAとしては、例えばpRS413、pRS414、pRS415、pRS416、YCp50、pAUR112又はpAUR123などのYCp型大腸菌-酵母シャトルベクター、pYES2又はYEp13などのYEp型大腸菌-酵母シャトルベクター、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pAUR101又はpAUR135などのYIp型大腸菌-酵母シャトルベクター、大腸菌由来のプラスミド（pBR322、pBR325、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pTV118N、pTV119N、pBluescript、pHSG298、pHSG396またはpTrc99Aなどの ColE系プラスミド、pACYC177又はpACYC184などのp15A系プラスミド、pMW118、pMW119、pMW218又はpMW219などのpSC101系プラスミド等)、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5等)などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ（Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP)、φX174、M13mp18又はM13mp19等が挙げられる。レトロトランスポゾンとしては、Ty因子などが挙げられる。YAC用ベクターとしてはpYACC2などが挙げられる。

宿主への組換えDNAの導入には、選択マーカー遺伝子を用いる場合が多いが、

アッセイ法がある場合は、必ずしもマーカー遺伝子は必要ではない。

転写プロモーターは、恒常発現型プロモーター又は誘導発現型プロモーターを用いることができる。恒常発現型プロモーターとは、主要代謝経路に関わる遺伝子の転写プロモーターを意味し、どの生育条件でも転写活性を有するプロモーターである。誘導発現型プロモーターとは、特定の生育条件で転写活性があり、その他の生育条件では活性が抑えられるプロモーターを意味する。

転写プロモーターは、酵母等の宿主中で活性を持つものであればいずれを用いてもよい。例えば酵母での発現用として、*GAL1* プロモーター、*GAL10* プロモーター、*TDH3*(*GAP*)プロモーター、*ADH1* プロモーター、*TEF2* プロモーター等を用いることができる。また、大腸菌での発現用として、*trp*、*lac*、*trc*、*tac* などのプロモーターを用いることができる。

さらに、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカーなどを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、*URA3*、*LEU2*、*TRP1*、*HIS3* などの栄養非要求性の表現型を指標とするマーカー遺伝子や、Amp^r、Tet^r、Cm^r、Km^r、*AUR1-C* 等の抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。

転写ターミネーターは、酵母等の宿主中で活性を持つものであればいずれの遺伝子に由来するターミネーターを用いてもよい。例えば酵母での発現用として、*ADH1* ターミネーター、*CYC1* ターミネーター等を用いることができる。また、大腸菌での発現用として、*rrnB* ターミネーターが挙げられる。バクテリア細胞内での遺伝子発現のため、効率的翻訳のためのリボソーム結合部位として、開始コドン上流にSD配列 (5'-AGGAGG-3'で代表される) を組み込むこともできる。

本発明において遺伝子導入用組換えDNAとして作製された発現ベクターは、プラスミド名の次に遺伝子名を表示することで命名及び識別することができる。プラスミドとしてpRS435GAPを使用したときの発現ベクター名とその構成との関係を表2に示す。pRS434、pRS444、pRS445プラスミドの場合も、上記プロモーターとの組み合わせにより、pRS435GAPと同じ要領で記載することができる。

表 2

発現ベクター名	構　成
pRS435GG	プラスミドpRS435GAPにGGPP合成酵素遺伝子*BTS1*が連結されている。
pRS435F	プラスミドpRS435GAPにFPP合成酵素遺伝子*ERG20*が連結されている。
pRS435GGF	GGPP合成酵素遺伝子*BTS1*とFPP合成酵素遺伝子*ERG20*とをこの順で連結した融合遺伝子がpRS435GAPに連結されている。
pRS435FGG	FPP合成酵素遺伝子*ERG20*とGGPP合成酵素遺伝子*BTS1*とをこの順で連結した融合遺伝子がpRS435GAPに連結されている。
pRS435GGHDEL	pRS435GGにHDEL配列をコードするヌクレオチド配列が連結されている。
pRS435FHDEL	pRS435FにHDEL配列をコードするヌクレオチド配列が連結されている。
pRS435FGGHDEL	pRS435FGGにHDEL配列をコードするヌクレオチド配列が連結されている。
pRS435GGFHDEL	pRS435GGFにHDEL配列をコードするヌクレオチド配列が連結されている。

また、プラスミドpRS434GAPに*HMG1*遺伝子を連結した場合は「pRS434GAP-HMG1」のように表示する。プラスミドとしてpRS434GAPを使用したときの発現ベクター名とその構成との関係を表3に示す。プラスミドがpRS435GAP、pRS445GAP等の場合も、pRS434GAPと同じ要領で記載することができる。

表 3

発現ベクター名	構　成
pRS434GAP-HMG1	プラスミド pRS434GAP に HMG-CoA 還元酵素遺伝子*HMG1*が連結されている。
pRS434GAP-HMG1Δ	プラスミド pRS434GAP に HMG-CoA 還元酵素遺伝子*HMG1*の欠失型遺伝子*HMG1*Δが連結されている。

2．組換え体の作製

本発明の組換え体は、本発明の組換えDNAを、各種プレニルニリン酸合成酵素遺伝子またはそれらの融合遺伝子、および／または、HMG-CoA還元酵素遺伝子（変異型を含む。特に記さないかぎり以下同じ）またはIPPΔ-イソメラーゼ遺

伝子が発現し得るように宿主内に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としてはプレニルアルコールを生産することができるものであれば特に限定されるものではないが、酵母またはバクテリアが好ましい。

本発明において、転写プロモーター及び転写ターミネーター並びにプレニル二リン酸合成酵素遺伝子、HMG-CoA 還元酵素遺伝子、IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子または(e)～(j)に記した遺伝子を含む組換え DNA は、酵母などの単細胞真核微生物を含む真菌、原核生物、動物細胞、植物細胞などに導入して組換え体を得ることができる。

真菌としては、変形菌類(Myxomycota)、藻菌類(Phycomycetes)、子嚢菌類(Ascomycota)、担子菌類(Basidiomycota)、不完全菌類(Fungi Imperfecti)が挙げられる。真菌としては、単細胞性のものが工業上利用上重要な酵母として良く知られており、子嚢菌類の子嚢菌酵母、担子菌類の担子菌酵母または不完全菌類の不完全菌酵母が挙げられる。酵母としては、子嚢菌酵母、特に、出芽酵母であるサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*： パン酵母として知られる)、キャンディダ・ユーティリス(*Candida utilis*)またはピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)等、分裂酵母であるシゾサッカロマイセス・ポンベ(*Shizosaccharomyces pombe*)等が用いられる。酵母の株は、プレニルアルコールを生産することができる限り特に限定されるものではない。*S. cerevisiae* の場合、例えば下記の A451 株、EUG5 株、EUG8 株、EUG12 株、EUG27 株、YPH499 株、YPH500 株、W303-1A 株、W303-1B 株 ATCC28382、AURGG101 株、AURGG102 株、AH1 株、YH1 株などが挙げられる。酵母への組換え DNA の導入方法は、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を採用することができる。

A451 (ATCC200589, *MATα can1 leu2 trp1 ura3 aro7*)

YPH499（ATCC76625, *MAT*a *ura3*-52 *lys2*-801 *ade2*-101 *trp1*-Δ63 *his3*-Δ *200 leu2*- Δ1, Stratagene , La Jolla, CA）

YPH500（ATCC76626, *MATα ura3*-52 *lys2*-801 *ade2*-101 *trp1*-Δ63 *his3*-Δ200 *leu2*-Δ1, Stratagene）

W303-1A（*MAT*a *leu2*-3 *leu2*-112 *his3*-11 *ade2*-1 *ura3*-1 *trp1*-1 *can1*-100）

W303-1B（*MATα leu2*-3 *leu2*-112 *his3*-11 *ade2*-1 *ura3*-1 *trp1*-1 *can1*-10

0)

AURGG101(A451, *aur1::AUR1-C*):本発明によって樹立されたA451由来株で*AUR1-C*遺伝子をインテグレートしたもの。

AURGG102(A451, *aur1*::*GAL1*p-*BTS1*&*AUR1-C*) :本発明によって樹立されたA451由来株で*AUR1*遺伝子座に*AUR1-C*遺伝子と共に、*GAL1*プロモーター、*BTS1*および*CYC1*ターミネーターを含む。

EUG5、EUG8 (A451, *ERG9*p::*URA3-GAL1*p) : 本発明において樹立されたA451由来株であり、スクアレン合成酵素遺伝子 *ERG9*、形質転換体選択マーカー遺伝子 *URA3*及び転写プロモーター*GAL1*p を含む。

EUG12(YPH499, *ERG9*p::*URA3-GAL1*p) : 本発明において樹立されたYPH499由来株であり、*ERG9*、*URA3*及び*GAL1*p を含む。

EUG27(YPH500, *ERG9*p::*URA3-GAL1*p) : 本発明において樹立されたYPH500由来株であり、*ERG9*、*URA3*及び*GAL1*p を含む。

AH1 株(pRS434GAP-HMG1/A451) : 本発明において樹立されたA451由来株であり、A451にpRS434GAP-HMG1が導入されている。

YH1 株(pRS434GAP-HMG1/ YPH499) : 本発明において樹立されたYPH499由来株であり、YPH499にpRS434GAP-HMG1が導入されている。

原核生物としてはアーキア(archaea)とバクテリア(bacteria,細菌)が挙げられる。アーキアとしては、メタノバクテリウム属(*Metanobacterium*)などのメタン生産菌、ハロバクテリウム属(*Halobacterium*)などの好塩菌、スルフォロバス属(*Sulfolobus*)等の好熱好酸性菌が挙げられる。バクテリアとしては工業的または学術的に利用価値の高い各種グラム陰性細菌またはグラム陽性細菌、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)等のエシェリシア属、枯草菌(*Bacillus subtilis*)やバシラス・ブレビス(*Bacillus brevis*)等のバシラス属、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)やアグロバクテリウム・リゾジェネス(*Agrobacterium rhizogenes*)等のアグロバクテリウム属、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacerium glutamicum*)等のコリネバクテリウム属、ラクトバシラス・プランタラム(*Lactobacillus plantarum*)等のラクトバシラス属、アクチノマイセス属(*Actinomyces*)やストレプトマイセス属(*Storeptomyces*)等の放線菌類(Actinomy

cetes)が挙げられる。

大腸菌等のバクテリアを宿主とする場合は、本発明の組換え DNA が細胞中で自律複製可能であると同時に、転写プロモーター、リボソーム RNA 結合領域としての SD 配列、本発明の遺伝子により構成されていることが好ましい。転写ターミネーターなどを適宜挿入することもできる。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、BL21、DH5α、HB101、JM101、JM109、MV1184、TH2、XL1-Blue、Y1088 等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。転写プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば *trp* プロモーター、*lac* プロモーター、P_L プロモーター、P_R プロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。*tac* プロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

遺伝子が宿主細胞に導入されたか否かの確認は、PCR(polymerase chain reaction)法、サザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、組換え体から DNA を調製し、導入 DNA 特異的プライマーを設計して PCR を行う。その後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green 液等により染色するか、あるいは UV 検出器で DNA を検出し、増幅産物を 1 本のバンド又はピークとして検出することにより、導入 DNA を確認する。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を検出することもできる。

3．プレニルアルコールの生産

本発明において、プレニルアルコールは、導入されたプレニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子（融合遺伝子を含む）、および／または、HMG-CoA 還元酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子、あるいは、前記(e)～(j)記載のメバロン酸経路関連酵素遺伝子を含む上記組換え体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞

若しくは培養菌体自体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。本発明の組換え体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。プレニルアルコールとしては、例えばGGOHが挙げられる。上記プレニルアルコールは、それぞれ単独で又は混合物として上記培養物中に蓄積される。

微生物を宿主として得られた組換え体を培養する培地は、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、組換え体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、ガラクトース、フラクトース、スクロース、ラフィノース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が挙げられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物が挙げられ、その他ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカー、各種アミノ酸等が挙げられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好気的条件下、26℃～42℃、好ましくは*S. cerevisiae*を宿主とした場合30℃で2-7日、*E. coli*を宿主とした場合で37℃で12-18時間行う。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

プロモーターとして誘導型転写プロモーターを用いた発現ベクターを導入した組換え体を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば*GAL1*プロモーターを用いた場合、炭素源としてガラクトースを使用することができる。また、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）で誘導可能なプロモーターを有する発現ベクターで形質転換した微生物（*E. coli*）を培養するときには、IPTGを培地に添加することもできる。

上記培養条件で培養すると、宿主により高収率でプレニルアルコールを生産することができる。また、プレニルアルコールを大量培養するには、ジャーファーメンター培養装置等を用いることができる。特に、宿主が*S. cerevisiae* YPH499、導入したプラスミドDNAがpRS435GGFおよびpRS434GAP-HMG1の場合

には、培地1リットルあたり1.5 mg以上、培養条件によっては128 mg以上生産することが可能である。

本発明においては、上記培地に、さらにテルペノイド、油脂、界面活性剤等を添加してプレニルアルコールの生産効率を高めることができる。これらの添加剤として以下のものを例示することができる。

テルペノイド：スクアレン、トコフェロール、IPP、DMAPP

油脂：大豆油、魚油、アーモンド油、オリーブ油

界面活性剤：ターシトール、トリトンX-305、スパン85、アデカノールLG109(旭電化製)、アデカノールLG294(旭電化製)、アデカノールLG295S(旭電化製)、アデカノールLG297(旭電化製)、アデカノールB-3009A(旭電化製)、アデカプロニックL-61(旭電化製)

油脂濃度は0.01%以上、好ましくは1～3%であり、界面活性剤濃度は0.005%～1%、好ましくは0.05～0.5%であり、テルペノイド濃度は0.01%以上、好ましくは1～3%である。

さらに、本発明においては、以下の(i)-(vi)のいずれかの成分を含む培地を用いてプレニルアルコールの生産力を有する微生物を培養し、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することもできる。さらに、以下の(i)-(v)のいずれかの成分を含むフィード液を用いたフェドバッチ培養を行うことも出来る。

(i) 糖

(ii) アルコール

(iii) アンモニアガス、アンモニア水及び又はアンモニウム塩

(iv) 水酸化ナトリウムと硫酸との混合物

(v) KH_2PO_4、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、コーンスティープリカー、塩化カルシウム及び界面活性剤の混合物

(vi) 上記(i)-(v) のうち2種以上の混合物

上記糖としては、グルコース、スクロース、ガラクトース、ラクトースなどが挙げられる。また、アルコールとしては、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノールなどが挙げられる。

フィード液中の炭素源成分としては、グルコースとエタノールとの組合せが好

ましく、pH 制御用化合物としてアンモニアガス又はアンモニウム塩（例えば酢酸アンモニウム）を加えることがさらに好ましい。フィード液の添加方法としては、培養開始後 12-24 時間まではグルコースを唯一の炭素源とするフィード液を用い、培養開始 12-24 時間以降にエタノールを含む成分を炭素源とするフィード液に切りかえることが好ましいが、そのままグルコースを唯一の炭素源としていても良い。フィード液の全炭素源に対するエタノールの割合は任意の割合でかまわないが、50%以上、または 100%にすることもできる。

ところで、培地に特定の栄養が補給されなくても増殖できる株を原栄養体株という。一般に、原栄養体株は、栄養要求性の表現型において野生型株と同一の表現型を持つ株のことである。一方、組換え体の宿主株としては、しばしば栄養要求性変異株が用いられている。この栄養要求性変異株を原栄養体株と同一の栄養要求性の表現型にするには、栄養要求性変異の原因となる変異遺伝子に対する野生型遺伝子を導入し、変異を相補すればよい。栄養要求性の原因となる変異遺伝子に対する野生型遺伝子が変異遺伝子に対して優性遺伝子である場合は、その野生型遺伝子をもつ別の株と接合させることによって変異を相補することもできる。本発明においては、例えば GGOH の生産株（GGPP 合成酵素遺伝子と FPP 合成酵素遺伝子との融合遺伝子を含む YH1 株）ゲノム中の栄養要求性の原因となる変異遺伝子のいくつかを野生型遺伝子で置換し、さらに残った変異型遺伝子にたいする優性野生型遺伝子を持つ YPH500 由来株と接合させることにより原栄養体株を得ることができる。本発明では二倍体細胞であって原栄養体株を使用することが好ましい。

培養後、プレニルアルコールが菌体内又は細胞内に生産される場合には、ホモジナイザー処理などを施して菌体又は細胞を破砕することにより目的のプレニルアルコールを採取する。また、細胞を破砕せずに有機溶媒等で直接抽出してもよい。あるいは、本発明のプレニルアルコールが菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、有機溶媒による抽出等により前記培養物中からプレニルアルコールを採取し、必要に応じてさらに各種クロマトグラフィー等を用いて単離精製することができる。

本発明において、株とベクターとの好ましい組み合わせ及びプレニルアルコール生産の関係を例示すると表４の通りである。

表 4

	プロモーター	遺伝子	宿主	添加試薬	GGOH生産量 (mg/l)1	GGOH生産量 (mg/l)2	GGOH生産量 (mg/l)3
hosts	—	—	Sc A451	—	(0.00–0.02)		
	—	—	AURGG101	—	(0.00–0.02)		
	—	—	Sc YPH499	—	(0.00)		
	—	—	Ec JM109	—	(0.00)		
HMG1	GAP	HMG1	Sc A451	—	0.07	0.07–0.35	—
	ADH1	HMG1	Sc A451	—	0.05	0.05–0.14	—
	GAL1	HMG1	Sc A451	—	0.05	0.05–0.1	—
	GAL1	HMG1	Sc AURGG101	—	0.05	0.05–2.2	—
	GAP	HMG1	Sc EUG8	—	0.05	0.05–0.16	—
	GAP	HMG1	Sc EUG12	—	0.05	0.05–1.03	—
	GAP	HMG1	Sc EUG27	—	0.05	0.05–0.63	—

HMG1Δ									
	GAL1	HMG1Δ044	Sc A451	—	0.05	—	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ056	Sc A451	—	0.05	0.05–0.07	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ062	Sc A451	—	0.05	0.05–0.07	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ078	Sc A451	—	0.05	—	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ081	Sc A451	—	0.05	—	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ112	Sc A451	—	0.05	0.05–0.06	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ122	Sc A451	—	0.05	0.05–0.06	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ044	Sc AURGG101	—	0.05	0.05–2.2	2.2–7.9		
	GAL1	HMG1Δ062	Sc AURGG101	—	0.05	0.05–0.06	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ075	Sc AURGG101	—	0.05	0.05–0.06	—	—	—
	GAL1	HMG1Δ081	Sc AURGG101	—	0.05	—	—	—	—
	GAP	HMGΔ044	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.09	—	—	—
	GAP	HMGΔ056	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.11	—	—	—
	GAP	HMGΔ062	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.13	—	—	—
	GAP	HMGΔ076	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.15	—	—	—
	GAP	HMGΔ081	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.14	—	—	—
	GAP	HMGΔ100	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.18	—	—	—
	GAP	HMGΔ112	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.34	—	—	—
	GAP	HMGΔ122	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.13	—	—	—
	GAP	HMGΔ133	Sc EUG5	—	0.05	0.05–0.71	—	—	—
	GAP	HMGΔ026	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.63	—	—	—
	GAP	HMGΔ044	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.44	—	—	—
	GAP	HMGΔ056	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.40	—	—	—
	GAP	HMGΔ062	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.45	—	—	—
	GAP	HMGΔ076	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.55	—	—	—
	GAP	HMGΔ081	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.49	—	—	—
	GAP	HMGΔ100	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.44	—	—	—
	GAP	HMGΔ112	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.53	—	—	—
	GAP	HMGΔ122	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.50	—	—	—

差替え用紙 (規則26)

	GAP	HMGΔ133	Sc EUG12	—	0.05	0.05–0.44	—
HMG1+HMG1Δ	GAL1, GAP	HMG1Δ044, HMG1	Sc AURGG101	—	0.27	0.27–0.93	—
FPS gene	GAP	ERG20	Sc A451	—	0.05	0.05–0.07	—
	lac	fpsm	Ec JM109	IPP&DMAPP	6.9	6.9–16	—
	tac	ispAm(Y79D)	Ec JM109	IPP&DMAPP	0.06	0.06–0.12	—
	tac	ispAm(Y79E)	Ec JM109	IPP&DMAPP	0.14	0.14–0.26	—
	tac	ispAm	Ec JM109	IPP&DMAPP	6.0	6.0–22	—
BTS1 (Yip)	GAL1	BTS1 integrated	Sc A451(AURGG102)	—	0.05	0.05–0.07	—
	GAL1	BTS1 integrated	Sc YPH499(AURGG703)	—	0.05	0.05–0.07	—
BTS1 (YEp)	GAP	BTS1	Sc A451	—	0.10	0.10–0.58	—
	GAP	BTS1	Sc YPH499	—	0.05	0.05–0.15	—
	GAP	BTS1	Sc EUG8	—	0.05	0.05–1.4	—
	GAP	BTS1	Sc EUG12	—	0.05	0.05–1.6	—
	GAP	BTS1	Sc EUG27	—	0.05	0.05–1.5	—
HMG1Δ+FPS gene	GAL1, GAP	HMG1Δ044, ERG20	Sc AURGG101	—	0.38	0.38–11.3	—
	GAL1, GAP	HMG1Δ044, ispA	Sc AURGG101	—	0.11	0.11–1.64	—
HMG1+BTS1(YEp)	GAP, GAP	HMG1, BTS1	Sc YPH499	—	0.14	0.14–0.58	—
	TEF, GAP	HMG1, BTS1	Sc YPH499	—	0.13	0.13–0.63	—
HMG1+BTS1(Yip)	GAP, GAL1	HMG1, BTS1	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–1.3	—
	GAP, GAL1	HMG1, BTS1	Sc AURGG703	—	0.05	0.05–0.46	—

HMG1 Δ +BTS1(YEp)	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, BTS1	Sc AURGG101	—	0.46	0.46–9.8	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 027, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.08	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 044, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.42	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 045, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.61	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 059, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.10	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 062, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.42	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 063, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.11	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 075, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.40	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 083, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.21	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 094, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.14	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 106, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.12	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 122, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.16	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 123, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.09	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 134, BTS1 integrated	Sc AURGG102	—	0.05	0.05–0.11	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 044, BTS1 integrated	Sc AURGG703	—	0.12	0.12.–0.20	—
	GAP, GAL1	HMG1 Δ 062, BTS1 integrated	Sc AURGG703	—	0.16	0.16–0.24	—
HMG1 Δ +MVN genes	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, HMGS	Sc AURGG101	—	0.20	0.20–1.3	—
	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, ERG12	Sc AURGG101	—	0.21	0.21–1.0	—
	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, ERG8	Sc AURGG101	—	0.12	0.12–2.7	—
	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, ERG10	Sc AURGG101	—	0.17	0.17–1.22	—
	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, ERG19	Sc AURGG101	—	0.05	0.05–1.89	—
	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, IDI1	Sc AURGG101	—	0.05	0.05–0.79	—
	GAL1, GAP	HMG1 Δ 044, idi	Sc AURGG101	—	0.43	0.43–1.2	—

FPS gene+idi	tac, idi	ispAm, idi	Ec JM109	—	0.07	—	—
FGG fusion	GAP	ERG20-BTS1	Sc YPH499	—	0.06	0.06-0.27	—
	GAP	ERG20-BTS1-HDEL	Sc YPH499	—	0.05	0.05-0.12	—
GGF fusion	GAP	BTS1-ERG20	Sc A451	—	0.05	0.05-0.35	0.46-0.98
	GAP	BTS1-ERG20	Sc YPH499	—	0.17	0.17-0.46	1.3-2.5
	GAP	BTS1-ERG20	Sc EUG5	—	0.05	0.05-2.9	5.1-6.6
	GAP	BTS1-ERG20	Sc EUG12	—	0.07	0.07-5.4	2.0-3.8
	GAP	BTS1-ERG20-HDEL	Sc A451	—	0.05	0.05-0.07	0.07-0.56
	GAP	BTS1-ERG20-HDEL	Sc YPH499	—	0.44	0.44-0.80	1.6-1.9
	GAP	BTS1-ERG20-HDEL	Sc EUG5	—	0.21	0.21-0.35	5.5-6.5
	GAP	BTS1-ERG20-HDEL	Sc EUG12	—	1.3	1.3-5.6	—
HMG1+BTSHDEL	GAP, GAP	HMG1, BTS1-HDEL	Sc YPH499	—	0.14	0.14-0.23	—
HMG1+FGG fusion	GAP, GAP	HMG1, ERG20-BTS	Sc YPH499	—	0.20	0.20-0.46	—
	GAP, GAP	HMG1, ERG20-BTS1-HDEL	Sc YPH499	—	0.11	0.11-0.29	—
HMG1+GGF fusion	GAP, GAP	HMG1, BTS1-ERG20	Sc A451	—	0.05	0.05-4.1	—
	GAP, GAP	HMG1, BTS1-ERG20	Sc YPH499	—	0.46	0.46-2.1	2.1-128
	GAP, GAP	HMG1, BTS1-ERG20-HDEL	Sc A451	—	0.05	0.05-5.1	—
	GAP, GAP	HMG1, BTS1-ERG20-HDEL	Sc YPH499	—	1.0	1.0-1.9	2.2-5.6

GGOH生産量：1は下限、2は好ましい範囲、3はさらに好ましい範囲を示す。
宿主：Scは*S. cerevisiae*、Ecは*E. coli*を示す
fpsは*B. stearothermophilus* FPS gene
fpsmは*B. stearothermophilus* FPSm(Y81M) gene
idiは*E. coli* IPP isomerase gene/プラスミドはp3-47-13
ispAmは*E. coli* ispAm(Y79M) gene/プラスミドはpALispA16m

差替え用紙（規則26）

(i) pRS445GAP に、GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* を組み込んでプラスミド pRS445GG を作製し、これを宿主である A451 株又は YPH499 に導入すると、GGOH 生産量が上昇する（平均約 0.4mg/l）。

(ii) GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* と FPP 合成酵素遺伝子 *ERG20* との融合遺伝子を pRS435GAP 又は pRS445GAP に組み込んだプラスミド pRS435FGG、pRS445FGG、pRS435GGF 又は pRS445GGF、あるいは、これら融合遺伝子の末端に HDEL 配列をコードする塩基配列を連結したプラスミド（上記融合遺伝子が発現したときに生産されるポリペプチドの C 末端に HDEL 配列が付加されるように改変した遺伝子を含むプラスミド）pRS435FGGHDEL、pRS445FGGHDEL、pRS435GGFHDEL を作製し、これらを宿主 A451 又は YPH499 に導入すると、*ERG20-BTS1* 融合で平均 0.20mg/l、*BTS1-ERG20* 融合で平均 0.39mg/l、*BTS1-ERG20-HDEL* 融合で平均 0.62mg/l の GGOH を生産する。

(iii) HMG-CoA 還元酵素遺伝子 *HMG1* が pRS434GAP に組み込まれたプラスミド pRS434GAP-HMG1 と、上記融合遺伝子を含むプラスミド pRS435GGF とを宿主 YPH499 に導入して共発現すると、平均 1.55mg/l の GGOH を生産する。YMO 培地（YM 培地に大豆油などを添加したもの）で 30℃で 7 日培養すると 5.61mg/l の GGOH を生産する。

(iv) pRS435GGFHDEL と pRS434GAP-HMG1 とを宿主 YPH499 に導入して共発現すると、平均 1.50mg/l の GGOH を生産する。YMO 培地で 30℃で 7 日培養すると 5.64mg/l の GGOH を生産する。

(v) pRS435GGF と pRS434GAP-HMG1 とを宿主 YPH499 に導入して、ジャーファーメンターで 109 時間培養すると 128mg/l の GGOH を生産する。

(vi) HMG-CoA 還元酵素遺伝子と GGF 融合遺伝子とを共発現させると、ほとんどの株で 100 mg/l 以上の GGOH を生産し、最大で 189 mg/l の GGOH を生産する。

(vii) HMG-CoA 還元酵素遺伝子と GGF 融合遺伝子との共発現株を原栄養体化及び二倍体化した pRS435GGF/YH3 株を用いフェドバッチ培養し、培養開始 20 時間以降のフィード液として 500 g/l グルコース液を用いると 0.47 g/l の GGOH を、400 g/l エタノール液を用いると 1.16 g/l の GGOH を生産する。

(viii) pRS435GGF/YH3 株を用い、フェドバッチ培養を行い、培養開始後 21 時間以降のフィード液の全炭素源に対するエタノールの割合を 71%にし、さらに酢酸アンモニウムを添加した場合は 2.5g/l の GGOH を生産する。

図面の簡単な説明

図 1 は、メバロン酸経路関連酵素の代謝経路を示す図である。

図 2A は、置換変異のパターンを示す図である。

図 2 B は、欠失型 *HMG1* 遺伝子の構築図である

図 3 は、プラスミド pRS414 を示す図である。

図 4 は、プラスミド pYES2 を示す図である。

図 5 は、*ADH1* プロモーター、ターミネーターの配列を示す図である。

図 6A は、プラスミド pRS414PTadh を示す図である。

図 6B は、プラスミド pRS414TPadh を示す図である。

図 7A は、プラスミド pRS434GAP を示す図である。

図 7B は、プラスミド pRS434TEF を示す図である。

図 7C は、プラスミド pRS435GAP を示す図である。

図 7D は、プラスミド pRS444GAP を示す図である。

図 7E は、プラスミド pRS444TEF を示す図である。

図 7F は、プラスミド pRS445GAP を示す図である。

図 8 は、pT7 ベクターに挿入された各メバロン酸経路関連遺伝子の方向を示す図である。

図 9 は、プラスミド pALHMG106 の物理地図を示す図である。

図 10 は、ORF182 断片上の制限酵素認識部位を示す図である。

図 11 は、*B. stearothermophilus* FPP 合成酵素変異体(Y81M)の発現ベクターを示す図である。

図 12 は、サザンブロットハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。

図 13 は、PCR マッピングの結果を示す写真である。

図 14 は、ノーザンブロッティングの結果を示す写真である。

図 15A は、粗酵素液中の各プレニルニリン酸合成酵素の比活性を示す図である。

図 15B は、粗酵素液中の各プレニルニリン酸合成酵素の比活性を示す図である。

図 16 は、恒常発現型プロモーターを連結した *HMG1* 遺伝子を A451 に導入したときの各組換え体の GGOH 生産量を示す図である。

図 17 は、*GAL1p-HMG1* を含む YEp 発現ベクターを保持する A451 又は AURGG101 を宿主としたときの各組換え体の GGOH 生産量を示す図である。

図 18 は、プラスミド pYES2-HMG を、AURGG102 と AURGG703 へ導入したときの各組換え体の GGOH 生産量を示す図である。

図 19 は、*GAL1p* を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1*'遺伝子を挿入したときの各組換え体の GGOH 生産量を示す図である。

図 20 は、*GAL1p* を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1*'遺伝子を挿入したときの各組換え体の GGOH 生産量を示す図である。

図 21 は、*GAL1p* を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1*'遺伝子を挿入したときの GGOH 生産量を示す図である

図 22 は、*GAL1p* を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1*'遺伝子を挿入したときの GGOH 生産量を示す図である

図 23 は、p4M、p16M 等を保持する組換え *E. coli* を、IPP と DMAPP を含む培地で培養したときのプレニルアルコール生成量を示す図である。

図 24 は、*BTS1* と *ERG20* の融合遺伝子を作製するために使用するプライマー並びにその位置及び方向を示す図である。

図 25 は、*ERG20-BTS1* 融合遺伝子を A451 系の株に導入して GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 26 は、*ERG20-BTS1* 融合遺伝子を YPH499 系の株に導入して GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 27 は、*TEF2*p-*HMG1* を導入した YPH499 系株を宿主としたときの GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 28 は、*TDH3*p-*HMG1* を導入した YPH499 系株を宿主としたときの GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 29A は、A451 系株を宿主としたときの GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 29B は、A451 系株を宿主としたときの GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 30A は、YPH499 系株を宿主としたときの GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 30B は、YPH499 系株を宿主としたときの GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 31A は、A451 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 2 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 31B は、A451 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 4 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 31C は、A451 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 7 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 32A は、AH1 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 2 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 32B は、AH1 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 4 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 32C は、AH1 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 7 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 33A は、EUG5 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 2 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 33B は、EUG5 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 4 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 33C は、EUG5 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 7 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 34A は、YPH499 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 2 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 34B は、YPH499 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 4 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 34C は、YPH499 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 7 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 35A は、YH1 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 2 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 35B は、YH1 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 4 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 35C は、YH1 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 7 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 36A は、EUG12 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 2 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 36B は、EUG12 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 4 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 36C は、EUG12 に pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入し、所定の糖組成で 7 日培養したときの GGOH の生産量を示す図である。

図 37 は、pRS435GGF/YH1 (pRS434GAP-HMG1/ YPH499) 株を、大豆油含有培地でジャーファーメンター培養したときのプレニルアルコール生産量を測定した結果を示す図である。

図 38 は、15-2 株を、大豆油含有培地でジャーファーメンター培養したときのプレニルアルコール生産量を測定した結果を示す図である。

図 39 は、融合遺伝子の発現を確認するために行ったノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。

図 40 は、ウエスタンブロットの結果を示す写真である。

図 41A は、HMG-CoA 還元酵素遺伝子と、GGPP 合成酵素遺伝子-FPP 合成酵素遺伝子融合遺伝子とを共発現させた株における GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 41B は、HMG-CoA 還元酵素遺伝子と、GGPP 合成酵素遺伝子-FPP 合成酵素遺伝子融合遺伝子とを共発現させた株における GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 41C は、HMG-CoA 還元酵素遺伝子と、GGPP 合成酵素遺伝子-FPP 合成酵素遺伝子融合遺伝子とを共発現させた株における GGOH 生産量を測定した結果を示す図である。

図 42 は、フィード液の流速条件を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

本実施例は、以下の内容を包含する。

(1) Stratagene 社の pRS 系各ベクター、Invitrogen 社の pYES、又は *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 由来のゲノム DNA をもとにして、発現ベクターpRS435GAP などを作製する。

(2) メバロン酸経路関連酵素遺伝子のクローニング

アセチル補酵素 A アセチル転移酵素遺伝子、HMG-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子、メバロン酸キナーゼ遺伝子、メバロン酸リン酸キナーゼ遺伝子、メバロン酸二リン酸脱炭酸酵素遺伝子、イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子、ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子又はその置換変異型遺伝子、及びゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子をクローニングし、発現ベクターを作製する。

(3) A451、YPH499 などの宿主に、メバロン酸経路関連酵素遺伝子を含むプラスミドを導入する。また、A451、YPH499 のゲノム DNA 中の *ERG9* 転写プロモーターを pYES2 由来の *GAL1* 転写プロモーターで置換した変異株（EUG 株）を作製し、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子導入用宿主とする。

(4) A451 に *AUR1-C* 遺伝子をインテグレートした A451 宿主由来株 AURGG101、及び *AUR1* 遺伝子座に *AUR1-C* 遺伝子と共に、*GAL1* プロモーター、*BTS1* および *CYC1* ターミネーターを含む A451 由来株 AURGG102 を作製し、遺伝子導入用宿主とする

(5) 各宿主にプレニルニリン酸合成酵素発現ベクターを導入し、YM7 培地（YM 培地を NaOH で pH7 に調整したもの）、YMO 培地、IPP 及び DMAPP 含有培地などの所定の培地で培養し、培養液を抽出してプレニルアルコール（特に GGOH）を分離定量する。成績の良好な株については、ジャーファーメンターで長時間培養し、プレニルアルコールを大量生産する。さらに、組換え体を原栄養体化及び二倍体化したときの GGOH 生産に対する影響、あるいは培地に添加するエタノールやアンモニア等の化合物の GGOH 生産に対する影響も検討する。

〔実施例 1〕 発現ベクターの構築

(1) *E. coli-S. cerevisiae* シャトルベクター

Stratagene 社よりプラスミド pRS404、pRS405 及び pRS414（図 3）を購入した。宝酒造より pAUR123 を購入し、Invitrogen 社 (Carlsbad, CA) から pYES2（図 4）を購入した。

(2) ゲノム DNA

S. cerevisiae ゲノム DNA は、宝酒造から酵母ゲノム DNA 調製用キット「Gen とるくん」を購入し、添付のプロトコルに従って *S. cerevisiae* YPH499 からゲノム DNA を調製した。

E. coli ゲノム DNA は、*E. coli* JM109 (宝酒造) から次の方法で調製した。JM109 を 1.5 ml 2xYT 培地で培養後、遠心により集菌し、567 μl の TE (pH 8.0)、3 μl の 20 mg/ml proteinase-K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 及び 30 μl の 10% SDS を加え、37℃で 1 時間保温後、100 μl の 5 M NaCl を加え混合した。これに、80 μl の CTAB/NaCl 溶液 (10% CTAB, 0.7 M NaCl) を加え、65℃で 10 分加熱した。これを 700 μl のクロロホルム / イソアミルアルコール (24:1) で抽出し、水層画分をさらに 600 μl のフェノール/クロロホルム /イソアミルアルコール (25:24:1) で抽出した。抽出後の水層画分に 0.6 容量のイソプロパノールを加えて遠心した。沈殿画分を 70% エタノールで洗い、乾燥後 100 μl の TE (pH 8.0)に溶解し大腸菌ゲノム DNA 溶液とした。DNA を OD_{260} で測定、定量後、DNA 濃度が 1 μg/μl になるように TE で調製した。

E. coli からのプラスミド DNA は、Promega (Madison, WI) の Wizard PureFection Plasmid DNA Purification System を用いて調製した。

(3) pRS414 へ *ADH1*p-*ADH1*t 断片の挿入

pRS414（図 3）を *Nae*I と *Pvu*II で切断し、f1 ori と *LacZ* 部分を含まない 4.1 kbp 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。また、pAUR123 を *Bam*HI で切断し、Klenow 酵素で平滑末端にした後、アガロースゲル電気泳動で ADH1 プロモーター（*ADH1*p）及び *ADH1* ターミネーター（*ADH1*t）を含む 1.0 kbp

の断片 (図5、配列番号 23) を精製した。pRS414 の 4.1kbp 断片には、大腸菌と酵母の複製開始点、大腸菌用形質転換マーカーAmp^r と酵母用栄養要求性マーカーTRP1 が残っており、pAUR123 1.0 kbp 断片は *ADH1*p 、*ADH1*t およびそれらに挟まれたクローニングサイトを含んでいる。この二つの断片を宝酒造 DNA ライゲーションキットにより連結したのち *E. coli* SURE2 スーパーコンピテント細胞(Stratagene, La Jolla, CA)へ形質転換した。

得られた組換え体からプラスミド DNA を調製し、*Sal*I と *Sca*I によるマッピングでチェックしたところ、二通りの向きで pRS414 へ挿入されたプラスミド pRS414PTadh（図6A）及び pRS414TPadh（図6B）が得られた。

(4) pRS ベクターへ *CYC1*t 断片の挿入

CYC1 転写ターミネーター *CYC1*t 断片は PCR で調製した。以下の PCR 用オリゴ DNA：XhoI-Tcyc1FW と ApaI-Tcyc1RV との組合せを PCR 用プライマーDNA に用い、鋳型として pYES2 を用いた。

XhoI-Tcyc1FW：5'- TGC ATC TCG AGG GCC GCA TCA TGT AAT TAG -3'（配列番号 40）

ApaI-Tcyc1RV：5'- CAT TAG GGC CCG GCC GCA AAT TAA AGC CTT CG -3'（配列番号 41）

反応は、0.1 μg pYES2, 50 pmol プライマー DNA, $MgSO_4$ 含有 1x *Pfu* バッファー(Promega, Madison, WI), 10 nmol dNTP, 1.5 u *Pfu* DNA ポリメラーゼ (Promega)及び 1 μl Perfect Match ポリメラーゼエンハンサー (Stratagene)を含む 50 μl の反応液を調製し、95℃ 2 分、(95℃ 45 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1分)×30 サイクル、72℃ 5分、4℃ストックの反応条件で行った。増幅した2種の DNA をそれぞれ *Xho*I と *Apa*I で切断し、アガロースゲル電気泳動で 260 bp の DNA 断片を精製し CYC1t-XA とした。

pRS404、pRS405 の *Xho*I-*Apa*I 部位に CYC1t-XA を挿入し、それぞれ、pRS404Tcyc、pRS405Tcyc とした。

(5) 転写プロモーターの調製

pAUR123 または酵母ゲノム DNA を鋳型にして PCR により転写プロモーター

を含むDNA断片を調製した。使用したDNAプライマーは以下の通りである。

SacI-Ptdh3FW：5'-CAC GGA GCT CCA GTT CGA GTT TAT CAT TAT CAA-3'（配列番号42）

SacII-Ptdh3RV：5'-CTC TCC GCG GTT TGT TTG TTT ATG TGT GTT TAT TC -3'（配列番号43）

SacI-Ptef2FW:5'-CCG CGA GCT CTT ACC CAT AAG GTT GTT TGT G AC G-3'（配列番号44）

SacII-Ptef2RV:5'-CTT TCC GCG GGT TTA GTT AAT TAT AGT TCG TT G ACC-3'（配列番号45）

*ADH1*転写プロモーター*ADH1*p増幅用にはSacI-Padh1FW及びSacII-Padh1 RVをPCR用DNAプライマーに用い、鋳型にpAUR123を用いた。*TDH3*（*GAP*）転写プロモーター*TDH3*p（*GAP*p）増幅用にはSacI-Ptdh3FW及びSacII-Ptdh3RVをPCR用DNAプライマーに用い、*TEF2*転写プロモーター*TEF2*p増幅用にはSacI-Ptef2FW及びSacII-Ptef2RVをPCR用DNAプライマーに用い、鋳型にはそれぞれ酵母ゲノムDNAを用いた。反応溶液は、0.1 μg pAUR123又は0.46 μg 酵母ゲノム DNA, 100 pmol プライマー DNA, 1x ExTaq バッファー(宝酒造), 20 nmol dNTP, 0.5 u ExTaq DNA ポリメラーゼ(宝酒造)及び 1 μl Perfect Match ポリメラーゼエンハンサーを含む 100 μl 溶液を調製し、95℃ 2分、(95℃ 45秒、60℃ 1分、72℃ 2分)×30サイクル、72℃ 4分、4℃ストックの反応条件で行った。増幅した4種のDNAをSacIとSacIIで切断し、アガロースゲル電気泳動でそれぞれ620 bp、680 bp、710 bp、400 bpのDNA断片を精製し、*TDH3*p、*TEF2*pとした。

(6) 2μ DNA複製開始領域の調製

YEpベクターであるpYES2を*Ssp*Iと*Nhe*Iで切断後、2μ DNA複製開始点（2 μ ori）を含む1.5 kbp断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、Klenow酵素で平滑末端化し、このDNA断片を2μOriSNとした。

(7)YEp型発現ベクターの作製

pRS404Tcyc、pRS405TcycをBAP（bacterial alkaline phosphatase, 宝酒造）

処理した*Nae*I 部位に 2μOriSN を挿入し、*E. coli* SURE2 に形質転換した後プラスミド DNA を調製した。これを、*Dra*III 及び *Eco*RI、*Hpa*I、または、*Pst*I 及び *Pvu*II により切断後、アガロースゲル電気泳動し、2μ ori の挿入とその向きをチェックした。作製した pRS404Tcyc、pRS405Tcyc に pYES2 と同じ向きで 2 μ ori が挿入されたプラスミドをそれぞれ pRS434Tcyc2μOri、pRS435Tcyc2μOri とし、pRS404Tcyc、pRS405Tcyc に pYES2 と反対向きで 2 μ ori が挿入されたプラスミドをそれぞれ pRS444Tcyc2μOri、pRS445Tcyc2μOri とした。

pRS434Tcyc2μOri、pRS435Tcyc2μOri、pRS444Tcyc2μOri 及び pRS445Tcyc2μOri の 4 種のプラスミドの *Sac*I-*Sac*II 部位に、転写プロモーターを含む断片 *ADH1*p、*TDH3*p(*GAP*p)、*PGK1*p 又は *TEF2*p を挿入し DNA をクローン化した。その結果、(i) pRS434Tcyc2μOri から pRS434GAP 及び pRS434TEF が、(ii) pRS435Tcyc2μOri から pRS435GAP が、(iii) pRS444Tcyc2μOri から pRS444GAP 及び pRS444TEF が、(iv) pRS445Tcyc2μOri から pRS445GAP が、それぞれ得られた（図 7 A～F）。

本発明で作製した発現ベクターを整理すると表 5 の様になる。

表 5

ベクター	タイプ	マーカー及び方向*		プロモーター、ターミネーター及び方向*			ori及び方向*	
pRS414PTadh	YCp	TRP1	+	ADH1	ADH1	+	ARS4 & CEN6	+
pRS414TPadh	YCp	TRP1	+	ADH1	ADH1	−	ARS4 & CEN6	+
pRS434GAP	YEp	TRP1	+	TDH3	CYC1	−	2 μ	+
pRS434TEF	YEp	TRP1	+	TEF2	CYC1	−	2 μ	+
pRS435GAP	YEp	LEU2	+	TDH3	CYC1	−	2 μ	+
pRS444GAP	YEp	TRP1	+	TDH3	CYC1	−	2 μ	−
pRS444TEF	YEp	TRP1	+	TEF2	CYC1	−	2 μ	−
pRS445GAP	YEp	LEU2	+	TDH3	CYC1	−	2 μ	−

* マーカー及び遺伝子発現用転写単位の+及び-方向は、それぞれ下流、上流を示す。oriの + 及び - は、YCpベクターは pRSと、YEpベクターはpYES ベクターと、それぞれ同じ、異なる方向であることを示す。

(8) YEp 型発現ベクターの酵母への導入

作製した YEp 型発現ベクターの DNA 複製領域が機能するかを調べるため、各 YEp 型発現ベクター約 40 ng を Frozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research, Orange, CA) を用いた方法で YPH499 へ導入し（手順はキット同封の説明書に従った）、SD-W 寒天プレート(DOB+CSM(-Trp), BIO101, Vista, CA) 上で 30℃で生育してくるコロニーを調べた。結果を表 6 に示す。

表 6

	GAP	TEF
pRS 434	>1000	>1000
435	>1000	−
444	>1000	>1000
445	>1000	−

表 6 の結果より、本発明で作製した各 YEp 型ベクターは、プラスミドとして正常に保持されることがわかった。

〔実施例 2〕 メバロン酸経路関連酵素遺伝子のクローニング

酵母 cDNA からの遺伝子クローニングの際には、Clontech 社 (Palo Alto, CA) より購入した *S. cerevisiae*DBY746 由来の cDNA ライブラリ “Quick-Clone c DNA” を用いた。

(1)ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子のクローニング

(1-1) *Saccharomyces cerevisiae* 由来の FPP 合成酵素遺伝子 *ERG20* :

PCR(polymerase chain reaction)法で *S. cerevisiae* FPP 合成酵素遺伝子 *ERG20* 約 0.9 kbp 断片（配列番号 1）を、cDNA を鋳型にして増幅した。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (SCFPS1):5'-ATG GCT TCA GAA AAA GAA ATT AG-3' (配列番号 46)

Primer 2 (SCFPS 2):5'-CTA TTT GCT TCT CTT GTA AAC TT-3'(配列番号 47)

10x ExTaq バッファー (宝酒造)	5 μl
2.5 mM dNTPmix	4 μl
5 u/μl ExTaq (宝酒造)	1 μl
10 pmol Primer 1	
10 pmol Primer 2	

計 50 μl にする

上記反応溶液を用い、94℃ 45 秒、55℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクル行った。なお、後述の PCR は、特別な記載がない限り上記と同様の条件で行った。

PCR 断片をアガロースゲル電気泳動で精製後、pT7Blue-T (Novagen, Madison, WI)へ T/A ライゲーションによりクローニングした。*ERG20* は pT7Blue-T 内の *lacZ* と同じ向きに挿入されていた（図８）。クローニングした断片の塩基配列決定を行い SGD (Saccharomyces Genome Database, http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/) の配列と比較したところ、1-300 塩基と 610-1059 塩基の部分での PCR エラーは無かった。

作成したプラスミド DNA を pT7ERG20 とした。

(1-2) *Escherichia coli* 由来の FPP 合成酵素遺伝子 *ispA*：

大腸菌ゲノム DNA を鋳型にし、以下の合成オリゴ DNA をプライマーに用いて PCR により *E. coli* 由来の FPP 合成酵素遺伝子 *ispA*（配列番号３）のクローニングを行った。

ISPA1:5'-TGA GGC ATG CAA TTT CCG CAG CAA CTC G-3'(配列番号 48)

ISPA2:5'-TC AGA ATT CAT CAG GGG CCT ATT AAT AC-3'(配列番号 49)

1x ExTaq バッファー、0.5 mM dNTP、100 pmol ISPA1、100 pmol ISPA2、0.2 μg *E. coli* ゲノム DNA、5 u ExTaq を含んだ 100 μl の反応溶液で、94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 1.5 分を 30 サイクル繰り返すことで PCR を行った。PCR 産物は *Eco*RI と *Sph*I で切断後、アガロースゲル電気泳動で 1.0 kbp の DNA 断片を精製し、pALTER-Ex2 (Promega) の *Eco*RI-*Sph*I 部位に挿入し、*E. coli* JM109 へ導入し遺伝子クローニングを行った。*Eco*RI、*Sph*I、*Nde*I、*Sma*I、*Bam*HI を用いた制限酵素マッピングにより正しく *ispA* 遺伝子が導入されたプラスミド pALispA4、pALispA8、pALispA15、pALispA16 及び pALispA18 が得られた。

(1-3) *Bacillus stearothermophilus* 由来の FPP 合成酵素遺伝子

特開平 5-219961 記載の pFE15 を *Not*I と *Sma*I で切断後、2.9kbp の転写単位を含んだ FPP 合成酵素遺伝子断片を精製した。これを、pACYC177(日本ジーン)の *Sca*I 部位に挿入し、*B. stearothermophilus* 由来の FPP 合成酵素遺伝子 *fps*（配列番号 25）を含む発現ベクターを作製した。

(2)ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子のクローニング

S. cerevisiae の GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1*（配列番号５）のクローニングは、以下のように行った。

GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html)にある *S. cerevisiae* 由来GGPP合成酵素遺伝子(A.N.U31632)(Y. Jiang, *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (37), 21793-21799 (1995))の情報をもとに、該遺伝子によりコードされるタンパク質の N 末端、C 末端にマッチするプライマーを作製し、これを用いて酵母の cDNA ライブラリー（Clontech No.CL7220-1）を鋳型とした PCR を行った。

N 末端側プライマー：5'-ATG GAG GCC AAG ATA GAT GAG CT-3' (配列番号 50)

C 末端側プライマー:5'-TCA CAA TTC GGA TAA GTG GTC TA-3' (配列番号 51)

PCR は、Perfect Match ポリメラーゼエンハンサー(Stratagene)を使用し、94℃ 45 秒の変性、55℃ 1 分のアニーリング及び 72℃ 2 分の伸長を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル行った。

目的の断片（約 1.0kbp）が確認されたので、*BTS1* 断片を TA クローニング可能な pT7Blue T ベクターにクローニングし、*BTS1* の全領域の塩基配列を決定した。その結果、GenBank の配列と完全に一致し(配列番号 5)、*S. cerevisiae* 由来の遺伝子であることを確認した。

(3)アセチル補酵素 A アセチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

ExTaq DNA ポリメラーゼ を用いて PCR 法で *S. cerevisiae* アセチル補酵素 A アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 *ERG10*（配列番号 26）の約 1.2 kbp ゲノム DNA 断片を鋳型にして増幅し、pRS435GAP、pRS445GAP の *Sac*II-*Xba*I 部位へクローニングした。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (SacII-ERG10) : 5'-TCC CCG CGG ATG TCT CAG AAC GTT TAC ATT GT-3'（配列番号 52）

Primer 2 (XbaI-ERG10): 5'-TGC TCT AGA TCA TAT CTT TTC AAT GA C AAT GGA-3'（配列番号 53）

(下線部分は制限酵素認識部位)

PCR は、Perfect Match ポリメラーゼエンハンサー共存下で 95℃ 45 秒、60℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクル行った。作成したプラスミドは *Sma*I、*Sac*I、*Nco*I、*Bam*HI 認識部位マッピングにより計画通りに作製できたかをチェックし、それぞれ pRS435GAP-ERG10、pRS445GAP-ERG10 とした。

(4) HMG-CoA 合成酵素遺伝子のクローニング

PCR 法で *S. cerevisiae* HMG-CoA 合成酵素遺伝子 *HMGS* 約 1.5 kbp 断片(配列番号 27) を、cDNA を鋳型にして増幅した。ただし、アニーリング温度は 50℃ で行った。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (HMGS-1-2): 5'-ATG AAA CTC TCA ACT AAA CTT TGT T-3' (配列番号 54)

Primer 2 (scHMGS-15): 5'-GTT CAG CAA GAT GCA ATC GAT GGG G-3' (配列番号 55)

PCR 断片をアガロースゲル電気泳動で精製後、pT7Blue-T へ T/A ライゲーションによりクローニングした。*HMGS* は pT7Blue の *lacZ* と反対向きに挿入されていた (図 8)。クローニングした断片の塩基配列決定を行い SGD の配列と比較したところ、開始コドン ATG の A を第 1 塩基としたときの第 39 番目の A が G に PCR エラーを起こしていた (A39G ; 他の PCR エラーについても以下同様に表示する。)。

その他、T144C、T223C、T1038C、C1122T、A1370G の 5 箇所にエラーが見つかった。これら PCR エラーのうち T223C と A1370G はコードしているアミノ酸のエラーも起こし、T223C は第 75 残基目の Ser が Pro にエラー (S75P、以下同様に記載) を起こし、A1370G は K457R のアミノ酸配列エラーを起こしていた。

作成したプラスミドを pT7HMGS とした。

(5) HMG-CoA 還元酵素遺伝子のクローニング

S. cerevisiae HMG-CoA 還元酵素遺伝子 *HMG1* のクローニングは、以下のように行った。

GenBank にある *S. cerevisiae* 由来 HMG-CoA 還元酵素遺伝子 *HMG1* (A.N. M22002)(M. E. Basson, *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8, 3797-3808 (1988):配列番号 7)の情報をもとに N 末端、C 末端にマッチするプライマーを作製し、これを用いて酵母の cDNA ライブラリー（Clontech）を鋳型とした PCR を行った。

N 末端側プライマー：5'-ATG CCG CCG CTA TTC AAG GGA CT-3' (配列番号 56)

C 末端側プライマー：5'-TTA GGA TTT AAT GCA GGT GAC GG-3' (配列番号 57)

PCR は、Perfect Match ポリメラーゼエンハンサーを使用し、94℃ 45 秒の変性、55℃ 1 分のアニーリング及び 72℃ 2 分の伸長を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル行った。

目的の断片(3.2kbp)が確認されたので、*HMG1* を TA クローニング可能な pT7 Blue T ベクターにクローニングし(これを pT7-HMG1 とした)、*HMG1* の塩基配列を決定した。その結果、配列番号 9 の塩基配列及び配列番号 10 のアミノ酸配列を確認した。決定された塩基配列は、GenBank の配列に示した塩基配列と一部異なっており、PCR エラーを起こしていた（図 2 A)。この PCR エラーを含んだ変異型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子を *HMG1'* とする。

(6) HMG-CoA 還元酵素遺伝子の PCR エラーの修正

PCR エラーは、pT7HMG1 から *HMG1* 遺伝子断片をサブクローニングし、*HMG1* 部分の PCR エラーによるアミノ酸置換変異部分を修正した。

HMG-CoA 還元酵素遺伝子 *HMG1* の PCR エラー型 DNA である HMG1'を有する pT7HMG1 から *HMG1'* 遺伝子断片をサブクローニングし、*HMG1* 部分の PCR エラーによるアミノ酸置換変異部分を、部位特異的変異誘発法により修正し、pALHMG106 を作製した。作製方法の詳細は以下の通りである。

プラスミド pT7HMG1 をクローン化 *HMG1* として用いた。また、部位特異的変異導入用ベクターとして pALTER-1 を購入した(Promega)。

部位特異的変異(site-directed mutagenesis)は、Promega 発行の"Protocols and application guide, third edition, 1996 Promega, ISBN 1-882274-57-1" に記載の方法で行った。変異導入用オリゴは、次の 3 種類を化学合成した。

HMG1(190-216) 5'-CCAAATAAAGACTCCAACACTCTATTT-3'（配列番号 58）

HMG1(1807-1833) 5'-GAATTAGAAGCATTATTAAGTAGTGGA-3'（配列番号 59）

HMG1(2713-2739) 5'-GGATTTAACGCACATGCAGCTAATTTA-3'（配列番号 60）

部位特異的変異導入は、pT7HMG1 を *Sma*I、*Apa*LI、*Sal*I で切断し、3.2kbp の *HMG1* 断片をアガロースゲル電気泳動で調製した。これを pALTER-1 の *Sma* I-*Sal*I 部位に挿入し、pALHMG1 を作製した。pALHMG1 をアルカリ変性後、上記変異導入オリゴ、リペアオリゴとして Amp repair oligo(Promega)、ノックアウトオリゴとして Tet knockout oligo(Promega)をアニーリングさせ、*E. coli* ES1301(Promega)に導入後、125 μg/ml アンピシリンで部位特異的変異が導入されたプラスミドを保持する形質転換体を集積培養し、プラスミド DNA を調製した。以下の配列を有するプライマーを用いて塩基配列をチェックしたところ、HMG1(190-216)、 HMG1(1807-1833)、 HMG1(2713-2739)に相当する配列は全てこれらオリゴヌクレオチドの配列に修正されていた（配列番号 11)。なお、修正された配列によりコードされるアミノ酸配列（配列番号 12）は、*HMG1*'によりコードされるアミノ酸配列（配列番号 10）と一致していた（サイレント変異)。

HMG1(558-532) 5'-GTCTGCTTGGGTTACATTTTCTGAAAA-3'（配列番号 61）

HMG1(1573-1599) 5'-CATACCAGTTATACTGCAGACCAATTG-3'（配列番号 62）

HMG1(2458-2484) 5'-GAATACTCATTAAAGCAAATGGTAGAA-3'（配列番号 63）

この *HMG1* 内の配列が修正されたプラスミドを pALHMG106 とした（図 9)。

(7) メバロン酸キナーゼ遺伝子のクローニング

PCR 法で *S. cerevisiae* メバロン酸キナーゼ遺伝子 *ERG12* 約 1.3 kbp 断片（配列番号 28）を cDNA を鋳型にして増幅した。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (ATM-1):5'-AAC TGC AGA TGT CAT TAC CGT TCT TAA CT T C-3'（配列番号 64）

Primer 2 (ATM-2):5'-CCG AGC TCT TAT GAA GTC CAT GGT AAA TT C G-3'（配列番号 65）

(下線部分は制限酵素認識部位)

PCR 断片を *Pst*I と *Sac*I で切断後、アガロースゲル電気泳動で精製し、pT7Bl ue の *Pst*I-*Sac*I 部位にクローニングした。これで、*ERG12* は pT7Blue の *lacZ* と反対向きに挿入されることになる（図８）。クローニングした断片の塩基配列決定を行い SGD の配列と比較したところ、PCR エラーは無かった。

作成したプラスミド DNA を pT7ERG12 とした。

(8) メバロン酸リン酸キナーゼ遺伝子のクローニング

PCR 法で *S. cerevisiae ERG8* 遺伝子約 1.3 kbp 断片（配列番号 29）を cDN A を鋳型にして増幅した。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (YSCE-1):5'-AAC TGC AGA TGT CAT TAC CGT TCT TAA C TT C-3'（配列番号 66）

Primer 2 (YSCE -2):5'-CCG AGC TCT TAT GAA GTC CAT GGT AAA T TC G-3'（配列番号 67）

PCR 断片をアガロースゲル電気泳動で精製後、pT7Blue-T へ T/A ライゲーションによりクローニングした。*ERG8* は pT7Blue の *lacZ* と反対向きに挿入されていた （図８）。クローニングした断片の塩基配列決定を行い SGD の配列と比較したところ、A70C、A72G、G146A、C171G、G224C、A306G、T387C、G5 74T、C637G、G638C、G729A、G739A、T759A、A879G、A1222G の PCR エラーを起こしていた。これら PCR エラーのうち A70C と A72G はアミノ酸のエラーの T24P を起こし、G146A は G49E、G224C は S75T、G574T は A192S、C 637G と G638C は R213A、G739A は D247N、A1222G は T408A の各アミノ酸のエラーを起こしていた。

作成したプラスミド DNA を pT7ERG8 とした。

(9) メバロン酸二リン酸脱炭酸酵素遺伝子のクローニング

PCR 法で *S. cerevisiae* メバロン酸二リン酸脱炭酸酵素遺伝子 *ERG19*(*MVD1*) 約 1.2 kbp 断片(配列番号 30)を cDNA を鋳型に増幅した。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (SCU-1):5'-AAC TGC AGA TGA CCG TTT ACA CAG CAT CC G T-3'（配列番号 68）

Primer 2 (SCU-2):5'-CGG AAT TCT TAT TCC TTT GGT AGA CCA GT C T-3'（配列番号 69）

(下線部分は制限酵素認識部位)

PCR 断片を *Pst*I と *Eco*RI で切断後アガロースゲル電気泳動で精製し、pT7Bl ue の *Pst*I-*Eco*RI 部位にクローニングした。これで、*ERG19*(*MVD1*)は pT7Blue の *lacZ* と反対向きに挿入されることになる（図 8）。クローニングした断片の塩基配列決定を行い SGD の配列と比較したところ、PCR エラーは無かった。

作成したプラスミド DNA を pT7ERG19 とした。

(10) イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子のクローニング

(10-1) *S. cerevisiae* 由来の IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子 *IDI1*

PCR 法で *S. cerevisiae IDI1* 遺伝子約 0.9 kbp 断片(配列番号 31)を cDNA を鋳型に増幅した。PCR プライマーは、Primer 1 (SCIPP-1)及び Primer 2 (SCI PP -2)を用いた。

Primer 1 (SCIPP-1) : 5'-ATG ACT GCC GAC AAC AAT AGT AT-3'（配列番号 70）

Primer 2 (SCIPP-2) : 5'-TTA TAG CAT TCT ATG AAT TTG CC-3'（配列番号 71）

PCR 断片をアガロースゲル電気泳動で精製後 pT7Blue-T へ T/A ライゲーションによりクローニングした。*IDI1* は pT7Blue-T 内の *lacZ* と反対向きに挿入されていた（図 8）。クローニングした断片の塩基配列決定を行い SGD の配列と比較したところ、PCR エラーは無かった。

作成したプラスミド DNA を pT7IDI1 とした。

(10-2) *E. coli* 由来の IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子 *idi*

E. coli の ORF182(IPPΔ-イソメラーゼ相同なポリペプチドをコードすると予想されるオープンリーディングフレーム;遺伝子名 *idi*) を含むゲノム DNA がクローニングされているプラスミド p3-47-13(Hemmi *et al.* (1998) J. Biochem. 123, 1088-1096)を鋳型にして、PCR 法で約 0.55 kbp の ORF182 断片を増幅した。PCR は、Perfect Match ポリメラーゼエンハンサー共存下で 95℃ 45 秒、60℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクル行った。PCR プライマーは以下の通りである。

Primer 1 (SacII-ORF182(1-23)):5'-TCC CCG CGG ATG CAA ACG GAA CAC GTC ATT TT-3' (配列番号 72)

Primer 2 (XbaI-ORF182(549-525)) :5'-TGC TCT AGA TTA TTT AAG CTG GGT AAA TGC AGA-3' (配列番号 73)

(下線部分は制限酵素認識部位)

PCR 産物を *Spe*I、*Dra*III、*Alu*I で切断後、アガロースゲル電気泳動により切断したところ図 10 に示したような EcoGene (http://bmb.med.miami.edu/EcoGene/EcoWeb/) http://bmb.med.miami.edu/EcoGene/EcoWeb/)の ORF182 断片(*idi*)の塩基配列データ (配列番号 32) に即した物理地図が得られた。そこで、増幅した 0.55 kbp の PCR 断片を *Sac*II と *Xba*I で切断後、アガロースゲル電気泳動で精製し、pRS435GAP、pRS445GAP の *Sac*II-*Xba*I 部位へクローニングした。作成したプラスミドはそれぞれ pRS435GAP-ORF182、pRS445GAP-ORF182 とした。

大腸菌 IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子 (配列番号 32) は、以前の命名では ORF182 (NCBI BLAST サーチによる ; GenBank アクセッション番号 AE000372) としていたが、Hahn *et al.* (1999) J. Bacteriol., 181, 4499-4504 により *idi* と名付けられている。*idi* をクローニングしたプラスミドとしては、Hemmi *et al.* (1998) J. Biochem., 123, 1088-1096 記載の p3-47-11 と p3-47-13 を用いた。

〔実施例 3〕 変異型遺伝子のクローニング

(1) *Escherichia coli* FPP 合成酵素遺伝子の GGPP 合成酵素遺伝子への変換 (変異型 FPP 合成酵素遺伝子のクローニング)

実施例 2(1-2)で得られた pALispA4、pALispA8、 pALispA15、pALispA16、pALispA18 を用いて、Promega 発行の "Protocols and applications guide, t

hird edition, 1996 Promega, ISBN 1-882274-57-1"に 記載のプロトコルに従って、*E. coli ispA* にコードされるポリペプチドの 79 番目のアミノ酸残基 Tyr をコードしているコドンを置換変異により改変した。以下の変異導入用オリゴヌクレオチド（変異オリゴともいう）は、化学合成法により調製した。

ISPA-D: 5'-ATC ATG AAT TAA TGA GTC AGC GTG GAT GCA TTC A AC GGC GGC AGC-3'（配列番号 74）

ISPA-E: 5'-ATC ATG AAT TAA TGA TTC AGC GTG GAT GCA TTC AA C GGC GGC AGC-3'（配列番号 75）

ISPA-M:5'-ATC ATG AAT TAA TGA CAT AGC GTG GAT GCA TTC AAC GGC GGC AGC-3'（配列番号 76）

上記変異オリゴ ISPA-M は、第 16 番目～第 18 番目の塩基（3 塩基を下線で示した部分）が野性型 FPP 合成酵素のアミノ酸配列の 79 番目の Tyr をコードしているコドンであるため、Met をコードするように設計したものである。同様にして、変異オリゴ ISPA-D、変異オリゴ ISPA-E は、それぞれ Asp、Glu をコードするように設計したものである。上記変異オリゴにおいて、第 26 番目～第 31 番目の塩基（6 塩基を下線で示した部分）は、置換変異導入より新たに *Eco*T22I (*NsiI*) 部位ができるように設計し、変異遺伝子が制限酵素マッピングにより容易に区別できるように計画した配列である。変異オリゴは、あらかじめ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Promega)により 5'末端をリン酸化し、Nick Culumn (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いてゲル濾過精製してある。変異導入の際にはリペアオリゴとして Cm repair oligo (Promega)を、ノックアウトオリゴとして Tet knockout oligo (Promega)を用いた。アルカリ変性させた pALispA16 に Cm repair oligo、Tet knockout oligo、変異オリゴをアニールさせ *E. coli* ES1301 *mutS* (Promega)へ形質転換した。20 μg/ml の Cm (クロラムフェニコール) 共存下で生育してきた大腸菌からプラスミド DNA を調製し、*E. coli* JM109 へ形質転換し、20 μg/ml Cm 寒天プレート上で生育してきたコロニーからプラスミド DNA を調製した。pALispA4 を鋳型にし、ISPA-D、ISPA-E、ISPA-M を変異オリゴに用いて作製した置換変異型 *ispA*(これを *ispA*m という)を含むプラスミドを、それぞれ p4D、p4E、p4M とした。同様に、pALispA8 を鋳型にして作製したプラスミドをそれぞれ p8D、p8E、p8M とし、pALispA15 を

鋳型にして作製したプラスミドをそれぞれ p15D、p15E、p15M とし、pALispA 16 を鋳型にして作製したプラスミドをそれぞれ p16D、p16E、p16M とし、pAL ispA18 を鋳型にして作製したプラスミドをそれぞれ p18D、p18E、p18M とした。

Y79D 変異型アミノ酸配列（配列番号 34）をコードする遺伝子を配列番号 33 に、Y79E 変異型アミノ酸配列（配列番号 36）をコードする遺伝子を配列番号 3 5 に、Y79M 変異型アミノ酸配列（配列番号 38）をコードする遺伝子を配列番号 37 に示す。このようにして得られたプラスミドは、適宜選択して使用した。

(2) *Bacillus stearothermophilus* FPP 合成酵素遺伝子の変異型のクローニング

B. stearothermophilus 由来の FPP 合成酵素遺伝子(fps：配列番号 39)の置換変異体を含む発現ベクターは、Ohnuma *et al.* (1996) J. Biol. Chem., 271, 30748-30754 記載の pFPS(Y81M)から作製した。

pFPS は、pTV118N(宝酒造)の *lac* プロモーター下流に *fps* が組み込まれており、*B. stearothermophilus* 由来 FPP 合成酵素遺伝子を IPTG により *E.coli* 内で発現する発現プラスミドである。まず。この FPP 合成酵素遺伝子に部位特異的変異導入により Y81M 変異、すなわち、FPP 合成酵素遺伝子によりコードされるアミノ酸配列のうち第 81 番目の Tyr が Met となるように置換する変異を施した(pFPS(Y81M)とする)。pFPS(Y81M)は、Y81M 置換変異導入によりコードしている酵素の反応産物特異性が変化し、比活性の低下なしに FPP 合成酵素遺伝子が GGPP 合成酵素遺伝子に改変されたものである。次に、pFPS(Y81M)を *Psh*BI で切断し、Klenow 酵素で平滑末端にした後、転写単位を含む 2.7kbp 断片を精製し、pACYC177 の Amp^r 遺伝子内の *Hin*cII 部位に挿入した。Amp^r 遺伝子と同じ向きに *fps* 変異型遺伝子断片が挿入されたプラスミドを pFPS21m とし、その逆向きに挿入されたプラスミドを pFPS31m とした（図 11)。

(3) 欠失型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子のクローニング

恒常発現型プロモーター*ADH1*p を含むベクターpRS414PTadh、pRS414TPadh を制限酵素で処理して *HMG1* を挿入し、プラスミド pRS414PTadh-HMG1 及び pRS414TPadh-HMG1 を作製した。

実施例 2(5) で作製した pT7-HMG1 を *Bam*HI、*Sal*I、*Sca*I 処理して PCR エラー配列を有する *HMG1*'遺伝子を取り出し、これを pYES2(Invitrogen, Carlsbad, CA)の *Bam*HI-*Xho*I 部位に導入した。得られた組換えベクターを pYES-HMG1 とした。ベクター内の塩基配列を確認したところ、配列番号 3 の塩基配列であることを確認した。なお、pYES2 は、複製起点として酵母 2 μmDNA の ori、及びガラクトースで誘導可能な *GAL1* プロモーターをもつ酵母発現用シャトルベクターである（図 4)。

HMG-CoA 還元酵素の膜貫通ドメインに対応する領域を欠損させた欠失型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子発現ベクターを作製するため、前記の通り作製した pYES-HMG1 を鋳型として、PCR 法でベクター部分とともに *HMG1* コード領域の一部分を欠失させた断片を調製した。得られた断片を Klenow 酵素で平滑末端にした後、セルフライゲーションにより再び環化し、*E. coli* JM109 へ形質転換させ、プラスミド DNA を調製した。プライマーとして使用した合成 DNA 配列とその組合せを前記表 1 に示した。

得られたプラスミド DNA 内の *HMG1* 上流、下流のアミノ酸の読み枠がずれていないことと、その結合部位近辺に PCR エラーによるアミノ酸置換が起きていないことを 373A DNA sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA) で確認した。その結果、結合部位近辺に PCR エラーによるアミノ酸置換がなく、読み枠がずれずに遺伝子を欠失する事のできた以下のプラスミドを得た。欠失型 *HMG1* 遺伝子は、欠失のパターンに従って Δ02y(y は任意の作業番号を表す。)のように記載し、Δ02y を含む pYES2 ベクターを例えば pYHMG026 と記すこととする(他の欠失体も同様)。

*HMG1*Δ026：配列番号 13

*HMG1*Δ044：配列番号 14

*HMG1*Δ056：配列番号 15

*HMG1*Δ062：配列番号 16

*HMG1*Δ076：配列番号 17

*HMG1*Δ081：配列番号 18

*HMG1*Δ100：配列番号 19

*HMG1*Δ112：配列番号 20

*HMG1*Δ122：配列番号 21

*HMG1*Δ133：配列番号 22

プラスミド：pYHMG026, pYHMG027, pYHMG044, pYHMG045, pYHMG059, pYHMG062, pYHMG063, pYHMG065, pYHMG076, pYHMG081, pYHMG083, pYHMG085, pYHMG094, pYHMG100, pYHMG106, pYHMG107, pYHMG108, pYHMG109, pYHMG112, pYHMG122, pYHMG123, pYHMG125, pYHMG133, pYHMG134

〔実施例 4〕 遺伝子のベクターへのサブクローニング

今回使用した恒常発現型転写プロモーターをもつ *E. coli- S. cerevisiae* YEp 型シャトルベクターである pRS ベクターは、実施例 1 において作製したものを使用した。

(1) FPP 合成酵素遺伝子のサブクローニング

(1-1) *S. cereviae* 由来の FPP 合成酵素遺伝子 *ERG20*：

実施例 2(1-1)に記載の pT7ERG20 を *Xba*I と *Bam*HI で切断し、アガロースゲル電気泳動により 1.1 kbp の *ERG20* 遺伝子断片を精製した。これを、pRS435GAP と pRS445GAP の *Xba*I-*Bam*HI 部位に挿入し、それぞれ pRS435GAP-ERG20、pRS445GAP-ERG20 とした。

(1-2) *E. coli* 由来の FPP 合成酵素遺伝子 *ispA*：

実施例 2(1-2)に記載の pALispA4 を *Sph*I と *Eco*RI で切断し、アガロースゲル電気泳動により 1.0 kbp の *ispA* 遺伝子断片を精製した。この断片に *Sph*I-*Sac*II リンカーDNA (5'-pTTT CCG CGG AAA CAT G-3'（配列番号 86）) と *Eco*RI-*Eco*52I リンカーDNA (5'-pAAT TGA CGG CCG TC -3'（配列番号 87）)をライゲーションしたのち *Sac*II と *Eco*52I で切断した。この *Sac*II-*Eco*52I 1.0kbp 断片を、pRS435GAP と pRS445GAP の *Sac*II-*Eco*52I 部位に挿入しサブクローン化した。サブクローン化したプラスミドは、*Sac*I、*Sac*II、*Nde*I、*Nsi*I (*Eco*T22 I)、*Aor*51HI、*Xba*I、*Sma*I、*Bam*HI、*Pst*I、*Nde*I、*Pvu*II、*Eco*T14I の各制限酵素の認識部位をマッピングし、計画通りに作製できたものを選抜した。選抜したプラスミドは、それぞれ pRS435GAP-ispA、pRS445GAP-ispA とした。

(1-3) *B. stearothermophilus* 由来の FPP 合成酵素遺伝子

B. stearothermophilus 由来の FPP 合成酵素遺伝子は、ゲノム PCR 断片から直接ベクターへクローニングした。

(2) GGPP 合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子のサブクローニング

(2-1) *S. cereviae* 由来の GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1*：

実施例 2(2)に記載の pT7Blue T ベクターを *Bam*HI、*Sal*I 処理して *BTS1* 断片を取り出し、これを、pYES2(Invitrogen 社)の *Bam*HI、*Xho*I サイトに導入した。得られた組換えベクターを pYESGGPS とした。

pYESGGPS を *Bam*HI と *Mlu*I で切断し、アガロースゲル電気泳動により 1.3 kbp 断片を精製した。これを、pRS435GAP と pRS445GAP の *Bam*HI-*Mlu*I 部位に挿入し、それぞれ pRS435GAP-BTS1、pRS445GAP-BTS1 とした。

(2-2)*E. coli* 由来の GGPP 合成酵素遺伝子(置換変異型 FPP 合成酵素遺伝子)*ispA*m：

実施例 3(1)に記載の p16M を *Sph*I と *Eco*RI で切断し、アガロースゲル電気泳動により 1.0 kbp の *ispA*m 遺伝子断片を精製した。この断片に本実施例(1-2)に記載の *Sph*I-*Sac*II リンカーDNA と *Eco*RI-*Eco*52I リンカーDNA をライゲーションしたのち *Sac*II と *Eco*52I で切断した。この *Sac*II-*Eco*52I 1.0kbp 断片を、pRS435GAP と pRS445GAP の *Sac*II-*Eco*52I 部位に挿入しサブクローン化した。サブクローン化したプラスミドは、*Sac*I、*Sac*II、*Nde*I、*Nsi*I (*Eco*T22I)、*Aor*51HI、*Xba*I、*Sma*I、*Bam*HI、*Pst*I、*Pvu*II、*Eco*T14I の各制限酵素の認識部位をマッピングし計画通りに作製できたものを選抜した。このうち *Nsi*I (*Eco*T22I) 認識部位は、*ispA* を置換変異した際に新たに導入した部位であり、これで切断できれば *ispA* 変異型遺伝子 *ispA*m であることが確認できる。選抜したプラスミドは、それぞれ pRS435GAP-ispAm、pRS445GAP-ispAm とした。

(3) アセチル補酵素 A アセチル転移酵素遺伝子のサブクローニング

アセチル補酵素 A アセチル転移酵素遺伝子 *ERG10* は、ゲノム PCR 断片から直接 pRS ベクターへクローニングした。

(4) HMG-CoA 合成酵素遺伝子のサブクローニング

実施例 2(4)に記載の pT7HMGS から *Bam*HI-*Sal*I 1.5 kbp の *HMGS* 遺伝子断片を調製し、これを pRS435GAP、pRS445GAP の *Bam*HI-*Sal*I 部位に挿入した。*HMGS* をサブクローン化したプラスミドは、*Kpn*I 認識部位マッピングにより計画通りに作製できたものを選抜した。選抜したプラスミドは、それぞれ、pRS435GAP-HMGS、pRS445GAP-HMGS とした。

(5) HMG-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子のサブクローニング

実施例 2(5)に記載の pT7Blue T ベクターを *Bam*HI、*Sal*I、*Sca*I 処理して PCR エラーによる変異型 HMG-CoA 還元酵素をコードする遺伝子 *HMG1'* を取り出し、これを pYES2(Invitrogen 社)の *Bam*HI-*Xho*I サイトに導入した。得られた組換えベクターを pYES-HMG1 とした。

恒常発現型プロモーター *ADH1*p を含むベクター pRS414PTadh、pRS414TPadh を制限酵素 *Sma*I と *Sal*I で処理し、これに *HMG1* 遺伝子を挿入してプラスミド pRS414PTadh-HMG1 及び pRS414TPadh-HMG1 を作製した。

また、実施例 2(6)に記載の pALHMG106 （図 9）を *Sma*I と *Sal*I で切断後、アガロースゲル電気泳動で 3.2 kbp の PCR エラー修正後の *HMG1* 遺伝子断片を精製した。これを pRS434GAP、pRS444GAP、pRS434TEF、pRS444TEF、pRS434PGK 及び pRS444PGK の *Sma*I-*Sal*I 部位へ挿入した。*HMG1* をサブクローン化したプラスミドは、*Xho*I、*Spe*I、*Nae*I 及び *Sph*I の各制限酵素マッピングと、挿入された 3.2 kbp *HMG1* 遺伝子断片のボーダー領域の塩基配列確認とにより物理地図をチェックし、計画通りに作製できたプラスミドを選抜した。選抜したプラスミドはそれぞれ、pRS434GAP-HMG1、pRS444GAP-HMG1、pRS434TE-HMG1、pRS444TEF-HMG1、pRS434PGK-HMG1、pRS444PGK-HMG1 とした。

HMG-CoA 還元酵素遺伝子の欠失変異型遺伝子は、実施例 3 記載の対応する pYES2 由来の欠失変異型 *HMG1* を組込んであるプラスミドから上記と同様にして pRS434GAP へクローニングした。

(6) メバロン酸キナーゼ遺伝子のサブクローニング

実施例 2(7)に記載の pT7ERG12 から *Sma*I-*Sal*I 1.3 kbp の *ERG12* 遺伝子断片を調製し、 pRS435GAP、pRS445GAP の *Sma*I-*Sal*I 部位に挿入した。*ERG12* をサブクローン化したプラスミドは、*Kpn*I 認識部位マッピングにより計画通りに作製できたものを選抜した。選抜したプラスミドは、それぞれ、pRS435GAP-ERG12、pRS445GAP-ERG12 とした。

(7) メバロン酸リン酸キナーゼ遺伝子のサブクローニング

実施例 2(8)に記載の pT7ERG8 から *Bam*HI-*Sal*I 1.3 kbp の *ERG8* 遺伝子断片を調製し、pRS435GAP、pRS445GAP の *Sma*HI-*Sal*I 部位に挿入した。*ERG8* をサブクローン化したプラスミドは、*Xba*I 認識部位マッピングにより計画通りに作製できたものを選抜した。選抜したプラスミドは、それぞれ、pRS435GAP-ERG8、pRS445GAP-ERG8 とした。

(8) メバロン酸二リン酸脱炭酸酵素遺伝子のサブクローニング

実施例 2(9)に記載の pT7ERG19 を *Bam*HI、*Sal*I で切断後、アガロースゲル電気泳動により *Bam*HI-*Sal*I 1.5 kbp の *ERG19* 遺伝子断片を精製し、pRS435GAP と pRS445GAP の *Bam*HI-*Sal*I 部位に挿入した。*ERG19* をサブクローン化したプラスミドは *Xba*I 認識部位マッピングにより計画通りに作製できたプラスミドを選抜した。選抜したプラスミドは、それぞれ pRS435GAP-ERG19、pRS445GAP-ERG19 とした。

(9) イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子のサブクローニング

(9-1) *S. cerevisiae* 由来の IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子 *IDI1*：

実施例 2(10-1)に記載の pT7IDI1 から *Bam*HI-*Sal*I 0.9 kbp 断片を調製し、pRS435GAP、pRS445GAP の *Bam*HI-*Sal*I 部位に挿入した。サブクローン化したプラスミドは、*Nco*I と *Bam*HI 認識部位マッピングにより計画通りに作製できたものを選抜した。選抜したプラスミドはそれぞれ、pRS435GAP-IDI1、pRS445GAP- IDI1 とした。

(9-2) *E. coli* 由来の IPPΔ-イソメラーゼ遺伝子 ORF182(*idi*)：

実施例 2(10-2)に記載のようにして、ORF182(*idi*)はゲノム PCR 断片から直接 pRS ベクターへクローニングした。

〔実施例 5〕 AURGG101、AURGG102 及び AURGG703 の作製

実施例 4(2-1)に記載の pYESGGPS を鋳型にして、プライマーPYES2(1-27)と PYES2(861-835)を用いて PCR 法により、*GAL1* プロモーター=*BTS1*=*CYC1* ターミネーターの一次構造(*GAL1*p-*BTS1*-*CYC1*t)を持つ 1.9kbp の SalI 断片を調製した。

PYES2(1-27):5'-GGC CGC AAA TTA AAG CCT TCG AGC GTC-3'(配列番号 88)

PYES2(861-835): 5'-ACG GAT TAG AAG CCG CCG AGC GGG TGA-3'(配列番号 89)

この断片を pAUR101(Takara)の *Sal*I 部位へ挿入し、pAURGG115 を得た。pAURGG115 内の *BTS1* 遺伝子に PCR エラーがないことは DNA シークエンシングにより確認した。

pAURGG115 を *Eco*O65I で線状化し、酢酸リチウム法で A451 株、YPH499 株へ導入し、1μg/ml オーレオバシジンを含む YPD 寒天プレート (1%酵母エキス, 2% ペプトン, 2% デキストロース, 2% 寒天) 上で 30℃で生育してくるコロニーを形質転換体とした。

得られた形質転換体は、もう一度オーレオバシジン選択プレート上でシングルコロニー選抜した。

その結果、A451 を宿主とした組換え体として AURGG101 及び AURGG102 の 2 クローンが得られた。また、YPH499 株を宿主とした組換え体として AURGG703 が得られた。なお、AURGG101 は、後述のサザンブロットハイブリダイゼーション（図 12）と PCR マッピング（図 13）で明らかになったように、*BTS1* 遺伝子はインテグレートされておらず、*AUR1* がマーカー遺伝子の *AUR1-C* に置き換わったものであることが分かっている。また、AURGG102 では上記 *GAL1* プロモーター=*BTS1*=*CYC1* ターミネーターが *AUR1* 遺伝子座にインテグレートされていることが分かっている。

〔実施例 6〕 各 EUG 株の作製

SGD から、スクアレン合成酵素遺伝子 *ERG9* 付近の遺伝子地図を引き出し、*ERG9*転写プロモーター (*ERG9*p) 置換用 DNA 断片増幅のための PCR プライマーDNA を設計した。形質転換体選択マーカー遺伝子 *URA3* と転写プロモーター *GAL1*p を含む 1.8 kbp の DNA 断片は、pYES2 を *Nae*I と *Nhe*I 切断後 Klenow 酵素で平滑末端化し、セルフライゲーションにより 2μ ori 部分を削除した pYES2Δを鋳型にして PCR 増幅することにより調製した。

PCR で使用したプライマーは以下の通りである。

E-MCSf : 5'- GCC GTT GAC AGA GGG TCC GAG CTC GGT ACC AAG -3'（配列番号 90）

E-URA3r : 5'- CAT ACT GAC CCA TTG TCA ATG GGT AAT AAC TGA T -3'（配列番号 91）

上記プライマーには、YHR189W の下流部分を含む 0.7 kbpDNA 断片と *ERG9* の上流部分を含む 0.9 kbp DNA 断片とで T/A ライゲーションできるように *Eam*1105I 認識部位（下線部分）を加えてある。YHR189W断片は、PCR プライマーYHR189Wf と YHR189Wr を用いて YPH499 ゲノム DNA を鋳型に PCR により調製し、*ERG9* 断片は、PCR プライマーERG9f と ERG9r を用いて YPH499 ゲノム DNA を鋳型に PCR により調製した。YPH499 ゲノム DNA は、「Gen とるくん」を用いて調製した。

YHR189Wf : 5'-TGT CCG GTA AAT GGA GAC-3'(配列番号 92)

YHR189Wr : 5'-TGT TCT CGC TGC TCG TTT-3'(配列番号 93)

ERG9f : 5'-ATG GGA AAG CTA TTA CAA T-3'(配列番号 94)

ERG9r : 5'-CAA GGT TGC AAT GGC CAT-3'(配列番号 95)

1.8 kbp DNA 断片を *Eam*1105I で消化後、0.7 kbpDNA 断片とライゲーションし、これを鋳型にしてプライマーYHR189Wf と E-MCSf を用いて 2nd PCR を行った。増幅した 2.5 kbp DNA 断片を *Eam*1105I で消化後、0.9 kbp DNA 断片とライゲーションし、これを鋳型にしてプライマーYHR189W-3f と ERG9-2r を用いて 3rd PCR を行った。増幅した 3.4 kbp DNA 断片を形質転換用 DNA 断片とした。

YHR189W-3f : 5'-CAA TGT AGG GCT ATA TAT G-3'(配列番号 96)

ERG9-2r：5'-AAC TTG GGG AAT GGC ACA-3'(配列番号 97)

Zymo Research (Orange, CA) より購入した Frozen EZ yeast transformation II kit を用いて酵母にベクターの導入を行った。組換え体は、SGR 培地をベースにし、CSM(-URA) (BIO 101 (Vista, CA) より購入) と終濃度 40 mg/l になるようにアデニン硫酸塩を加えた寒天培地（SGR(-URA)培地）上で 30℃で培養し、生育してきた菌体をもう一度同じ培地に広げ、培養しシングルコロニーアイソレーションを行った。

取得した組換え体は、EUG (*ERG9*p::*URA3-GAL1*p) 株と名付け、A451 由来のクローンを EUG1～10、YPH499 由来のクローンを EUG11～20、YPH500 由来のクローンを EUG21～30、W303-1A 由来のクローンを EUG31～50、W303-1B 由来のクローンを EUG51～70 とした。

SD 培地でグルコースレプレッションにより *ERG9* の発現が抑制され生育抑制のかかったクローンを選抜し、A451 から EUG5 及び EUG8 が、YPH499 から EUG12 が、YPH500 から EUG27 が得られた。

なお、EUG5、EUG8、EUG12、EUG27 から「Gene とるくん」を用いてゲノム DNA を調製し、これを鋳型にして PCR を行った結果、*URA3* と *GAL1*p を含む 1.8 kbp の PCR 断片がゲノム中の *ERG9* コード領域上流にインテグレートされていることを確認した。

〔実施例 7〕 遺伝子解析、酵素活性解析

本実施例では、作製した各種組換え酵母（各組換え体の作製については、後述するプレニルアルコール生産についての実施例 8～13 を参照）の遺伝子発現を、プレニル二リン酸合成酵素の酵素活性、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、サザンブロットハイブリダイゼーション、PCR マッピング、プレニルアルコール生産量測定の各種手法を用いて解析した。

(1) サザンブロッティング

酵母 DNA 精製キット「Gen とるくん」を用いて酵母 DNA の調製を行った。手順は、キット添付のプロトコルに従った。

酵母より調製した DNA は、*Nde*I および *Stu*I で切断後 1 レーンあたり 3 μg

を0.8%アガロースゲル電気泳動した。分子量マーカーは、Promega社 (Madison, WI) の 1 kb ラダーとλ/*Hind*IIIをそれぞれ0.5 μg使用した。泳動後、定法に従ってアルカリ変性、中和し、Hybond Nナイロンメンブレン (Amersham, Buckinghamshire, England) に 20 x SSC によるキャピラリーブロットで転写した。転写後、メンブレンはStratagene社のUV cross-linkerでoptimal cross-linkの条件で紫外線照射し、DNAをメンブレン上に固定した。

(2) ノーザンブロッティング

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., pp.13.12.2-13.12.3 記載の方法を一部改変してRNAを調製した。上記改変は、調製したRNAサンプルをさらにDNase Iで処理した点である。

フォルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動によりRNAを分離後、定法に従って、Hybond Nナイロンメンブレンに20 x SSCによるキャピラリーブロットで転写した。1レーンあたりtotal RNAは5 μg泳動した。分子量マーカーはDIG-RNA Marker I 20 ngを使用した。転写後、メンブレンはStratagene社のUV cross-linkerでoptimal cross-linkの条件で紫外線照射し、RNAをメンブレン上に固定した。

(3) PCRマッピング

実施例5で作製したYIp型ベクターであるpAURGG115に由来する断片が、ゲノムにどのようにインテグレートされているかを調べるために、調製した酵母DNA 0.3-0.6 μgを鋳型にし、合成オリゴヌクレオチドAUR-FWcとAUR-RVc、およびAUR-SAL1とAUR-SAL2との各組合せをプライマーに用いてPCRを行った。PCRは94℃ 30秒, 55℃ 1分, 72℃ 3分を30サイクル繰り返す条件で行った。

AUR-FWc: 5'-TCT CGA AAA AGG GTT TGC CAT-3' (配列番号98)

AUR-RVc: 5'-TCA CTA GGT GTA AAG AGG GCT-3' (配列番号99)

AUR-SAL1: 5'-TGT TGA AGC TTG CAT GCC TGC-3' (配列番号100)

AUR-SAL2: 5'-TTG TAA AAC GAC GGC CAG TGA-3' (配列番号101)

(4) DIG ラベルプローブ DNA の作製

ハイブリダイゼーションプローブは Probe I、II、III 及び V の 4 種を作製した（表 7）。

表 7 ハイブリダイゼーション用プローブ

プローブ番号	遺伝子	鋳型	プライマー1	プライマー2
I	*ERG20*	pT7ERG20	SCFPS1	SCFPS2
II	*BTS1*	pYES2-GGPS6	BTS1 (1-21)	BTS1 (1008-982)
III	*HMG1*	pYHMG1	HMG1 (1267-1293)	HMG1 (2766-2740)
V	*AUR1*	pAUR123	AUR-RV	AUR-FW

プローブ I:

実施例 2(1-1)で作製した pT7ERG20 を鋳型にして SCFPS1 と SCFPS2 をプライマーに用い、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) により DIG ラベルプローブ DNA を作製した。実験条件は Roche Diagnostics 社添付のプロトコルに従った。 PCR は 94℃ 30 秒, 58℃ 1 分, 72℃ 3 分のサイクルを 30 サイクル繰り返す条件で行った。なお、DIG ラベルプローブ DNA は、反応後アガロースゲル電気泳動により合成状態をチェックした。

プローブ II:

合成オリゴヌクレオチド BTS1(1-21) 及び BTS1(1008-988)をプライマーにし、pYESGGPS (実施例 4(2-1)参照) を鋳型にしてプローブ I と同様にして DIG ラベルプローブ DNA を作製した。

BTS1(1-21): 5'-ATG GAG GCC AAG ATA GAT GAG-3' (配列番号 102)

BTS1(1008-988): 5'-TCA CAA TTC GGA TAA GTG GTC-3' (配列番号 103)

プローブ III:

合成オリゴヌクレオチド HMG1(1267-1293)と HMG1(2766-2740)をプライマーにし、pYES-HMG1 (実施例 3(3)参照) を鋳型にしてプローブ I と同様にして DIG ラベルプローブ DNA を作製した。

HMG1(1267-1293): 5'-AAC TTT GGT GCA AAT TGG GTC AAT GAT-3' (配列番号 80)

HMG1(2766-2740): 5'-TCC TAA TGC CAA GAA AAC AGC TGT CAC-3' (配列番号 104)

プローブ V:

合成オリゴヌクレオチド AUR-FW と AUR-RV をプライマーにし、pAUR123 (宝酒造) を鋳型にして Probe I と同様にして DIG ラベルプローブ DNA を作製した。

AUR-FW: 5'-ATG GCA AAC CCT TTT TCG AGA-3' (配列番号 105)

AUR-RV: 5'-AGC CCT CTT TAC ACC TAG TGA-3' (配列番号 106)

(5) ハイブリダイゼーションとプローブの検出

サザンブロットハイブリダイゼーションは、20 ng/ml のプローブ濃度で DIG Easy Hyb (Roche) を用いて 42℃ 24 時間行った。ノーザンブロットハイブリダイゼーションは、100 ng/ml のプローブ濃度で DIG Easy Hyb を用いて 50℃ 24 時間行った。それぞれ、あらかじめハイブリダイゼーションと同じ温度で DIG Easy Hyb 溶液で 24 時間プレハイブリダイゼーションを行ってある。ハイブリダイゼーション後、2x SSC, 0.1% SDS, 65℃, 10 分で 3 回、0.2x SSC, 0.1% SDS, 65℃, 15-20 分で 2 回、それぞれ洗浄した。洗浄後メンブレンは DIG Luminescent Detection Kit (Roche) で DIG ラベルプローブを化学発光させ、X 線フィルムに感光させ可視化した。

(6) 酵素活性測定

作製した組換え体のうち、下記宿主株、組換え体を用いた。宿主への各ベクターの導入は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., pp.13.7.1-13.7.2 に記載の酢酸リチウム法、または、Frozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research, Orange, CA) を用いた方法で導入した（手順はキット同封の説明書に従った)。なお、1-2 株は pYES-HMG1 を A451 株に導入したものであり、3-2 株は pYHMG044 を A451 に導入したものであり、13-2 株は pYES-HMG1 を AURGG101 に導入したものであり、15-2 は pYHMG044 を AURGG101 に導入したものである。

No.1 宿主株：A451

No.2 *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : AURGG101 (A451,*aur1*::*AUR1-C*)

No.3 *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : AURGG102 (A451,*aur1*::*BTS1-AUR1-C*)

No.4 *GAL1*p-*HMG1* (YEp) : 1-2 (pYES-HMG1/A451)

No.5 *GAL1*p-*HMG1*Δ (YEp) : 3-2 (pYHMG044/A451)

No.6 *GAL1*p-*HMG1* (YEp) & *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : 13-2 (pYES-HMG1/AURGG101)

No.7 *GAL1*p-*HMG1*Δ (YEp) & *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : 15-2 (pYHMG044/AURGG101)

No.8 *GAL1*p-*HMG1* (YEp) & *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : 24-1 (pYES-HMG1/AURGG102)

No.9 *GAL1*p-*HMG1*Δ (YEp) & *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : 27-2 (pYHMG045/AURGG102)

No.10 GAL1p-*HMG1*Δ (YEp) & *GAL1*p-*BTS1* (YIp) : 31-2 (pYHMG076/AURGG102)

No.1-No.10 の株を 26℃で培養した 1 ml の前培養液を生理食塩水で洗い、100 ml の培養液へ加え、300 ml の三角フラスコ内で 26℃、1 分あたり 120 回の往復振盪で培養した。培地は SD および SG（SD 培地のグルコースをガラクトースに置き換えたもの）を用いた。*URA3* マーカーを保持している組換え体は SD-U（SD に CSM(-URA)を加えたもの）又は SG-U（SG に CSM(-URA)を加えたもの）培地にし、AURGG 株はオーレオバシジンを 1 μg/ml になるように加えた。

菌体増殖は OD_{600} で測定し、OD_{600} が 3-4 程度になった時点（23-52 時間）で培養を止め、氷中で冷却し、以下に記載の DNA 調製、RNA 調製、粗酵素液調製を行った。

各培養液から遠心により菌体を集め、RNA 調製と同様にして 4℃でガラスビーズで菌体を破砕後、滅菌水に懸濁した。微量冷却遠心機を用いて 12,000 r.p.m. で 10 分遠心し、その上清を粗酵素画分とした。粗酵素画分中のタンパク質濃度は、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA)で BSA を標準タンパク質として測定した。粗酵素液 10 μg を用い下記の 200 μl 反応カクテル中で、37℃で 40 分間反応させた。

0.125 mM [^{14}C]IPP (185 GBq/mol)
0.125 mM ゲラニルニリン酸(Sigma Chemical, St. Louis, MO)
100 mM Tris·HCl (pH 7.0)
10 mM NaF, 5 mM $MgCl_2$
5 mM 2-メルカプトエタノール
0.05% Triton X-100
0.005% BSA

反応後、水飽和ブタノールで伸長したプレニルニリン酸を抽出し、一部は液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。残りのサンプルは、Koyama らの方法 (Koyama T., Fujii, H. and Ogura, K. 1985. Meth. Enzymol. 110: 153-155) に従ってジャガイモ酸性フォスファターゼで脱リン酸化後、薄層クロマトグラフィー（プレート LKC18 (Whatman, Clifton, NJ)、展開液 H_2O/acetone=1:19）で展開し、Bio Image Analyzer BAS2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) でオートラジオグラムを可視化し、相対放射活性を測定した。

(7) 結果と考察

(7-1) サザンブロットハイブリダイゼーションとPCRマッピング

サザンブロットハイブリダイゼーションの結果を図 12 に示す。また、*AUR1* 近辺の PCR によるマッピングの結果を図 13 に示す。図 12 及び図 13 において、各レーン 1～10 は、(6)において使用した株の番号（No.1～No.10）にそれぞれ対応する。

N は *Nde*I 消化、S は *Stu*I 消化 DNA のレーンを示す。各レーンの DNA は以下の株より調製した。

レーン 1, A451; レーン 2, AURGG101; レーン 3, AURGG102; レーン 4, pYES-HMG1/A451; レーン 5, pYHMG044/A451; レーン 6, pYES-HMG1/ AURGG101; レーン 7, pYHMG044/AURGG101, レーン 8, pYES-HMG1/AURGG102; レーン 9, pYHMG045/AURGG102; レーン 10, pYHMG076/AURGG102

ERG20（FPP 合成酵素遺伝子）は全ての株で同一であり、*ERG20* 遺伝子の周辺のゲノムに変化がないことがわかった（図 12）。

BTS1（GGPP 合成酵素遺伝子）と *AUR1* をプローブに用いたところ、AURGG102 株では、*AUR1* 部分に *BTS1* がインテグレーションされていたが、AURG

G101では宿主のA451と変わらなかった。AURGG101は*AUR1*遺伝子部分のみがpAUR101由来の*AUR1-C*遺伝子に置換変異しただけで、*GAL1*p-*BTS1*断片はゲノムに組み込まれていないことがわかった。PCRによって、ゲノムインテグレーションの結果生じる*AUR1*遺伝子の重複を検出したところ、やはりAURGG101由来の株ではバンドが検出されず、AURGG102株のみでバンドが検出された（図13）。

図12において、*HMG1*をプローブにしたときには、*Nde*I切断の時プラスミド由来のバンドがみられた（No.4-7）。また、*Stu*I切断では1-2株（No.4）の様に8.2 kbpのプラスミド由来のバンド（8.3 kbpのゲノム由来のバンドと重なっている）が生じるはずなのに、13-2株（No.6）、15-2株（No.7）ではゲノム中の*HMG1*付近と導入したプラスミド間で組換えが起こりバンドシフトがみられた。

サザンブロットハイブリダイゼーションとPCRマッピングの結果から、今回使用した株の遺伝子型は表8のようにまとめることができる。表中、AURはオーレオバシジンを加えた培地で、培地1が前培養培地、培地2が本培養用の培地を示す。

表 8

株番号	株名	組み込まれた遺伝子	プラスミド中の遺伝子	培地1	培地2
1	A451	-	-	SD	SG
2	AURGG101	-	-	SD-AUR	SG-AUR
3	AURGG102	*BTS1*	-	SD-AUR	SG-AUR
4	1-2	-	*HMG1*	SD-U	SG-U
5	3-2	-	*HMG1*Δ044	SD-U	SG-U
6	13-2	-	*HMG1*	SD-U-AUR	SG-U-AUR
7	15-2	-	*HMG1*Δ044	SD-U-AUR	SG-U-AUR
8	24-1	*BTS1*	*HMG1*	SD-U-AUR	SG-U-AUR
9	27-2	*BTS1*	*HMG1*Δ045	SD-U-AUR	SG-U-AUR
10	31-2	*BTS1*	*HMG1*Δ076	SD-U-AUR	SG-U-AUR

(7-2) ノーザンブロットハイブリダイゼーション

ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果を図14に示す。プローブは、表7のI、II、III、Vを使用した。

図14において、各レーン1～10は図12と同様である。また、－はSD培地で

の転写産物を、＋はSG培地での転写産物を示す。

*ERG20*の転写産物は、SG培地で*GAL1*p転写誘導をかけたときに13-2株（No.6）、15-2株（No.7）で低下する傾向がみられた。

SG培地により*GAL1*転写プロモーター制御下の遺伝子の転写誘導を行ったところ、*BTS1*転写産物は、*GAL1*p-*BTS1*断片がゲノムにインテグレートされている株、すなわちAURGG102（No.3 ）でのみ誘導が増加していた。

しかしながら、*HMG1*転写産物と比較すると、その転写誘導の度合いは低いことが分かる。*HMG1*転写産物は、SG培地による転写誘導で、プラスミドにより*GAL1*p-*HMG1*断片が導入された株（No.4-7）で顕著に増加した。

(7-3) プレニルニリン酸合成酵素活性

アリル性ニリン酸基質としてゲラニルニリン酸（GPP）と^{14}Cラベルした IPPとを用いて、粗酵素液中のプレニルニリン酸合成酵素活性を調べた。

GPPと[^{14}C]IPPを基質として合成された各プレニルニリン酸を脱リン酸化し、TLC展開の後各スポットの放射活性を調べたところ、 FPP合成酵素活性が高く、次に、GGPP 合成酵素活性に比べてはるかに高い HexPP（ヘキサプレニルニリン酸）合成酵素活性が検出された。そこで、オートラジオグラムから反応産物の相対量を計算し、総タンパク質あたりの比活性を計算した。その結果を図 15 に示す。図 15A は、上パネルが FPP 合成酵素(FPS)活性、下パネルが GGPP 合成酵素(GGPS)活性を示す。図 15B は、上パネルが HexPP 合成酵素(HexPS)活性、下パネルが PTase（総プレニルニリン酸合成酵素）活性を示す。また、灰色の棒はSD培地での結果を、白色の棒はSG培地での結果を示す。総プレニルニリン酸合成酵素活性のうちの多くがFPP合成酵素活性であり、SG培地による活性上昇がみられた。特に、13-2株（No.6）と15-2株（No.7）で顕著に増加していた。全体的には、GPPをアリル性基質にしたときのGGPP合成酵素活性はFPP合成酵素活性の20000分の一、HexPP合成酵素活性の300分の一程度である。HexPP合成酵素活性はSG培地で低下した。

〔実施例 8〕 DNA の宿主への導入及び宿主の培養（*Saccharomyces cerevisiae* による発現）

本実施例では、メバロン酸経路関連酵素の遺伝子を *S. cerevisiae* 細胞内で恒

常的に発現させる系を構築するために、恒常発現転写プロモーターを含み、各種栄養要求性マーカーを持った発現シャトルベクターに *S. cerevisiae* 由来の遺伝子を組み込み、メバロン酸関連酵素遺伝子の発現ベクターの作製を行い、これら遺伝子の高発現がプレニルアルコールの生産に与える効果を評価することにした。

(1) 酵母の形質転換

各メバロン酸経路関連酵素遺伝子発現ベクターを宿主に導入した。新たに導入したベクターには *TDH3* 転写プロモーター *TDH3*p（＝*GAP*p）の下流に各メバロン酸経路関連酵素遺伝子を挿入した。宿主として以下のものを使用した。

A451
AURGG101
YPH499
AURGG703
YPH500
W303-1A
W303-1B
EUG5(A451 由来)
EUG8(A451 由来)
EUG12(YPH499 由来)
EUG24(YPH500 由来)
EUG27(YPH500 由来)
15-2(pYHMG044/AURGG101) (AURGG101 由来)

(2) 酵母の培養

メバロン酸経路関連酵素遺伝子を導入した酵母は、マーカー遺伝子に応じた SD 選択培地で前培養後、25 μl 前培養液を 2.5 ml の YM 又は SG（SD のグルコース成分をガラクトースに置き換えたもの）培地に加え、26℃で 4 日間 130 r.p.m.の往復振盪培養で培養した。ただし、SG 培地に加える前には菌体を生理食塩水で洗浄し、グルコース成分の持ち込みがないようにした。また、YPH499 を宿主に用いたときには、40 μg/ml になるようにアデニン硫酸塩を培地に加えた。

(3) ペンタン抽出

メバロン酸経路関連酵素遺伝子を導入した酵母を培養後、30倍希釈液でOD_{600}を測定した。その後、2.5 mlのメタノールを加え混合後、さらに約5 mlのペンタンを加え激しく攪拌し静置した。ペンタン層を新しいガラス試験管にとり、ドラフト中でペンタンを気化させ溶質成分を濃縮後、内部標準物質として1.0 ml/l ウンデカノールを10 μl加え、GC/MS用サンプルとした。

(4) GC/MS解析

ペンタン抽出画分をHP6890/5973 GC/MSシステム (Hewlett-Packard, Wilmington, DE) を用いて分離、同定、定量した。使用カラムはHP-5MS (0.25 mm x 30 m、フィルム厚 0.25 μm)であり、分析条件は以下の通りである。本明細書中でのGC/MS分析条件は、全て同様である。

インレット温度 250℃

検出器温度 260℃

[MS ゾーン温度]

MS Quad 150℃

MS Source 230℃

マススキャン範囲 35-200

[インジェクションパラメーター]

自動インジェクションモード

サンプル容量 2 μl

3回のメタノール洗浄及び2回のヘキサン洗浄

スプリット比 1/20

キャリヤーガス ヘリウム 1.0 ml/分

溶媒遅延 2 分

[オーブン加熱条件]

115℃ 90 秒

70℃ /分で250℃まで加熱し、2分間維持

70℃ /分で300℃まで加熱し、7分間維持

時間0後

内部標準　エタノール中0.01 μl 1-ウンデカノール

信頼標準　(*all-E*)-ネロリドール (エーザイ)

(*all-E*)-ファルネソール (Sigma)

(*all-E*)-ゲラニルゲラニオール (エーザイ)

スクアレン (東京化成工業)

(5) 結果

遺伝子、発現ベクター、宿主、培養条件（培地、温度、培養時間）及びGGOHの最大生産量を示す結果を表9に示す。

表 9

GGOH最大生産量

遺伝子	導入したDNA	宿主	培地	温度 (℃)	培養時間 (時間)	GGOH生産量 (mg/l)
HMG1						
	pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YM	26	96	0.348
	pRS444GAP-HMG1	Sc A451	YM	26	96	0.128
	pRS444TEF-HMG1	Sc A451	YM	30	96	0.069
	pYES-HMG1	Sc A451	SG	26	48	0.100
	pYES-HMG1	Sc AURGG101	SG	26	48	2.20
	pRS414TPadh-HMG1	Sc YPH499	YM*	26	96	0.136
HMG1Δ						
	pYHMG044	Sc A451	SG	26	48	0.053
	pYHMG056	Sc A451	SG	26	48	0.070
	pYHMG062	Sc A451	SG	26	48	0.065
	pYHMG076	Sc A451	SG	26	48	0.050
	pYHMG081	Sc A451	SG	26	48	0.051
	pYHMG112	Sc A451	SG	26	48	0.064
	pYHMG122	Sc A451	SG	26	48	0.062
	pYHMG044	Sc AURGG101	SG	26	48	2.20
	pYHMG044	Sc AURGG101	SG	26	96	0.729
	pYHMG044	Sc AURGG101	SG	30	96	7.95
	pYHMG062	Sc AURGG101	SG	26	48	0.061
	pYHMG076	Sc AURGG101	SG	26	48	0.062
	pYHMG081	Sc AURGG101	SG	26	48	0.052
HMG1+HMG1Δ						
	pYHMG044+pRS434GAP-HMG1	Sc AURGG101	SG	26	96	0.927
	pYHMG044+pRS444GAP-HMG1	Sc AURGG101	SG	26	96	0.739
ERG20(YEp)						
	pRS435GAP-ERG20	Sc A451	YM	26	96	0.067
	pRS445GAP-ERG20	Sc A451	YM	26	96	0.073
BTS1(ゲノム)						
	pAURGG115(Eco065I digested)	Sc A451(AURGG102)	SG	30	96	0.075
	pAURGG115(Eco065I digested)	Sc YPH499(AURGG703)	SG	26	96	0.093
BTS1(YEpベクター)						
	pRS445GAP-BTS1	Sc A451	YM	26	96	0.585
	pRS435GAP-BTS1	Sc YPH499	YM	26	96	0.204
	pRS435GAP-BTS1(=pRS435GG)	Sc W303-1A	YM	30	96	0.726
	pRS445GAP-BTS1(=pRS445GG)	Sc W303-1A	YM	30	96	0.189
	pRS435GAP-BTS1(=pRS435GG)	Sc W303-1B	YM	30	96	0.853
	pRS445GAP-BTS1(=pRS445GG)	Sc W303-1B	YM	30	96	0.254
HMG1Δ(YEp)+ERG20(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ERG20	Sc AURGG101	SG	26	96	11.3
	pYHMG044+pRS445GAP-ERG20	Sc AURGG101	SG	26	96	1.24
HMG1Δ(YEp)+ispA(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ispA	Sc AURGG101	SG	26	96	1.64
	pYHMG044+pRS445GAP-ispA	Sc AURGG101	SG	26	96	0.900
HMG1(YEp)+BTS1(YEp)						
	pRS434GAP-HMG1(=pRS435GG)	Sc YPH499	YM	26	96	0.581
	pRS434GAP-HMG1(=pRS445GG)	Sc YPH499	YM	26	96	0.350
	pRS434TEF-HMG1(=pRS435GG)	Sc YPH499	YM	26	96	0.509
	pRS434TEF-HMG1(=pRS445GG)	Sc YPH499	YM	26	96	0.630
HMG1(YEp)+BTS1(ゲノム)						
	pYES-HMG1	Sc AURGG102	SG	26	48	0.090
	pYES-HMG1	Sc AURGG102	SG	26	96	1.280
	pYES-HMG1	Sc AURGG703	SG	26	96	0.462
HMG1Δ(YEp)+BTS1(YEp)						
	pYHMG044(=pRS435GG)	Sc AURGG101	SG	26	96	9.76
	pYHMG044(=pRS445GG)	Sc AURGG101	SG	26	96	8.82
HMG1Δ(YEp)+BTS1(ゲノム)						
	pYHMG027	Sc AURGG102	SG	26	48	0.078
	pYHMG044	Sc AURGG102	SG	26	48	0.120
	pYHMG044	Sc AURGG102	SG	26	96	0.415
	pYHMG045	Sc AURGG102	SG	26	48	0.610
	pYHMG059	Sc AURGG102	SG	26	48	0.099
	pYHMG062	Sc AURGG102	SG	26	48	0.120
	pYHMG062	Sc AURGG102	SG	26	48	0.418

差替え用紙 (規則26)

	pYHMG063	Sc AURGG102	SG	26	48	0.110
	pYHMG076	Sc AURGG102	SG	26	48	0.400
	pYHMG083	Sc AURGG102	SG	26	48	0.210
	pYHMG094	Sc AURGG102	SG	26	48	0.170
	pYHMG106	Sc AURGG102	SG	26	48	0.120
	pYHMG122	Sc AURGG102	SG	26	48	0.160
	pYHMG123	Sc AURGG102	SG	26	48	0.097
	pYHMG134	Sc AURGG102	SG	26	48	0.110
	pYHMG044	Sc AURGG703	SG	26	96	0.201
	pYHMG062	Sc AURGG703	SG	26	96	0.243
HMG1 Δ(YEp)+ispAm(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ispAm	Sc AURGG101	SG	26	96	1.36
HMG1 Δ(YEp)+ORF182(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ORF182	Sc AURGG101	SG	26	96	0.626
	pYHMG044+pRS445GAP-ORF182	Sc AURGG101	SG	26	96	1.16
HMG1 Δ(YEp)+HMGS(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-HMGS	Sc AURGG101	SG	26	96	1.30
	pYHMG044+pRS445GAP-HMGS	Sc AURGG101	SG	26	96	0.883
HMG1 Δ(YEp)+ERG12(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ERG12	Sc AURGG101	SG	26	96	0.702
	pYHMG044+pRS445GAP-ERG12	Sc AURGG101	SG	26	96	1.01
HMG1 Δ(YEp)+ERG8(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ERG8	Sc AURGG101	SG	26	96	0.700
	pYHMG044+pRS445GAP-ERG8	Sc AURGG101	SG	26	96	2.72
HMG1 Δ(YEp)+ERG10(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ERG10	Sc AURGG101	SG	26	96	1.15
	pYHMG044+pRS445GAP-ERG10	Sc AURGG101	SG	26	96	1.22
HMG1 Δ(YEp)+ERG19(YEp)						
	pYHMG044+pRS435GAP-ERG19	Sc AURGG101	SG	26	96	1.89
	pYHMG044+pRS445GAP-ERG19	Sc AURGG101	SG	26	96	1.02
fpsm(Y81M)						
	pFPSm21	Ec JM109	2xYT***	37	16	16.1
ispAm(Y79M)						
	p16M	Ec JM109	2xYT***	37	16	21.9
ispAm(Y79D)						
	p15D	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.12
ispAm(Y79E)						
	p4E	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.26
ispAm(Y79M) + idi						
	pALispA16m + p3-47-13	Ec JM109	2xYT	37	16	0.07
-		Sc A451**				0.02
-		Sc AURGG101				0.02
-		Sc YPH499				0.00
-		Sc YPH500				0.00
-		Sc W303-1A				0.00
-		Sc W303-1B				0.00
		Ec JM109				0.00
HMG1						
	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG8	YM	30	96	0.16
	pRS444GAP-HMG1	Sc EUG8	YM	30	96	0.12
	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG12	YM	30	96	1.03
	pRS444GAP-HMG1	Sc EUG12	YM	30	96	1.02
	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG12	YM	30	96	0.55
	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG27	YM	30	96	0.55
	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG27	YM	30	96	0.63
HMG1 Δ						
	pYHMG044	Sc AURGG101	YMO	26	157	3.58
	pRS434GAP-HMG026	Sc EUG5	YM	30	96	0.09
	pRS434GAP-HMG044	Sc EUG5	YM	30	96	0.09
	pRS434GAP-HMG056	Sc EUG5	YM	30	96	0.11
	pRS434GAP-HMG062	Sc EUG5	YM	30	96	0.13
	pRS434GAP-HMG076	Sc EUG5	YM	30	96	0.15
	pRS434GAP-HMG081	Sc EUG5	YM	30	96	0.14
	pRS434GAP-HMG100	Sc EUG5	YM	30	96	0.18
	pRS434GAP-HMG112	Sc EUG5	YM	30	96	0.34
	pRS434GAP-HMG122	Sc EUG5	YM	30	96	0.13
	pRS434GAP-HMG133	Sc EUG5	YM	30	96	0.71
	pRS434GAP-HMG026	Sc EUG12	YM	30	96	0.63

	pRS434GAP-HMG044	Sc EUG12	YM	30	96	0.44
	pRS434GAP-HMG056	Sc EUG12	YM	30	96	0.4
	pRS434GAP-HMG062	Sc EUG12	YM	30	96	0.45
	pRS434GAP-HMG076	Sc EUG12	YM	30	96	0.55
	pRS434GAP-HMG081	Sc EUG12	YM	30	96	0.49
	pRS434GAP-HMG100	Sc EUG12	YM	30	96	0.44
	pRS434GAP-HMG112	Sc EUG12	YM	30	96	0.53
	pRS434GAP-HMG122	Sc EUG12	YM	30	96	0.5
	pRS434GAP-HMG133	Sc EUG12	YM	30	96	0.44
BTS1(YEpベクター)						
	pRS435GG	Sc EUG8	YM	30	96	1.4
	pRS435GG	Sc EUG12	YM	30	96	1.58
	pRS435GG	Sc EUG27	YM	30	96	1.53
FPS genes						
	pFPSm21	Ec JM109	2xYT***	37	16	16.1
	pFPSm31	Ec JM109	2xYT***	37	16	6.9
	p4D	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.09
	p4E	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.26
	p4M	Ec JM109	2xYT***	37	16	15.5
	p8M	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.31
	p15D	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.12
	p15E	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.21
	p16D	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.06
	p16E	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.88
	p16M	Ec JM109	2xYT***	37	16	21.9
	p18E	Ec JM109	2xYT***	37	16	0.14
	p18M	Ec JM109	2xYT***	37	16	6
FPS genes+idi						
	p16M+p3-47-13	Ec JM109	2xYT	37	16	0.07
GGHDEL						
	pRS445GGHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	0.23
FGG fusion						
	pRS435FGG	Sc YPH499	YM	30	96	0.46
	pRS435FGGHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	0.29
GGF fusion						
	pRS435GGF	Sc A451	YM	30	96	0.28
	pRS435GGF	Sc A451	YMO	30	96	0.48
	pRS435GGF	Sc A451	YM	30	168	0.28
	pRS435GGF	Sc A451	YMO	30	168	1.01
	pRS435GGF	Sc YPH499	YM	30	96	2.1
	pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	30	96	1.49
	pRS435GGF	Sc YPH499	YM	30	168	0.37
	pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	30	168	2.92
	pRS435GGF	Sc EUG5	YM	30	96	5.2
	pRS435GGF	Sc EUG5	YMO	30	96	4.2
	pRS435GGF	Sc EUG5	YM(100)	30	96	3.5
	pRS435GGF	Sc EUG5	YM	30	168	7.32
	pRS435GGF	Sc EUG5	YMO	30	168	10.1
	pRS435GGF	Sc EUG12	YM	30	96	0.47
	pRS435GGF	Sc EUG12	YMO	30	96	2.38
	pRS435GGF	Sc EUG12	YM(20)	30	96	7.04
	pRS435GGF	Sc EUG12	YM	30	168	1.43
	pRS435GGF	Sc EUG12	YMO	30	168	5.78
	pRS435GGFHDEL	Sc A451	YMO	30	96	0.13
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	1.9
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YMO	30	96	1.69
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM	30	168	0.54
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YMO	30	168	2.5
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	5.78
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YMO	30	96	3.97
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YM(75)	30	96	3.94
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YM	30	168	6.99
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YMO	30	168	10.6
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	0.6
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YMO	30	96	2.33
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YM(20)	30	96	8.01
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YM	30	168	1.18

	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YMO	30	168	5.78
HMG1+GGF fusion						
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc A451	YM	30	96	0.55
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc A451	YMO	30	96	0.36
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc A451	YM	30	168	0.93
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc A451	YMO	30	168	1.01
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc A451	YM(50)	30	168	4.54
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YM	30	96	0.79
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	30	96	2.46
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YM(50)	30	96	2.25
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	33	109	128
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YM	30	168	1.28
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	30	168	5.66
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGF	Sc YPH499	YM(100)	30	168	2.5
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc A451	YM	30	96	0.54
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc A451	YMO	30	96	0.41
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc A451	YM	30	168	0.76
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc A451	YMO	30	168	3.49
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc A451	YM(75)	30	168	5.74
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	1
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YMO	30	96	2.6
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM(100)	30	168	2.85
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM	30	168	2.45
	pRS434GAP-HMG1+pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YMO	30	168	6.16

*:0.1%アデカノール+5%Glcを添加した。
**:宿主のみの場合は、いずれの培養条件においてもGGOHは生産されなかった。
***:IPPとDMAPPを添加した。
遺伝子名中、「YEp」とあるのはYEpベクターを導入しているものを意味し、「ゲノム」とあるのはゲノムインテグレートを意味する。

表中、宿主の欄の Ec は *E. coli* を、Sc は *S.cerevisiae* を意味する。また、YM(20)は、YM 培地中の糖成分中の初期糖含量が 20% Glc- 80% Gal の培地に 2 日後にさらに終濃度 5% Glc を添加したものを意味する。他の培地や数値についても同様である。

(5-1) *ERG20* の発現による GGOH の生産

pRS435GAP-ERG 又は pRS445GAP-ERG を A451 に導入すると高効率で GGOH が生産され、pRS445GAP-ERG を用いたときには 0.73mg/l の GGOH を生産した（表 9）。

(5-2) *BTS1* の発現による GGOH の生産

pRS435GAP-BTS1 又は pRS445GAP-BTS1 を A451、YPH499 に導入すると GGOH の生産が増加し（表 9）、A451 を宿主としたときに平均 0.10～0.11mg/l、最大 0.585mg/l の GGOH を生産した（表 9）。さらに、pRS435GAP-BTS1 又は pRS445GAP-BTS1 を W303-1A 又は W303-1B に導入すると、最大 0.19-0.85 mg/l の GGOH が生産された（表 9）。

(5-3) HMG-CoA 還元酵素遺伝子又はその変異体の発現による GGOH の生産

(i) 恒常発現型プロモーターを連結した *HMG1* 遺伝子を A451 に導入した場合（「恒常発現プロモーター；*HMG1*；A451」のように表記する。以下同様。）の GGOH 生産

GGOH の生産量を測定した結果を図 16 に示す。図 16 において、434、444 は、それぞれ pRS434GAP、pRS444GAP ベクターを用いたときの結果を表す。一番右のグラフが遺伝子導入前の宿主(A451)を培養したときの結果を示す。

この結果より、A451 を宿主に用いると、pRS434GAP-HMG/A451 では GGOH の生産性が向上し、*HMG1* 遺伝子の転写を活性化させるだけで GGOH は平均 0.105mg/l、コロニーによっては、最高で 0.348mg/l 生産され（表 9）、GGOH 生産に有効であることが分かった。

(ii) 誘導型プロモーター；*HMG1*; A451 & AURGG101

誘導型プロモーター*GAL1*p を含むベクターpYES2 に *HMG1* 遺伝子（PCR エラー変異型 *HMG1* である *HMG1'*）を挿入したプラスミド pYES2-HMG を、A451 と AURGG101 (A451, *aur1*::*AUR1-C*)へ導入した。

その結果、GGOH を高生産するクローンが得られた。GGOH 量は AURGG101 株で平均 1.1mg/l に達し、最大 2.2mg/l の GGOH を生産した（図 17）。

(iii) 誘導型プロモーター；*HMG1* & *BTS1*; AURGG102 & AURGG703

誘導型プロモーター*GAL1*p を含むベクターpYES2 に *HMG1'*を挿入したプラスミド pYES2-HMG を、A451 由来株である AURGG102 と YPH499 由来株である AURGG703 へ導入した（ゲノムへインテグレートされている）。

その結果、AURGG102 及び AURGG703 のいずれを宿主に用いた場合でも、*GAL1*p を使用したときは、GGOH を高生産するクローンが得られ（図 18）、AURGG102 において最大 1.28 mg/l の GGOH を生産した。

(iv) 誘導型プロモーター；*HMG1*Δ; A451

誘導型プロモーター*GAL1*p を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1'*遺伝子を挿入した以下のプラスミドをそれぞれ A451 へ導入した。

pYHMG026

pYHMG044

pYHMG056

pYHMG062

pYHMG076

pYHMG081

pYHMG100

pYHMG112

pYHMG122

SG 培地で培養後、GGOH の生産量を測定した（図 19）。図 19 において、*HMG1*Δ026 は pYHMG026 を A451 へ導入したときの結果を示す。他の遺伝子についても同様である（以下同じ）。

欠失型 *HMG1* 遺伝子を誘導型プロモーターで発現させると、GGOH 高生産株が得られた。GGOH 生産には *HMG1*Δ056 と *HMG1*Δ062 が効果があった（HMG062/A451 で平均 0.063mg/l）。

(v) 誘導型プロモーター；*HMG1*Δ; AURGG101

誘導型プロモーター*GAL1*p を含むベクターpYES2 に、欠失型 *HMG1*遺伝子を挿入した以下のプラスミドをそれぞれ AURGG101 へ導入した。

pYHMG026

pYHMG044

pYHMG056

pYHMG062

pYHMG076

pYHMG081

pYHMG100

pYHMG112

pYHMG122

pYHMG133

SG 培地で培養後、GGOH の生産量を測定した（図 20）。その結果、HMG1Δ044 において約 3.1mg の GGOH 生産が認められた。図 20 において、一番右側のカラムは遺伝子導入前の宿主 AURGG101 の生産量を示す。

(vi) 誘導型プロモーター；*HMG1*Δ & *BTS1*; AURGG102

誘導型プロモーター*GAL1*p を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1*遺伝子を挿入した以下のプラスミドをそれぞれ AURGG102 へ導入した。

pYHMG027

pYHMG044

pYHMG045

pYHMG059

pYHMG062

pYHMG063

pYHMG076

pYHMG083

pYHMG094

pYHMG106

pYHMG112

pYHMG123

pYHMG134

SG 培地で培養後、GGOH の生産量を測定した。

その結果、pYHMG045 を導入した場合、平均で 0.36 mg/l の GGOH を生産する株が得られた(図 21)。

(vii) 誘導型プロモーター ; *HMG1*△ & *BTS1*; AURGG703

誘導型プロモーター*GAL1*p を含むベクターpYES2 に欠失型 *HMG1*遺伝子を挿入したプラスミド pYHMG044 と pYHMG062 をそれぞれ AURGG703 へ導入した。SG 培地で培養後、GGOH の生産量を測定した。

その結果、pYHMG062 が導入された株において、平均で 0.21 mg/l の GGOH を生産した(図 22)。

(5-4) *BTS1* と HMG-CoA 還元酵素遺伝子との発現による GGOH の生産

pRS435GAP-HMG1 又は pRS445GAP-HMG1 と *BTS1* とを YPH499 に導入し、GGOH の生産量を測定した。その結果、pRS435GAP-HMG1 を導入すると最大 0.58 mg/l の GGOH を生産するクローンが得られた（表 9）。

(5-5) *isp*Am、ORF182(*idi*)、*HMGS*、*ERG8*、*ERG10* 又は *ERG19* と欠失型 HMG-CoA 還元酵素遺伝子（*HMG1*△）との発現による GGOH の生産

*ispA*m、ORF182(*idi*)、*HMGS*、*ERG8*、*ERG10* 又は *ERG19* と *HMG1*△とを AURGG101 に導入し、GGOH の生産量を測定した。その結果、最大 0.6mg/l～2.7 mg/l の範囲で GGOH を生産するクローンが得られた(表 9)。

〔実施例９〕 DNA の宿主への導入及び宿主の培養（*Escherichia coli* による発現）

E. coli FPP 合成酵素遺伝子 *ispA* 発現ベクターとして pALisp4、pALisp15、pALisp16、 pALisp18 を用い、*ispA* を置換変異させて GGPP 合成酵素遺伝子に改変した ispA(Y79D), ispA(Y79E), *ispA*(Y79M)の発現ベクターとして p4D, p4E, p4M, p8M, p15D, p15E, p16D, p16E, p16M, p18E, p18M を用いて、また、*B. stearothermophilus* FPP 合成酵素遺伝子 *fps* の Y81M 変異型遺伝子として pFPSm21, pFPSm31 を用いて、*E. coli* JM109 に導入し、50 ml/300 ml flask の 2x YT、1 mM IPTG 培地に前培養液を 0.5 ml 加え、必要に応じた抗生物質（アンピシリン、クロラムフェニコール）と 5 mM (約 0.12% (W/V))の IPP と DMAPP を加え、37℃で 16 時間振盪培養した。

培養後、培養液上清と沈澱超音波破砕物にジャガイモ酸性フォスファターゼを加え、ペンタンを有機溶媒としてプレニルアルコールを抽出し、GC/MS により生産量を同定、定量した。また、IPP と DMAPP を添加しなくてもプレニルアルコール生産が行えるかどうかを確かめるため、実施例 3(1)で得られたプラスミド p16M(pALispA16m とする)と、実施例 2(10-2)で得られた *IPP*Δ-イソメラーゼ遺伝子 *idi* を保持するプラスミド p3-47-13 を *E. coli* JM109 に導入、50 ml/300 ml flask の 2x YT、1 mM IPTG 培地に前培養液を 0.5 ml 加え、必要に応じて抗生物質を加え（アンピシリン、クロラムフェニコール)、37℃で 16 時間振盪培養した。

その結果、培地に添加成分として IPP と DMAPP を加えたときの GGOH の生産量は、変異型 *fps* を導入した場合(図 23 中の pFPSm21、pFPSm31 で示す)でそれぞれ 16.1mg/l、6.9mg/l であった。また、変異型 *ispA* を導入した場合でも、p4M、p16M、p18M を保持する JM109 を培養した場合はそれぞれ 15.5 mg/l、21.9 mg/l、6.0 mg/l であり(図 23)、Y79M 変異を導入した p4M、p16M において、沈殿画分に高い GGOH 活性が認められた。これは、pALispA4、pALispA16 は *E. coli* 細胞内で活性のある FPP 合成酵素を発現し、その置換変異型プラスミド p4M、p16M も十分な発現活性があると考えられる。

なお、培地に添加成分として IPP と DMAPP を加えなかったときの GGOH の

生産量は、pALispA16m を保持する JM109 で 0.07 mg/l であった。また、pALispA16m と、*IPP*Δ-イソメラーゼを保持するプラスミド p3-47-13 とを共発現させたときに、GGOH 換算で生産性は 0.12mg/l であった。

〔実施例 10〕 融合遺伝子の発現によるプレニルアルコールの生産

S. cerevisiae BTS1 がコードしている GGPP 合成酵素 は、プライマー基質として DMAPP (dimethyl allyl diphosphate; ジメチルアリル二リン酸) よりも FPP を好むと仮定する。そうすると、IPP から GGOH 前駆体である GGPP への合成能を強化するためには、ファルネシル二リン酸合成能を同時に補強する必要があると考えられた。

そこで、本実施例では、*BTS1* と *ERG20* の融合遺伝子を作製し、*S.cerevisiae* 細胞内でその融合遺伝子を発現させ、GGOH 生産能が向上するかを確かめることにした。また、あわせて小胞体移行シグナルをコードする塩基配列を *BTS1*、*ERG20* やその融合タンパク質遺伝子の下流に組み込み、プレニルアルコール生産に与える影響を調べることにした。

(1) プラスミド DNA の作製

GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* を pYES2 に組み込んだ pYESGGPS と、FPP 合成酵素遺伝子 *ERG20* を pT7 に組み込んだ pT7ERG20 とを鋳型に用い、PCR を行った。使用した PCR プライマーは以下の通りである。

SacII-BTS1:5'-TCC CCG CGG ATG GAG GCC AAG ATA GAT-3' (配列番号 107)

BTS1-XhoI:5'-CAA CTC GAG TCA CAA TTC GGA TAA GTG-3' (配列番号 108)

ERG20HDEL-XbaI:5'-GCT CTA GAG TTC GTC GTG TTT GCT TCT CTT GTA AAC TT-3' (配列番号 109)

BTS1HDEL-XhoI:5'-TAT CTC GAG TCA CAA TTC GTC ATG TAA ATT GG-3' (配列番号 110)

BTSI-109I:5'-GCA GGG ACC CCA ATT CGG ATA AGT GGT C-3'(配列番号 111)

109I-BTS1:5'-GTA GGG TCC CTG GAG GCC AAG ATA GAT G-3'（配列番号 112）

ERG20-109I:5'-GCA GGG ACC CTT TGC TTC TCT TGT AAA CT-3'（配列番号 113）

109I-ERG20:5'-GTA GGG TCC TCA GAA AAA GAA ATT AGG AG-3'（配列番号 114）

-21:5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'（配列番号 115）

T7:5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'（配列番号 116）

ERG20HDEL-XbaI: 5'-GCT CTA GAG TTC GTC GTG TTT GCT TCT C TT GTA AAC TT-3'（配列番号 117）

BTS1HDEL-XhoI: 5'-TAT CTC GAG TCA CAA TTC GTC ATG TAA ATT GG-3'（配列番号 118）

ERG20HDEL-XbaI の第 3 番目～第 8 番目の塩基及び BTS1HDEL-XhoI の第 4 番目～第 9 番目の塩基（それぞれ、6 塩基分を下線で施した部分）はベクター連結用の *Sac*II、*Xho*I または *Xba*I 認識部位を示す。また、BTSI-109I、109I-BTS1、ERG20-109I 及び 109I-ERG20 の第 4 番目～第 10 番目の塩基（それぞれ、7 塩基分を下線で施した部分）は融合遺伝子作製用の *Eco*O109I 認識部位を示す。

PCR は以下の反応液で行った。

1x KOD-Plus バッファー (東洋紡),
0.2 mM dNTPs
0.25 mM $MgSO_4$
15 pmol primer 1
15 pmol primer 2
0.01-0.1 μg 鋳型 DNA
1 u KOD-Plus DNA ポリメラーゼ(Toyobo)
全量 50 μl

KOD-Plus には 1.6 μg/μl の KOD 抗体が含まれている。反応条件は、94℃で 2 分の反応後、94℃ 15 秒、55℃ 30 秒及び 68℃ 1 分のサイクルを 30 サイクル行い、その後 68℃ 2 分保温した。

1st PCR は以下の鋳型、プライマー（primer 1, primer 2）の組合せで行った。

(表 10、図 24)。PCR 産物名も表 10 及び図 24 に示した。図 24 において、最も左側の列に最終的なプラスミド名を記した。グレーの文字で示した配列はアミノ酸配列を意味し、このうち GS は融合遺伝子の結合配列に導入し、HDEL は小胞体移行シグナルとして挿入した。くさび形矢印は、PCR で使用したプライマーの位置と向きを示している。

表 10

鋳型	primer 1	primer 2	PCR 産物名
pT7ERG20	SacII-BTS1	BTS1HDEL-XhoI	#6
pYESGGPS	SacII-ERG20	ERG20HDEL-XbaI	#7
pYESGGPS	SacII-BTS1	BTS1-109I	#9
pT7ERG20	T7	ERG20-109I	#10
pT7ERG20	109I-ERG20	-21	#11
pYESGGPS	109-BTS1	BTS1-XhoI	#12
pT7ERG20	109I-ERG20	ERG20HDEL-XbaI	#13
pYESGGPS	109I-BTS1	BTS1HDEL-XhoI	#14

PCR 産物#9、#10、#11、#12、#13、#14 を制限酵素 *Eco*O109I で消化後、#9 と#11、#10 と#12、#9 と#13、#10 と#14 とをそれぞれライゲーションした。このライゲーション溶液を PCR の鋳型とし、それぞれ、SacII-BTS1 と-21、T7 と BTS1-XhoI、SacII-BTS1 と ERG20HDEL-XbaI、T7 と BTS1HDEL-XhoI を primer 1 と primer 2 に用いて、2nd PCR を 1st PCR と同じ条件で行い、2nd PCR 産物#9-#11、#10-#12、#9-#13、#10-#14 を得た。

#9-#11 を *Sac*II と *Bam*HI で切断後 pRS435GAP と pRS445GAP の *Sac*II-*Bam*HI 部位に挿入し、それぞれ pRS435GGF と pRS445GGF とした。

#10-#12 を *Xba*I と *Xho*I で切断後 pRS435GAP と pRS445GAP の *Xba*I-*Xho*I 部位に挿入し、それぞれ pRS435FGG と pRS445FGG とした。

#9-#13 を *Sac*II と *Xba*I で切断後 pRS435GAP の *Sac*II-*Xba*I 部位に挿入し、それぞれ pRS435GGFHDEL とした。

#10-#14 を *Xba*I と *Xho*I で切断後 pRS435GAP と pRS445GAP の *Xba*I-*Xho*I 部位に挿入し、それぞれ pRS435FGGHDEL と pRS445FGGHDEL とした。

#7 を *Sac*II と *Xba*I で切断後 pRS435GAP と pRS445GAP の *Sac*II-*Xba*I 部位に挿入し、それぞれ pRS435FHDEL と pRS445FHDEL とした。

#6 を *Bam*HI と *Xho*I で切断後 pRS435GAP と pRS445GAP の *Bam*HI-*Xho*I 部位に挿入し、それぞれ pRS435GGHDEL と pRS445GGHDEL とした。

作製したプラスミド DNA は、DNA シークエンシングにより設計通りの塩基配列を持っていることを確認してある。

融合遺伝子でない *BTS1*、*ERG20* の発現ベクターとして、pRS435GAP-BTS1 (pRS435GG という)、pRS445GAP-BTS1 (pRS445GG という)、pRS435GAP-ERG20 (pRS435F という)、pRS445GAP-ERG20 (pRS445FG という) を利用し、*HMG1* 発現用に使用したプラスミドとして pRS434TEF-HMG1 と pRS434GAP-HMG1 を利用した。

(2) 組換え体の作製

組換え体の作製は、Zymo Research (Orange, CA)の Frozen EZ yeast transformation kit を用いて、上記の通り作製したプラスミドを宿主に導入することにより行った。宿主は A451、YPH499、AH1(pRS434GAP-HMG1/A451)、YH1 (pRS434GAP-HMG1/YPH499)、EUG5、EUG12 を使用した。

(3) プレニルアルコール生産量測定

EUG 株以外の組換え体は SD (synthetic dextrose) 選択液体培地に接種し、EUG 株は SGR(SD のグルコース成分をガラクトースとラフィノースに置き換えたもの)に接種し、30℃で培養し前培養液とした。培養した前培養液 10 または 25 μl を、1.0 または 2.5 ml の YM7+ade (YM, pH7, 40 μg/ml アデニン硫酸塩) 培地または YMO (YM7+ade, 1% 大豆油, 0.1% アデカノール LG-109 (Asahi Denka Kogyo, Tokyo, Japan)) 培地に加え、30℃で 4 日間または 7 日間 130 r.p.m.で往復振盪培養した。

培養後、メタノールを等量加えて混合し、ペンタンを約 2 倍量加えて激しく攪拌した。静置後、ペンタン層を新しいガラス試験管にとり、ドラフト中でペンタンを気化させ、溶質成分を濃縮後、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) でプレニルアルコールを同定・定量し、内部標準としてウンデカノールを用いて定量した。また、その際、菌体増殖の度合いを調べるため、培養液 20 μl を水で 30 倍に希釈し、600 nm の吸光度を測定した。

GC/MS は、HP6890/5973 GC/MS システム (Hewlett-Packard, Wilmington, DE) を用いた。

(4) 結果と考察

融合遺伝子発現により得られるゲラニルゲラニオールの最大生産量の一覧を表11に示す。

表11

融合遺伝子によるGGOH最大生産量

遺伝子	発現ベクター	宿主	培地	温度 (℃)	培養時間 (時間)	GGOH生産量 (mg/l)
435FHDEL	pRS435FHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	0.171
	pRS445FHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	0.106
	pRS435FHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	0.090
	pRS445FHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	0.056
435GGHDEL	pRS445GGHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	0.227
	pRS435GGHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	0.168
	pRS445GGHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	0.397
	pRS435GGHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	0.733
	pRS445GGHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	0.825
435FGG	pRS435FGG	Sc YPH499	YM	30	96	0.271
	pRS445FGG	Sc YPH499	YM	30	96	0.156
	pRS435FGG+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	0.462
	pRS445FGG+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	0.648
	pRS435FGG	Sc EUG5	YM	30	96	2.46
	pRS445FGG	Sc EUG5	YM	30	96	2.17
	pRS435FGG	Sc EUG12	YM	30	96	4.83
	pRS445FGG	Sc EUG12	YM	30	96	3.65
435GGF	pRS435GGF	Sc A451	YM	30	96	0.354
	pRS435GGF	Sc A451	YM	30	168	0.283
	pRS435GGF	Sc A451	YMO	30	96	0.475
	pRS435GGF	Sc A451	YMO	30	168	1.00
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YM	30	96	0.546
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YM	30	168	0.929
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YMO	30	96	0.362
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YMO	30	168	1.01
	pRS435GGF	Sc YPH499	YM	30	96	0.458
	pRS435GGF	Sc YPH499	YM	30	168	0.371
	pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	30	96	1.49
	pRS435GGF	Sc YPH499	YMO	30	168	2.92
	pRS445GGF	Sc YPH499	YM	30	96	0.317
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	2.10
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	168	1.28
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YMO	30	96	2.46
	pRS435GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YMO	30	168	5.66
	pRS445GGF+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	1.01
	pRS435GGF	Sc EUG5	YM	30	96	5.20
	pRS435GGF	Sc EUG5	YM	30	168	7.32
	pRS435GGF	Sc EUG5	YMO	30	96	1.20
	pRS435GGF	Sc EUG5	YMO	30	168	10.1
	pRS445GGF	Sc EUG5	YM	30	96	0.661
	pRS435GGF	Sc EUG12	YM	30	96	4.67
	pRS435GGF	Sc EUG12	YM	30	168	1.18
	pRS435GGF	Sc EUG12	YMO	30	96	2.38
	pRS435GGF	Sc EUG12	YMO	30	168	5.02
	pRS445GGF	Sc EUG12	YM	30	96	3.25
435FGGHDEL	pRS435FGGHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	0.121
	pRS445FGGHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	0.066
	pRS435FGGHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	0.294
	pRS445FGGHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	0.385
	pRS435FGGHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	0.786
	pRS445FGGHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	0.504
	pRS435FGGHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	2.41
	pRS435FGGHDEL	Sc EUG12	YM	30	168	1.43
	pRS445FGGHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	0.521
435GGFHDEL	pRS435GGFHDEL	Sc A451	YM	30	96	0.072
	pRS435GGFHDEL	Sc A451	YMO	30	96	0.126
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YM	30	96	0.540
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YM	30	168	0.760
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YMO	30	96	0.414
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc A451	YMO	30	168	3.49
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM	30	96	0.805
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YM	30	168	0.541
	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YMO	30	96	1.69

	pRS435GGFHDEL	Sc YPH499	YMO	30	168	2.50
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	96	1.90
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YM	30	168	2.45
	pRS435GGFHDEL+pRS434GAP-HMG1	Sc YPH499	YMO	30	96	2.60
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YM	30	96	5.78
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YM	30	168	6.99
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YMO	30	96	3.97
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG5	YMO	30	168	10.6
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YM	30	96	3.00
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YM	30	168	1.43
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YMO	30	96	2.33
	pRS435GGFHDEL	Sc EUG12	YMO	30	168	5.78
EUG(ERG9p::URA3-GAL1p)						
-		Sc EUG5	YM	30	96	0.179
-		Sc EUG5	YM	30	168	0.230
-		Sc EUG5	YMO	30	96	0.232
HMG1Δ	pRS434GAP-HMG026	Sc EUG5	YM	30	96	0.093
	pRS434GAP-HMG044	Sc EUG5	YM	30	96	0.087
	pRS434GAP-HMG056	Sc EUG5	YM	30	96	0.106
	pRS434GAP-HMG062	Sc EUG5	YM	30	96	0.132
	pRS434GAP-HMG076	Sc EUG5	YM	30	96	0.148
	pRS434GAP-HMG081	Sc EUG5	YM	30	96	0.140
	pRS434GAP-HMG100	Sc EUG5	YM	30	96	0.184
	pRS434GAP-HMG112	Sc EUG5	YM	30	96	0.340
	pRS434GAP-HMG122	Sc EUG5	YM	30	96	0.127
	pRS434GAP-HMG133	Sc EUG5	YM	30	96	0.714
HMG1	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG8	YM	30	96	0.074
BTS1	pRS435GAP-BTS1	Sc EUG8	YM	30	96	1.42
	pRS445GAP-BTS1	Sc EUG8	YM	30	96	0.067
-		Sc EUG12	YM	30	72	0.081
-		Sc EUG12	YM	30	96	0.194
-		Sc EUG12	YM	30	168	0.335
HMG1	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG12	YM	30	96	0.705
	pRS444GAP-HMG1	Sc EUG12	YM	30	96	2.05
ERG20	pRS435GAP-ERG20	Sc EUG12	YM	30	72	6.63
	pRS435GAP-ERG20	Sc EUG12	YM	30	96	0.260
	pRS445GAP-ERG20	Sc EUG12	YM	30	96	0.381
BTS1	pRS435GAP-BTS1	Sc EUG12	YM	30	96	1.75
	pRS445GAP-BTS1	Sc EUG12	YM	30	96	3.20
HMG1Δ	pRS434GAP-HMG026	Sc EUG12	YM	30	96	0.629
	pRS434GAP-HMG044	Sc EUG12	YM	30	96	0.428
	pRS434GAP-HMG056	Sc EUG12	YM	30	96	0.402
	pRS434GAP-HMG062	Sc EUG12	YM	30	96	0.445
	pRS434GAP-HMG076	Sc EUG12	YM	30	96	0.479
	pRS434GAP-HMG081	Sc EUG12	YM	30	96	0.488
	pRS434GAP-HMG100	Sc EUG12	YM	30	96	0.440
	pRS434GAP-HMG112	Sc EUG12	YM	30	96	0.534
	pRS434GAP-HMG122	Sc EUG12	YM	30	96	0.499
	pRS434GAP-HMG133	Sc EUG12	YM	30	96	0.440
-		Sc EUG27	YM	30	96	0.053
HMG1	pRS434GAP-HMG1	Sc EUG27	YM	30	96	0.723
	pRS444GAP-HMG1	Sc EUG27	YM	30	96	0.205
ERG20	pRS435GAP-ERG20	Sc EUG27	YM	30	96	0.661
	pRS445GAP-ERG20	Sc EUG27	YM	30	96	0.297
BTS1	pRS435GAP-BTS1	Sc EUG27	YM	30	96	0.761
	pRS445GAP-BTS1	Sc EUG27	YM	30	96	0.595

(4-2) A451 での *ERG20*、*BTS1* 発現

融合遺伝子を A451 で発現させたときのプレニルアルコールの生産量の変化を図 25 に示す。図 25 において、435GGF は pRS435GGF を示し、435GGFHDE

L は pRS435GGFHDEL を示した（以下同様）。OD_{600} は 600nm の吸光度を示す。図 25 には、融合遺伝子でない *BTS1* 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを A451 に導入した時の結果（435GG）も示した。

pRS445GAP-BTS1（図中では「445GG/A451」と表記）を導入したときにおいても、平均 0.44 mg/l の GGOH 生産量が認められた。

(4-3) YPH499 での *ERG20*、*BTS1* 発現

融合遺伝子を YPH499 で発現させたときの GGOH の生産量の変化を図 26 に示す。図 26 において、499 は YPH499 を示し、435GGF は pRS435GGF を、445GGFFHDEL は pRS445GGFHDEL を示す（以下同様）。図 26 には、融合遺伝子でない *BTS1* 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを YPH499 に導入した時の結果とあわせて示した。

pRS435GAP-BTS1 導入（図中では「435GG/499」と表記）で平均 0.11 mg/l の GGOH 生産量が認められ、*ERG20* と *BTS1* 融合遺伝子を組み込んだ pRS435FGG（図中では「435FGG/499」と表記）導入で平均 0.20 mg/l の GGOH、pRS435GGF（図中では「435GGF/499」と表記）導入で平均 0.39 mg/l の GGOH、pRS35GGFHDEL（図中では「435GGFHDEL/499」と表記）導入で平均 0.62 mg/l の GGOH 生産が認められ、融合遺伝子や HDEL 配列による GGOH 生産性向上の効果がみられた。

(4-4) YPH499 での *HMG1*、*ERG20*、*BTS1* 発現

本発明者は、YPH499 において、*HMG1* 発現ベクターを導入した株 pRS434GAP-HMG1/YPH499(YH1)と pRS434TEF-HMG1/YPH499 を宿主にして、*HMG1* との共発現により GGOH をより多く生産する株が得られるかもしれないと考えた。

既に作製した pRS434TEF-HMG1 を YPH499 へ導入した株を宿主にして、融合遺伝子でない *ERG20* や *BTS1* 遺伝子を組み込んだ発現ベクターをさらに導入した時のプレニルアルコール生産量を図 27 に示す。図 27 において、434TEFp-HMG1 は pRS434TEF-HMG1 を導入した株を表す。*TEF*p は *TEF2* 遺伝子の転写プロモーターである。499 は YPH499 を示し、435F は pRS435GGF を、445F は pRS445GGF を示した（以下同様）。*BTS1* 単独導入では GGOH 生産量が 0.11 mg/l であった。これに対し、*TEF2*p-*HMG1* 導入株を宿主として *BTS1* 発現

ベクターを導入すると、GGOH 生産量が平均 0.40 mg/l になり（図中、435GG & 434TEFp-HMG1/499)、*GAP*p-*HMG1* 導入株を宿主として *BTS1* 発現ベクターを導入すると、GGOH は 0.49 mg/l 生産された（図中、435GG & 434GAPp-HMG1/499)。従って、HMG-CoA 還元酵素遺伝子とプレニル二リン酸合成酵素遺伝子との共発現によるプレニルアルコール大量生産系の可能性が示された。

次に、*GAP*p-*HMG1* を導入した YH1 (pRS434GAP-HMG1/ YPH499)を宿主として、本発明において作製した *ERG20-BTS1* 融合遺伝子や HDEL シグナルを含んだ遺伝子を *TDH3* 転写プロモーター *GAP*p(*TDH3*p)により発現させたときのプレニルアルコール生産量を測定した。

結果を図 28 に示す。図 28 において、434GAPp-HMG1 は pRS434GAP-HMG1 を導入した株を表す。*GAP*p は *TDH3* 遺伝子の転写プロモーターである。HDEL シグナルを導入したプレニル二リン酸合成酵素遺伝子と *HMG1* とを共発現させ、さらに、*ERG20-BTS1* 融合遺伝子導入により GGOH の生産性が向上した。特に pRS435GGF や pRS435GGFHDEL 導入株で顕著であり、平均でそれぞれ 1.55 mg/l、1.50 mg/l の GGOH 生産を記録した（図中、435GGF & 434GAPp-HMG1/499、435GGFHDEL & 434GAPp-HMG1/499)。

(4-5) 大豆油含有培地でのプレニルアルコール生産性

次に、本発明で作製した GGOH 生産株である *ERG20-BTS1* 融合遺伝子導入株を YM7(YM, pH7)培地と YMO(YM7, 0.1% アデカノール LG109, 1% soybean oil)培地で 4 日から 7 日培養し、プレニルアルコール生産量を測定した。A451 系統の株を宿主としたときの結果を図 29A、29B に示し、YPH499 系統の株を宿主としたときの結果を図 30A、30B に示した。図 29A、29B において、AH1 は pRS434GAPp-HMG1/A451、GGFHDEL は pRS435GGFHDEL を示す。「-1」は 4 日培養後の生産量、「-2」は 7 日培養後の生産量を示す。YMO 培地では大豆油懸濁のため菌体量を細胞数で示した。「10^3 cell/ul」は 1 マイクロリットルあたりの細胞数を 1000 で割った値を示す。

pRS435GGF/ A451 は、YM7 培地で 7 日培養したときの生産量（図 29A、上パネル GGF/A451 -2）が平均 0.26 mg/l GGOH であったのに対し、YMO 培地中では平均 0.98 mg/l（図 29B、上パネルの GGF/A451 -2）と生産量が増加した。pRS434GAP-HMG1 を A451 に導入した AH1 株を宿主にしたときでも、pRS43

5GGFHDEL を導入した場合は、平均 2.5 mg/l の GGOH を生産し（図 29B、中央パネル、GGFHDEL/AH1 -2)、最大で 3.5 mg/l の GGOH を記録した（表 11、遺伝子名 435GGFHDEL の項)。A451 株の *ERG9* の転写プロモーターを *GAL1* 転写プロモーターで置換した EUG5（実施例 6 参照）を宿主にした場合でも、pRS435GGF 導入により、YM7 培地、7 日間培養で平均 6.6 mg/l GGOH であったものが（図 29A、下パネルの GGF/EUG5 -2)、YMO 培地で培養すると平均 9.6 mg/l の GGOH を生産するようになった（図 29B、下パネルの GGF/EUG5 -2)。

YMO 培地による GGOH 生産性向上は YPH499 系統の株を宿主にしたときにも観察され（図 30A、30B)、pRS435GGF を導入した YPH499 を YM7 で 7 日間培養したときに平均 0.19 mg/l であったものが（図 30A、上パネルの GGF/YPH499 -2)、YMO 培地では平均 2.5 mg/l の GGOH を生産した（図 30B、上パネルの GGF/YPH499 -2)。さらに *HMG1* を共発現する YH1 株に pRS435GGF や pRS435GGFHDEL を導入したものを YMO 培地で培養すると、7 日培養後どちらも平均 5.6 mg/l の GGOH を生産した（図 30B、中央パネルの GGF/YH1 -2, GGFHDEL/YH1 -2)。EUG5 と同様にして YPH499 から作製した EUG12 株（実施例 6 参照）を宿主にしたときには、pRS435GGF や pRS435GGFHDEL 導入株で 3.7-4.0mg/l 程度の GGOH を生産した。従って、YPH499 株では、*HMG1* とプレニル二リン酸合成酵素遺伝子との組合せで GGOH の生産性向上が見込める事が示された。

〔実施例 11〕 各グルコース-ガラクトース糖組成培地によるプレニルアルコール生産への影響

(1) ベクターの宿主への導入及び培養

本実施例では、各グルコース(Glc)-ガラクトース(Gal)糖組成変化により出芽酵母のプレニルアルコール生産がどう変わるかを確認する。併せて、*BTS1-ERG20* 融合遺伝子発現によるプレニルアルコール生産への効果も調べる。

Zymo Research (Orange, CA) より購入した Frozen EZ yeast transformation II kit を用いて酵母にベクターの導入を行った。*ERG20*、*BTS1* 融合遺伝子発現ベクターとして pRS435GGF、pRS435GGFHDEL を用いた。また、宿主と

してA451、YPH499、AH1、YH1、EUG5、EUG12を用いた。形質転換体は、SGR培地をベースにして適宜栄養要求性を指標とした選択培地寒天プレート上で生育させた。クローン化のため、選択培地寒天プレート培養は2回行った。

作製した形質転換体をSGR選択培地で前培養し、0.01-0.05mlの前培養液を1-5mlのYM7にそれぞれ加え、18mm径の試験管で30℃、130r.p.m.の往復振盪培養条件で培養した。YM7培地の糖成分（GlcとGalとの組成比）として、0%Glc-100%Gal、20%Glc-80%Gal、50%Glc-50%Gal、75%Glc-25%Gal、100%Glc-0%Galの組成の各培地を作製し、これらの培地でまず30℃、130r.p.m.の往復振盪培養条件で培養した。2日培養後、終濃度5%になるようにGlcをさらに加え、培養を7日目まで継続した。

(2) 結果

(2-1) A451のGGOH生産

A451にpRS435GGF、pRS435GGFHDELを導入したときのGGOH生産の結果を図31A-Cに示す。この場合は、GGOHはほとんど検出されなかった。特徴的なのは、pRS435GGFHDEL/A451を4日培養したところ、初期条件20%Glcで GGOH生産量が最大値（平均0.56mg/l）をとったことである。

(2-2) AH1のGGOH生産

AH1にpRS435GGF、pRS435GGFHDELを導入したときのGGOH生産の結果を図32A-Cに示す。*BTS1-ERG20*融合遺伝子を導入したAH1でも、GGOH生産量は、2-4日培養の場合は初期条件20%Glcのときに GGOHの生産量が最大となり（3.32mg/l）、7日培養の場合は初期条件50-80%Glcのときに GGOHの生産量が最大となった（平均4.13mg/l）。

(2-3) EUG5のGGOH生産

EUG5にpRS435GGF、pRS435GGFHDELを導入したときのGGOH生産の結果を図33A-Cに示す。pRS435GGF導入株及びpRS435GGFHDEL導入株のいずれの場合も、2-4日の培養、初期条件20-80%Glcが良好であった。

(2-4) YPH499のGGOH生産

YPH499にpRS435GGF、pRS435GGFHDELを導入したときのプレニルアルコール生産の結果を図34A-Cに示す。この場合は、A451を用いたときと同様、

GGOH はほとんど検出されなかった。

(2-5) YH1 の GGOH 生産

YH1 に pRS435GGF、pRS435GGFHDEL を導入したときのプレニルアルコール生産の結果を図 35A-C に示す。7 日培養では、初期条件 100％Glc のときに GGOH の生産量が高かった。

(2-6) EUG12 の GGOH 生産

EUG12 に pRS435GGF、pRS435GGFHDEL を導入したときのプレニルアルコール生産の結果を図 36A-C に示す。初期条件 20％Glc のときに、いずれの場合（宿主、発現ベクター）でも高いプレニルアルコールの生産性を示した。pRS435GGF/EUG12 の初期条件 20％Glc、4 日培養の場合は、菌体が OD_{600}＝1.1 に相当する量であるのに対し、7.6mg/l FOH、5.4mg/l GGOH の生産性があった。これは、菌体あたりの生産性としては非常に効率が良いと考えられる。

〔実施例 12〕 pRS435GGF/ YH1 及び 15-2 のジャーファーメンター培養

(1) pRS435GGF/ YH1

GGOH を大量に生産するため、GGOH を優先的に 5.6 mg/l 生産した pRS435GGF/YH1 株（実施例 10 参照）を、以下の条件で でジャーファーメンターを用いて培養した。

＜ファーメンター培地＞

５％ グルコース（YM 中に１％グルコースが含まれており、終濃度６％になる）

YM broth（Difco 製）

3％ 大豆油（ナカライテスク製）

0.1％アデカノール LG109（旭電化製）

＜運転条件＞

培養装置：MSJ-U 10L 培養装置（丸菱バイオエンジ）

培地量：5L

培養温度：33℃

通気量：１vvm

アジテーション：300rpm

ｐＨ：４Ｎ水酸化ナトリウム溶液及び２Ｎ塩酸溶液を用い、以下のパラメーターでpHを比例制御

Proportional Band	1.00
Non Sensitive Band	0.15
Control Period	16 Sec
Full Stroke	1 Sec
Minimun Stroke	0 Sec

この結果、pRS435GGF/YH1 株において、115 時間培養後に GGOH を 128 mg/l 生産させることができた。このときスクアレン(SQ)は 15 mg/l、FOH は 5 mg/l、ネロリドール（NOH）はほとんど 0 であり、GGOH のみを大量に醗酵生産する系を作製することができた（図 37)。

(2) 15-2

実施例 7 に記載の 15-2 株(pYHMG044 を保持する AURGG101 株)を GSM-URA(BIO101 製)及びDOB(BIO101 製)培地(200ml/500mlバッフル付き三角フラスコ)にスラントより植菌し、30℃、130rpm で 2 日間培養した。次に、培養液に含まれているグルコースを完全に除くため、遠心(1500rpm、5 分、4℃)及び滅菌した生理食塩水による洗浄を 3 回繰り返した。その後、50ml の前培養液を用いて上記(1)pRS35GGF/YH1 と同様の条件でジャーファーメンターで培養した。ただし、用いた培地は以下の培地で温度は 26℃で培養した。

＜ファーメンター培地＞

５％　ガラクトース（YM 中に１％グルコースが含まれており、終濃度６％になる）

YMB without Amino Acids（Difco 製）

1%　大豆油（ナカライテスク製）

0.1％アデカノール LG109（旭電化製）

この結果 15-2 株において、150 時間培養後に GGOH を 3mg/l 以上 生産させることができた。(図 38)。

〔実施例 13〕融合遺伝子の発現

pRS435GGF と pRS435GGFHDEL を導入した細胞が融合遺伝子産物として計画どおりに発現しているかどうかを確かめるために、転写産物解析および翻訳産物解析をノーザンブロットハイブリダイゼーション法とウェスタンブロット法により行った。

(1) ノーザンブロットハイブリダイゼーション

YPH499 に pRS435GGF、pRS435GGFHDEL を導入した組換え体、YH1 に pRS435GGF、pRS435GGFHDEL を導入した組換え体におけるノーザンブロットハイブリダイゼーション法による転写産物解析結果を図 39 に示す。用いたプローブは、α-チューブリンをコードする *TUB1* 遺伝子コード領域中の DNA 断片、実施例 7 表 7 記載の *ERG20* プローブ、*BTS1* プローブ、*HMG1* プローブを用いた。*TUB1* プローブは次のオリゴヌクレオチド TUB1f-2 と TUB1r-2 を用いて実施例 7 と同様に作製し、RNA 調製、ノーザンブロット、ハイブリダイゼーション条件も実施例 7 と同様にして行った。

TUB1f-2: 5'-ACG GTA AGA AAT CCA AGC-3' （配列番号 119）
TUB1r-2: 5'-TAT GAG TCG GCA CCC ACT-3' （配列番号 120）

図 39 中「－」はプレニル二リン酸合成酵素を保持するプラスミドを導入していない細胞由来の RNA サンプル、「GGF」は pRS435GGF を導入した組換え体由来の RNA サンプル、「HDEL」は pRS435GGFHDEL を導入した組換え体由来の RNA サンプル、「HMG1」は YH1 株を宿主にした組換え体由来の RNA サンプルを示す。プローブ *TUB1*（チューブリンα遺伝子）の結果から調製した全てのサンプルについてほぼ同一量のメッセンジャーRNA が得られていることがわかる。プローブ *ERG20*、プローブ *BTS1* で過剰発現している共通の 3.1 kb バンドが検出されており融合遺伝子の転写が効率良く行われていることを示している。プローブ *ERG20* で検出された 1.8 kb のバンドはゲノム中の野生型 *ERG20* 遺伝子転写産物と考えられる。プローブ *HMG1* の結果からは、pRS434GAP-HMG1 をあらかじめ導入してある株（YH1 由来株、図 39 中「HMG1」で示したレーン）

では全て 4.1 kb の大量のプラスミド由来の *HMG1* 転写産物である RNA が検出され、プレニル二リン酸合成酵素発現プラスミドを第 2 のプラスミドとしてさらに導入しても *HMG1* の転写が効率良く行われていることを示している。

(2)ウェスタンブロット

ERG20 および BTS1 がコードするポリペプチドの C 末端配列にしたがって下記のアミノ酸配列を持つポリペプチドを化学合成し、これを抗原として定法（F. M. Ausubel *et al.* Ed, "Short Protocols in Molecular Biology, Fourth Edition"（1999） John Wiley & Sons, Inc., New York などの一般的な実験書に記載）に従ってマウス抗体を作成した。下記ペプチドは 2mg を用い、KLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）に架橋し抗原として用いた。

BTS1-C: NH2 Cys Tyr Ile Ile Asp His Leu Ser Glu Leu COOH （配列番号 121）
ERG20-C: NH2 Cys Leu Asn Lys Val Tyr Lys Arg Ser Lys COOH （配列番号 122）

YPH499、pRS435F/ YPH499、pRS435GGF/ YPH499、pRS435FGG/ YPH499、pRS435GGFHDEL/ YPH499、pRS435GGF/ YH1 の 6 株から次のようにして蛋白質を調製し、ウェスタンブロット解析を行った。各菌体は、選択培地（YPH499 には SD 培地 DOB(ドロップアウトベース:グルコースを炭素源とする最少培地)にアミノ酸または核酸成分として CSM（コンプリートサプリメントミックスチャー）を加えたもの)、pRS435F/ YPH499 には SD-L（SD 培地から Leu を除いたもの）培地、pRS435GGF/ YPH499 には SD-L 培地、pRS435FGG/ YPH499 には SD-L 培地、pRS435GGFHDEL/ YPH499 には SD-L 培地、pRS435GGF/ YH1 には SD-LW（SD 培地から Leu、Trp を除いたもの）培地を使用）に前培養溶液（600nm での吸光度を測定し、菌量が等量となる様に生理食塩水で希釈したもの）を接種し、30℃、130r.p.m.で 4 日間振とう培養した。遠心機を用いて集菌後、菌体湿重量 1 g あたり 2ml の Y-PER（PIERCE, Rockford, IL）を添加し、室温で 1 時間激しく攪拌して全蛋白質溶液を調製した。得られた全蛋白質 20 μg

を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE：手順は Short Protocols in Molecular Biology, Fourth Edition (1999) John Wiley & Sons, Inc., New York）で分子量に従って分離し、ウェスタンブロット法（Short Protocols in Molecular Biology, Fourth Edition (1999) John Wiley & Sons, Inc., New York）で組換え体に導入した遺伝子の発現状況を確認した。なお今回実施のウェスタンブロット法では、以下の点を定法から改変した。

1）PVDF 膜の一次抗体処理条件

定法で PVDF 膜は、一次抗体の TBST10-1000 倍希釈溶液中で 30-60 分振盪。

改変後は上述の抗ペプチド抗体の TBST2000 倍希釈溶液中で 60 分振盪。

2）PVDF 膜の洗浄条件

定法では 200ml の TBST 溶液で 15 分間ずつ 4 回洗浄。

改変後は 80ml の TBST 溶液で 5 分間ずつ 5 回洗浄。

3）PVDF 膜の二次抗体処理

定法では抗 IgG（H+L）アルカリフォスファターゼコンジュゲートをブロッキング溶液で 200-2000 倍に希釈し、PVDF 膜を浸し 30-60 分振盪。

改変後は、PVDF 膜を抗マウス IgG（H+L）アルカリフォスファターゼの TBST4000 倍希釈溶液に浸し、30 分振盪。

4）抗原蛋白質のバンド検出法

定法では TBST、TBS で洗浄した PVDF 膜を BCIP（4-bromo-4choro-3indoil - phospate）、NBT（nitro blue tetrazolium）混液に 30 分間浸漬し、発色。

改変後は、TBST、TBS で洗浄した PVDF 膜を ProtoBlot II AP System with Stabilized Substrate・Mouse 溶液（Promega, Madison, WI）に 20-40 秒浸漬し、発色。

ウェスタンブロット解析の結果を図 40 に示す。図 40 中「M」は分子量マーカー、「F」「GGF」「FGG」「GGFHDEL」「GGF/YH1」はそれぞれ「pRS435F/YPH499」「pRS435GGF/YPH499」「pRS435FGG/YPH499」「pRS435GGFHDEL/YPH499」「pRS435GGF/YH1」由来の蛋白質を電気泳動したレーンを示す。

BTS1 がコードするポリペプチドを検出する抗 BTS1-C マウス抗体を用いた場合、約 79kDa の融合蛋白質（GGF、FGG および GGFHDEL）に相当するポリペプチドが検出された（図 40 中白抜き三角で示した移動度のバンド）。この結果から、pRS435GGF、pRS435GGFHDEL を導入した組換え体において *ERG20-BTS1* 融合遺伝子由来の FPP 合成酵素-GGPS 合成酵素融合蛋白質が実際に発現していることがわかった。また YPH499 由来の蛋白質でも検出されたバンドが無いことから、非組換え細胞では *BTS1* 遺伝子にコードされた GGPP 合成酵素は発現量が微量だと言うことが予想された。

pRS435F 導入株（レーン「F」）では *ERG20* がコードするポリペプチドを検出する抗 ERG20-C マウス抗体で *ERG20* がコードしている FPP 合成酵素に相当する分子量（約 40kDa）を示す蛋白質の発現量が増加していることが示され（図中黒三角で示した移動度のバンド）、pRS435GGF 導入株（レーン「GGF」）と pRS435GGFHDEL（レーン「GGFHDEL」）導入株では融合蛋白質（GGF および GGFHDEL）に相当するポリペプチドが検出された（図中白抜き三角で示した 79kDa に相当する移動度約を示したバンド）。抗 ERG20-C 抗体では、pRS435FGG 導入株で発現しているであろう融合遺伝子が検出されていないが、これは FPP 合成酵素の C 末端側に GGPP 合成酵素を融合させているため、FPP 合成酵素の C 末端側を認識する抗 ERG20-C 抗体がうまく融合酵素を認識できなかったことが原因と考えられる。抗 ERG20-C 抗体で検出されたその他のバンドのうち、約 45kDa のバンドは、非特異的に検出された蛋白質と予想され、40kDa 未満のバンドは、非特異的に検出された蛋白質または *ERG20* 遺伝子がコードするアミノ酸配列を含んだ蛋白質の分解産物と予想される。

〔実施例 14〕HMG-CoA 還元酵素遺伝子と GGF 融合遺伝子とを共発現させたときの GGOH 生産

HMG-CoA 還元酵素遺伝子と、GGPP 合成酵素-FPP 合成酵素融合蛋白質遺伝子である *BTS1-ERG20* 融合遺伝子の発現を強化すれば、YPH499（ATCC76625, *MATa ura3*-52 *lys2*-801 *ade2*-101 *trp1*Δ63 *his3*Δ200 *leu2*Δ1）以外の株でも工業的に有用な GGOH 生産株が得られるかどうかを確認するために、以下の株を

宿主に用いてpRS434GAP-HMG1とpRS435GGFとpRS435GGFHDELを順次導入した。

INVSc1（*MATa/MATα ura3*-52/*ura3*-52 *trp1*-289/*trp1*-289 *his3*Δ1/*his3*Δ1 *leu2/leu2*）

YPH500（ATCC76626, *MATα ura3*-52 *lys2*-801 *ade2*-101 *trp1*Δ63 *his3*Δ200 *leu2*Δ1）

YPH501（ATCC76627, *MATa/MATα ura3*-52/*ura3*-52 *lys2*-801/*lys2*-801 *ade2*-101/*ade2*-101 *trp1*Δ63/*trp1*-Δ63 *his3*Δ200/*his3*Δ200 *leu2*Δ1/*leu2*Δ1）

W303-1A（ATCC208352, *MATa leu2*-3 *leu2*-112 *his3*-11 *ade2*-1 *ura3*-1 *trp1*-1 *can1*-100）

W303-1B（ATCC208353, *MATα leu2*-3 *leu2*-112 *his3*-11 *ade2*-1 *ura3*-1 *trp1*-1 *can1*-100）

INVSc1、YPH500、YPH501、W303-1A、W303-1BにpRS434GAP-HMG1を導入した株をそれぞれ、IH1、YH2、YH3、WH1、WH2とした。これらIH1、YH2、YH3、WH1、WH2を宿主としpRS435GGFを導入し、GGF/IH1、GGF/YH2、GGF/YH3、GGF/WH1、GGF/WH2を得、pRS435GGFHDELを導入し、HDEL/IH1、HDEL/YH2、HDEL/YH3、HDEL/WH1、HDEL/WH2を得た。得られた組換え体をYPDO7rich培地で培養しプレニルアルコール生産性を測定した結果が図41である。どの組換え体でもGGOHを優先的に生産し、ほとんどの株で100mg/l以上のGGOHを生産しており、特にHDEL/YH2株では最大で189mg/lのGGOHを生産した。

〔実施例15〕HMG-CoA還元酵素遺伝子とGGF融合遺伝子との共発現株をprototroph及び二倍体化したときのGGOH生産

GGOH生産株であるGGF/YH1をもとに、栄養要求性の原因となる変異型遺伝子を野生型遺伝子で置換し、さらにYPH500由来株と接合させ原栄養体株（prototroph；培地に特定の栄養が補給されなくても増殖できる株）かつ二倍体

化したGGF/YH3-AHKU株を下記のようにして作製した。

(1) GGF/YH1への*HIS3*、*ADE2*導入と、YPH500への*LYS2*、*URA3*導入

制限酵素*Pvu*IIと*Xho*Iで切断したpRS403GAPを鋳型にしHIS3-L（5' TTT TAA GAG CTT GGT GAG CGC 3'（配列番号123））とHIS3-R(5' TCG AGT TCA AGA GAA AAA AAA 3'（配列番号124））オリゴヌクレオチドをプライマーDNAに用いて次のような条件でPCRを行い*HIS3*断片を調製した。

0.1μg/L 鋳型DNA	1	μL
100pmol プライマーDNA 1	1	μL
100pmol プライマーDNA 2	1	μL
10x Pyrobest バッファー	10	μL
2mM dNTPmix	8	μL
5u/μL Pyrobest DNA ポリメラーゼ	0.5	μL
H_2O	78.5	μL

同様にして、PvuIIとXhoIで消化したpRS406GAPを鋳型に用い、URA3-L（5' TTC AAT TCA TCA TTT TTT TTT 3'（配列番号125））とURA3-R（5' GGG TAA TAA CTG ATA TAA TTA 3'（配列番号126））とをプライマーDNAに用いて*URA3*断片を調製した。

A451ゲノムDNAを鋳型にし、ADE-1（5' ATG GAT TCT AGA ACA GTT GGT 3'（配列番号127））とADE-2（ 5' TTA CTT GTT TTC TAG ATA AGC 3'（配列番号128））オリゴヌクレオチドをプライマーDNAに用い、または、LYS-1（5' ATG ACT AAC GAA AAG GTC TGG 3'（配列番号129））とLYS-2（5' TTA AGC TGC TGC GGA GCT TCC 3'（配列番号130））オリゴヌクレオチドをプライマーDNAに用いて同様の反応条件で*ADE2*断片および*LYS2*断片を調製した。調製した*HIS3*断片と*ADE2*断片をpRS435GGF/YH1に順次導入し、ヒスチジン非要求性かつ、アデニン非要求性を表現型として示したpRS435GGF/YH1-AHを得、*LYS2*断片と*URA3*断片をYPH500に順次導入し、リジン非要求性かつウラシル非要求性を表現型として示したYPH500-KUを得た。

(2) 接合

pRS435GGF/YH1-AH と YPH500-KU を YM 培地で 30℃で培養後 DOB(drop out base) 寒天プレート培地に 2 株が交わるようにストリークし、30℃で 3 日間インキュベートした。出現してきたコロニーをとり、前胞子形成プレート培地（1.6g 酵母エキス, 0.6g ポリペプトン, 100 mL 20% グルコース, 4g 寒天/ 1L）上で培養後、胞子形成プレート培地（2g 酢酸カリウム, 0.2g 酵母エキス, 500 μL 20% グルコース, 4g 寒天/ 1L）上で培養後顕微鏡観察により胞子形成を確認した。最小培地である DOB プレート上で生育することにより原栄養株(prototroph)化を確認し、胞子形成培地上で胞子形成することにより二倍体（diploid）化を確認したクローンを GGF/YH3-AHKU とした。

〔実施例 16〕Fed-Batch 培養による GGOH 生産(1)

GGF/YH3-AHKU を以下の条件でフェドバッチ（Fed-Batch）培養し、GGOH 生産量を測定した。

(1) プレシード

培地組成は以下の通り。酵母エキス 5g/L, 麦芽エキス 5g/L, バクトペプトン 10g/L, グルコース 5g/L。

培地の pH は無調整とした。500ml 坂口フラスコに 50ml の培地を張り込み 120℃で 20min 殺菌した。スラントより GGF/YH3-AHKU を一白金耳掻き取り、30℃、120rpm で往復振とう培養した。培養は 24 時間とした。OD（26 倍希釈、562nm）は 0.4 に達した。

(2) シード

培地組成は以下の通り。グルコース 20g/L, 豆濃（味の素株式会社製）310mg/L（総窒素量として）, KH_2PO_4 3g/L, $MgSO_4$ 0.5g/L, 硫酸アンモニウム 5g/L, $CaCl_2$ 0.5g/L, 消泡剤 0.1ml/L。豆濃中の総窒素濃度が 63g/L である場合、豆濃自体の添加液量は 4.9ml/L となる。

培地成分を完全に溶解させた後、KOH 溶液にて pH を 5.0 に調整し、液量をあわせた後、120℃で 20min 殺菌した。

培養には、1 リットル容ミニジャーを使用した。300ml 張り込みで、プレシード接種ボリュームは 0.06～1ml とした。プレシードを接種する前に、培地の pH を 5.5 に合わせた。通気は 1/2vvm とし、温度は 30℃に設定した。pH は 5.5 にアンモニアでコントロールした。攪拌は 500rpm でスタートし、溶存酸素（DO）＞20％となるようにカスケード制御を行った。PH が上昇した時点でシードを修了した。OD（51 倍希釈、562nm）は 0.18～0.2 に到達した。なお溶存酸素は、飽和時を 100％として算出した値である。

(3) メイン

培地組成は表 12 の通り。全容に対し、A 区、B 区、C 区、D 区はそれぞれ 20％、20％、30％、20％の液量にフィルアップした。コーンスティープリカー（CSL）は硫酸で pH を 2.0 にあわせた後、80℃で一時間、予殺を行った。また添加濃度は総窒素量を基準とし、CSL 濃度の総窒素量は 31.4g/L だった。それぞれ 120℃、20min で殺菌した後混合し、液量を補正した後ベッセルに投入した。

表 12

組成	濃度	区分
グルコース	2g/l	A 区
$MgSO_4$	1.7g/l	
硫安	3g/l	B 区
KH_2PO_4	10g/l	
CSL	2.3g/l	
消泡剤	0.26ml/l	C 区
H_2SO_4	pH = 2.0	
予殺	80℃ × 60 min	
$CaCl_2$	0.7g/l	D 区

培養には 1 リットル容ミニジャーを使用した。10％シードで、300ml 張り込みした。殺菌後培地の pH は 2.6 程度であったので、シード接種前に pH を上げた。通気は 1/2vvm、温度は 30℃とし、pH は 5.5 にアンモニアで制御した。攪拌は 500rpm よりスタートし、DO＞20％のカスケード制御を行った。グルコースフィ

ードは培養 2 時間目より図 42 に示したように、随時流速を上げていく形で行った。最大流速は 3.5ml/hr、約 5.8g/l/hr グルコース相当とした。DO>20％を制御値とし、攪拌による溶存酸素確保が困難な場合、通気量を増加して対応した。培養約 20 時間でフィード設定量が投入され、この時の到達 OD（101 倍希釈、562nm）は 0.9～1.0 であった。

以降、培養条件に応じてフィードその他のパラメーターを変更した。

(4) 培養条件検討

培養 20 時間目までは同一条件下で菌体を形成させておき、以降グルコース、エタノールの GGOH 生成に与える影響について検討した。

400g/l のエタノール（区分 1）と 500g/l のグルコース液（区分 2）とをフィードした。さらに区分 1 のエタノール溶液と区分 2 のグルコース液とを 1:1 に混合して区分 3 とした。フィード流速は 3.5ml/hr を最大とし、いずれの区分においても培養液中の基質濃度が 1.0g/l 以下になるよう、流速を調整した。生成した GGOH 蓄積量を表 13 に示す。エタノールを炭素源としてフィードすることによって、GGOH 蓄積量が増加することが判明した。

表 13

	GGOH 蓄積量（g/l）
区分 1	1．16
区分 2	0．47
区分 3	0．58

〔実施例 17〕Fed-Batch 培養による GGOH 生産(2)

200m l の DOB（dropout base）グルコース最少培地（Q·BIOgene, Carlsbad, CA）に GGF/YH3-AHKU 株を植菌し、30℃、3 日間回転培養した。次に、0.09% グルコース、0.075% KH_2PO_4、0.14% 硫酸マグネシウム、0.45% 硫酸アンモニウム、5.4% コーンスティープリカー、0.031% 塩化カルシウム、0.15% アデカノール LG109（旭電化）を含む 3.35L の培地（アンモニア水で pH5.5 に調整しておく）に全量を植菌し以下の条件で培養を行った。培養は、バッチ（Jar1, Jar2, Jar3）で行った。

培養装置：MSJ-U2W （10L ファーメンター）（丸菱バイオエンジ, 東京都千代田区）

培養温度：33℃

通気量：0.74 vvm

攪拌速度：900 rpm

pH5.5 （4N 水酸化ナトリウム溶液と 2N 硫酸溶液で調整）

4 時間培養の後、40% グルコース溶液のフィードを開始した。21 時間培養後 Jar2 はフィード液を 40% グルコース、3.3% 酢酸アンモニウム溶液に切り替え、Jar3 はフィード液を 1.65%酢酸アンモニウム、50%エタノール、20%グルコース溶液に切り替え、さらに培養を続けた。適宜培養液を無菌的に抜き取りプレニルアルコールを実施例 8 と同様に分析、定量した。培地中の糖濃度が 0.1%以下になるようにフィードレートを調整した（最大 18.7 g/h)。

この結果、FOH の生成を最小限にし、効率的に微生物による GGOH 生産が可能であることが示された（表 14)。グルコースに加えて、エタノール、酢酸アンモニウムをフィードすることにより培養液中の GGOH 濃度は 2.5g/l に達した。

表 14

Jar1 (フィード液: 40%グルコース)

培養時間 (h)	0	21	45	69	93	117	165
FOH (mg/L)	0.0	2.0	1.0	8.0	19	24	23
GGOH (mg/L)	0.0	27	35	190	660	840	890
OD600	0.0	52	86	93	120	120	110

Jar2 (フィード液: 40%グルコース、3.3% 酢酸アンモニウム)

培養時間 (h)	0	21	45	69	93	117	165
FOH (mg/L)	0.0	1.0	1.0	1.0	0.3	0.8	5.0
GGOH (mg/L)	0.0	26	56	120	37	100	710
OD600	0.0	49	91	120	120	120	170

Jar3 (フィード液: 20% グルコース、1.65% 酸アンモニウム、50% エタノール)

培養時間 (h)	0	21	45	69	93	117	165
FOH (mg/L)	0.0	2.0	4.0	17	33	38	77
GGOH (mg/L)	0.0	30	210	550	830	1000	2500
OD600	0.0	63	160	160	120	140	120

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明により、プレニルアルコールの製造方法が提供される。本発明によれば、プレニルアルコール（特にゲラニルゲラニオール）を大量に入手できるため、生体内において重要な物質の生産に利用することができる点で、また、活性型プレニルアルコールの新たな生理活性を見出すための試薬として利用できる点で、本発明の方法は有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号 24:合成ペプチド

配列番号 25～120: 合成 DNA

配列番号 121: 合成ペプチド

配列番号 122: 合成ペプチド

配列番号 123～130: 合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコールの製造方法。
2. プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAと、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAとを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコールの製造方法。
3. プレニルアルコールがゲラニルゲラニオールである請求項１又は２に記載の製造方法。
4. プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAと、イソペンテニルニリン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAとを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からゲラニルゲラニオールを採取することを特徴とするゲラニルゲラニオールの製造方法。
5. プレニルニリン酸合成酵素遺伝子が、以下の(a)及び(b)の遺伝子並びに(c)及び(d)の融合遺伝子からなる群から選択されるいずれかのものである請求項 1～４のいずれかに記載の製造方法。

(a)ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(b) ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(c) ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子と、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子との融合遺伝子

(d) 上記(a)若しくは(b)の遺伝子又は(c)の融合遺伝子に、さらに His Asp

Glu Leu で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が付加された融合遺伝子

6. ファルネシル二リン酸合成酵素遺伝子が配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列をコードするものである請求項5記載の製造方法。

7. ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子が配列番号6に示されるアミノ酸配列をコードするものである請求項5記載の製造方法。

8. ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からゲラニルゲラニオールを採取することを特徴とするゲラニルゲラニオールの製造方法。

9. ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAと、以下の(e)～(j)からなる群から選択されるいずれかの遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAとを、宿主に導入して組換え体を作製し、該組換え体を培養した後、得られる培養物からゲラニルゲラニオールを採取することを特徴とするゲラニルゲラニオールの製造方法。

(e) イソペンテニル二リン酸Δ-イソメラーゼ遺伝子

(f) メバロン酸キナーゼ遺伝子

(g) アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ遺伝子

(h) ヒドロキシメチルグルタリル-CoA合成酵素遺伝子

(i) メバロンリン酸キナーゼ遺伝子

(j) メバロン二リン酸脱炭酸酵素遺伝子

10. ゲラニルゲラニオールが少なくとも0.05mg/lの濃度である請求項3～9のいずれかに記載の製造方法。

11. 宿主が酵母又は大腸菌である請求項1～10のいずれかに記載の製造方法。

12. 酵母がサッカロマイセス・セレビシエである請求項11記載の製造方法。

13. サッカロマイセス・セレビシエが、サッカロマイセス・セレビシエA451株、YPH499株、YPH500株、W303-1A株若しくはW303-1B株又はこれらに由

来する株である請求項 12 記載の製造方法。

14. 以下の(a)及び(b)の遺伝子並びに(c)及び(d)の融合遺伝子からなる群から選択されるいずれかのもの、並びに転写プロモーター及び転写ターミネーターを含む発現用組換え DNA。

(a) ファルネシル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(b) ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(c) ファルネシル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子と、ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子との融合遺伝子

(d) 上記(a)若しくは(b)の遺伝子又は(c)の融合遺伝子に、さらに His Asp Glu Leu で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が付加された融合遺伝子

15. 転写プロモーターが、*ADH1* プロモーター、*TDH3*（*GAP*）プロモーター、*TEF2* プロモーター、*GAL1* プロモーター及び *tac* プロモーターからなる群から選ばれるいずれかのものである請求項 14 記載の組換え DNA。

16. 転写ターミネーターが、*CYC1* ターミネーターである請求項 14 記載の組換え DNA。

17. 請求項 14～16 のいずれかに記載の組換え DNA を宿主に導入してなる組換え体。

18. 宿主が酵母又は大腸菌である請求項 17 記載の組換え体。

19. 酵母がサッカロマイセス・セレビシエである請求項 18 記載の組換え体。

20. サッカロマイセス・セレビシエが、サッカロマイセス・セレビシエ A451 株、YPH499 株、YPH500 株、W303-1A 株若しくは W303-1B 株又はこれらに由来する株である請求項 19 記載の組換え体。

21. 原栄養体株である請求項 18～20 のいずれかに記載の組換え体。

22. 二倍体細胞である請求項 18～20 のいずれかに記載の組換え体。

23. 原栄養体株かつ二倍体細胞である請求項 18～20 のいずれかに記載の組換え体。

24. 以下の(i)-(vi)のいずれかの成分を含む培地を用いてプレニルアルコールの

生産力を有する微生物を培養し、得られる培養物からプレニルアルコールを採取することを特徴とするプレニルアルコールの製造方法。

(i) 糖

(ii) アルコール

(iii) アンモニアガス、アンモニア水及び又はアンモニウム塩

(iv) 水酸化ナトリウムと硫酸との混合物

(v) KH_2PO_4、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、コーンスティープリカー、塩化カルシウム及び界面活性剤の混合物

(vi) 上記(i)-(v) のうち 2 種以上の混合物

25. 以下の(i)、(ii)若しくは(iii)の成分又はこれらの 2 種以上の混合物を含む溶液をフィード液として培養することを特徴とする請求項 24 記載の製造方法。

(i) 糖

(ii) アルコール

(iii) アンモニアガス、アンモニア水及び又はアンモニウム塩

26. 培養開始後 12 - 24 時間までのフィード液中の炭素源成分をグルコースのみとし、その後フィード液の炭素源成分をエタノールを含む成分に切り替えて培養することを特徴とする請求項 24 記載の製造方法。

27. 培養開始後 12 - 24 時間経過後におけるフィード液の炭素源成分中の全炭素源成分に対するエタノールの割合が 50%以上である請求項 24 記載の製造方法。

28. 培養開始後 12 - 24 時間経過後におけるフィード液の炭素源成分がエタノールのみである請求項 24 記載の製造方法。

29. 培養物中に蓄積するプレニルアルコールの濃度が少なくとも 0.1 g/l 以上である請求項 24 記載の製造方法。

30. 培養物中に蓄積するプレニルアルコールの濃度が少なくとも 1 g/l 以上である請求項 24 記載の製造方法。

31. プレニルアルコールがゲラニルゲラニオールである請求項 24 記載の製造方法。

32. 微生物が酵母である請求項 24 記載の製造方法。

33. 酵母がサッカロマイセス・セレビシエである請求項32記載の製造方法。

34. サッカロマイセス・セレビシエが、サッカロマイセス・セレビシエA451株、YPH499株、YPH500株、W303-1A株若しくはW303-1B株又はこれらに由来する株である請求項33記載の製造方法。

35. 微生物が組換え体である請求項24記載の製造方法。

36. 組換え体が、メバロン酸経路関連遺伝子若しくはその変異型遺伝子、又はプレニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAを、宿主に導入して作製されたものである、請求項35記載の製造方法。

37. 組換え体が、プレニルニリン酸合成酵素遺伝子又はその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAと、メバロン酸経路関連遺伝子若しくはその変異型遺伝子を含む、発現用組換えDNA又はゲノムインテグレート用DNAとを、宿主に導入して作製されたものである請求項35記載の製造方法。

38. 宿主がサッカロマイセス・セレビシエである請求項36又は37記載の製造方法。

39. サッカロマイセス・セレビシエが、サッカロマイセス・セレビシエA451株、YPH499株、YPH500株、W303-1A株若しくはW303-1B株又はこれらに由来する株である請求項38記載の製造方法。

40. メバロン酸経路関連遺伝子がヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素遺伝子である請求項36又は37記載の製造方法。

41. ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素遺伝子が *HMG1* 遺伝子である請求項40記載の製造方法。

42. プレニルニリン酸合成酵素遺伝子が、以下の(a)及び(b)の遺伝子並びに(c)及び(d)の融合遺伝子からなる群から選択されるいずれかのものである請求項36又は37記載の製造方法。

(a) ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(b) ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子

(c) ファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子と、ゲ

ラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子若しくはその変異型遺伝子との融合遺伝子

(d) 上記(a)若しくは(b)の遺伝子又は(c)の融合遺伝子に、さらに His Asp Glu Leu で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が付加された融合遺伝子

43. 微生物が原栄養体株である請求項 24 記載の製造方法。

44. 微生物が二倍体細胞である請求項 24 記載の製造方法。

45. 微生物が原栄養体株かつ二倍体細胞である請求項 24 記載の製造方法。

46. 培地を pH 制御することを特徴とする請求項 24 記載の製造方法。

47. pH 制御が、アンモニウムガス、アンモニウム塩溶液、水酸化ナトリウム溶液又は硫酸を用いて行うものである請求項 46 記載の製造方法。

図 1

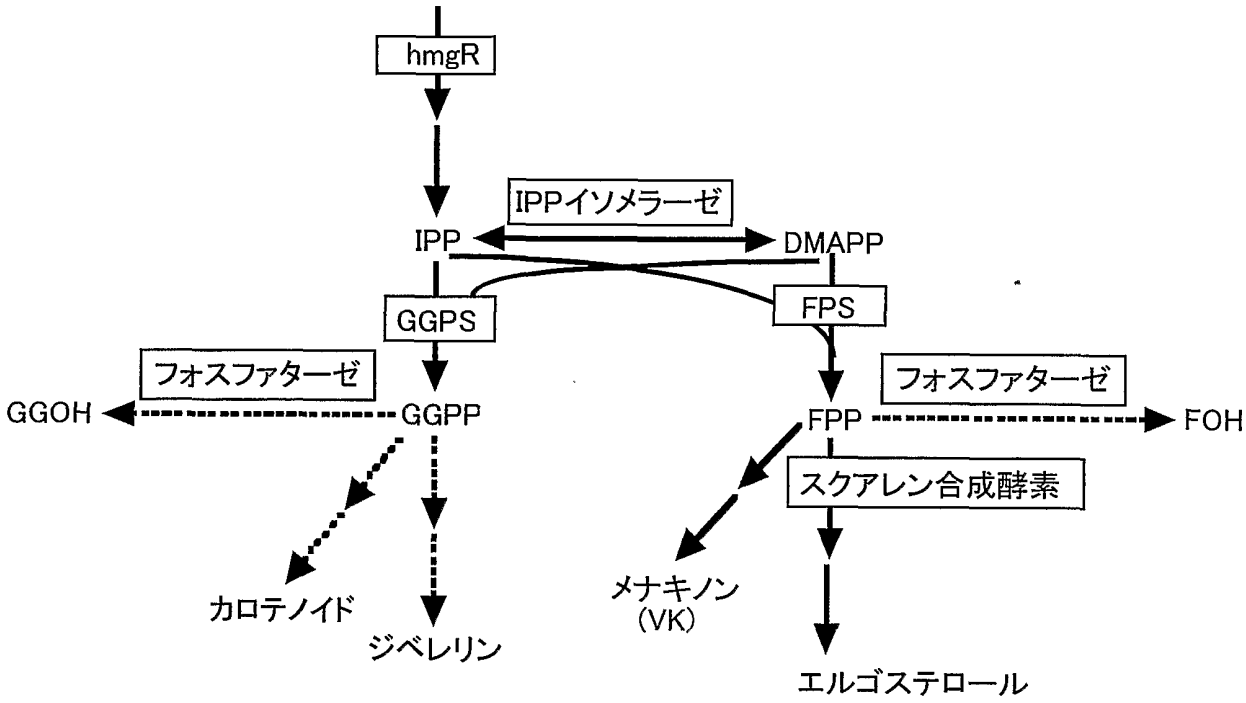

hmgR
IPPイソメラーゼ
IPP
DMAPP
GGPS
FPS
フォスファターゼ
フォスファターゼ
GGOH
GGPP
FPP
FOH
スクアレン合成酵素
カロテノイド
ジベレリン
メナキノン
(VK)
エルゴステロール

図 2A

ヌクレオチド	アミノ酸
C203T	S68F
T426C	
T1026C	
T1167G	
T1248C	
G1557A	
A1605G	
T1820C	L607S
A2451G	
A2726G	H909R
T2787C	
G2940A	

図 2B

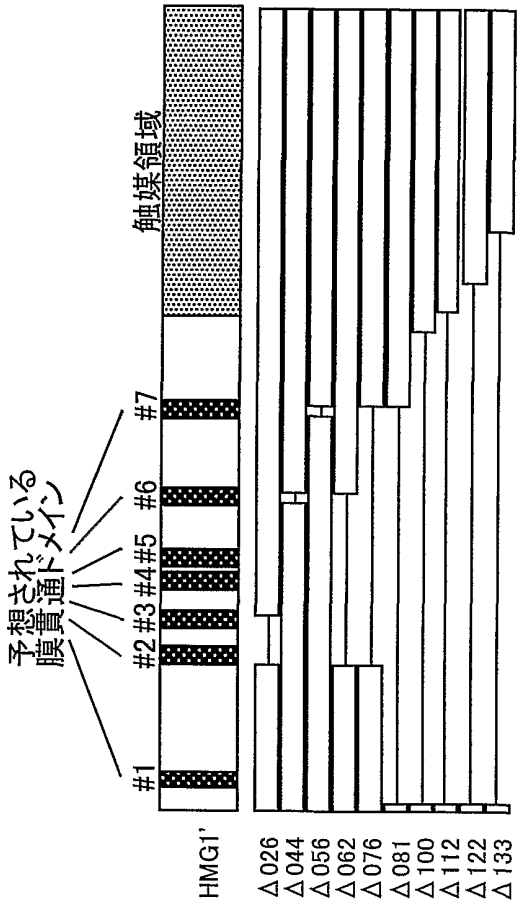


図 3

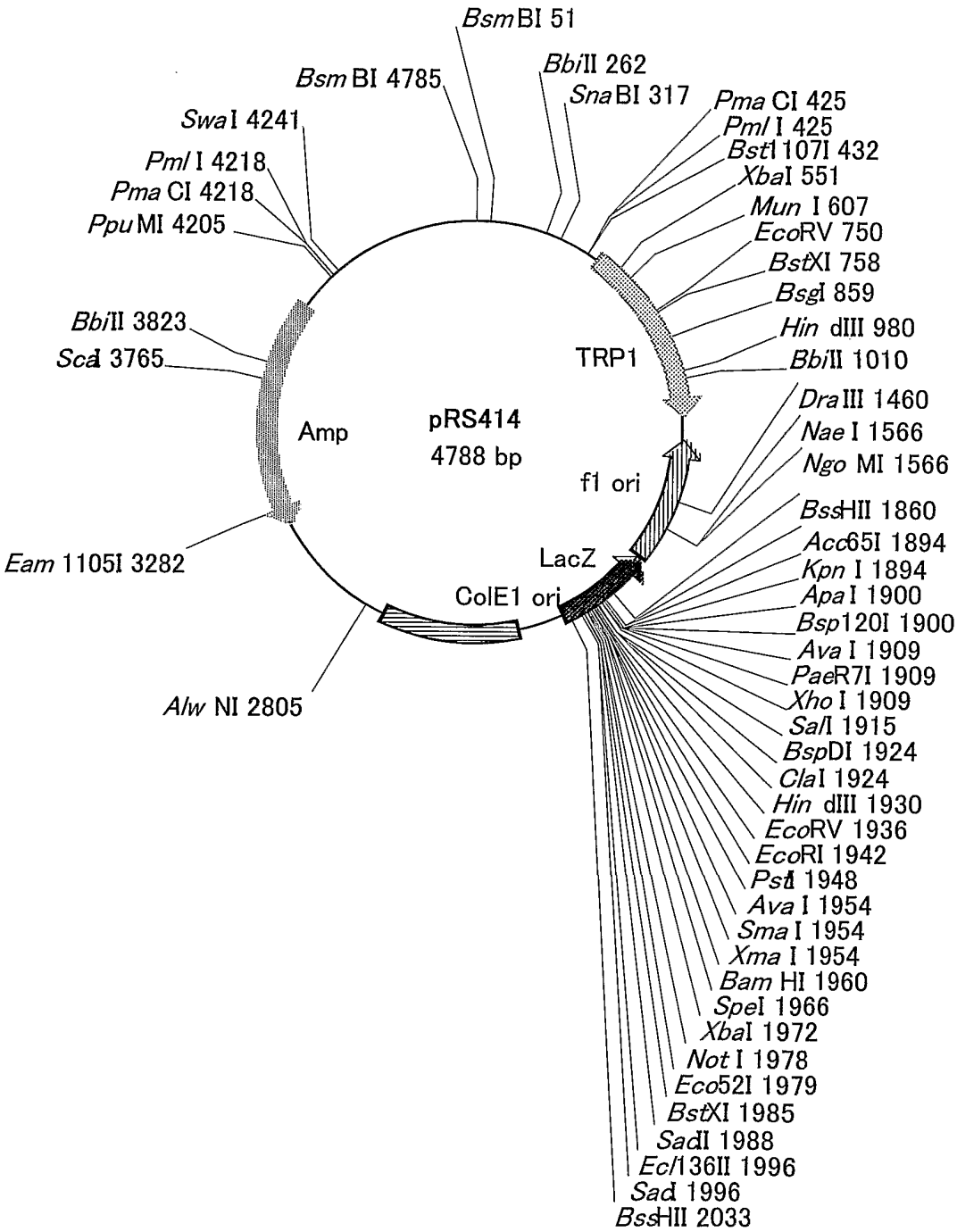

BsmBI 51
BbiII 262
BsmBI 4785
SnaBI 317
PmaCI 425
SwaI 4241
PmlI 425
BstI107I 432
PmlI 4218
XbaI 551
PmaCI 4218
Mun I 607
PpuMI 4205
EcoRV 750
BstXI 758
BsgI 859
BbiII 3823
HindIII 980
ScaI 3765
TRP1
BbiII 1010
DraIII 1460
Amp
pRS414
4788 bp
NaeI 1566
NgoMI 1566
f1 ori
BssHII 1860
Acc65I 1894
LacZ
EamI105I 3282
KpnI 1894
ApaI 1900
ColE1 ori
Bsp120I 1900
AvaI 1909
PaeR7I 1909
XhoI 1909
AlwNI 2805
SalI 1915
BspDI 1924
ClaI 1924
HindIII 1930
EcoRV 1936
EcoRI 1942
PstI 1948
AvaI 1954
SmaI 1954
XmaI 1954
BamHI 1960
SpeI 1966
XbaI 1972
NotI 1978
Eco52I 1979
BstXI 1985
SadI 1988
Ecl136II 1996
Sad 1996
BssHII 2033

図 4

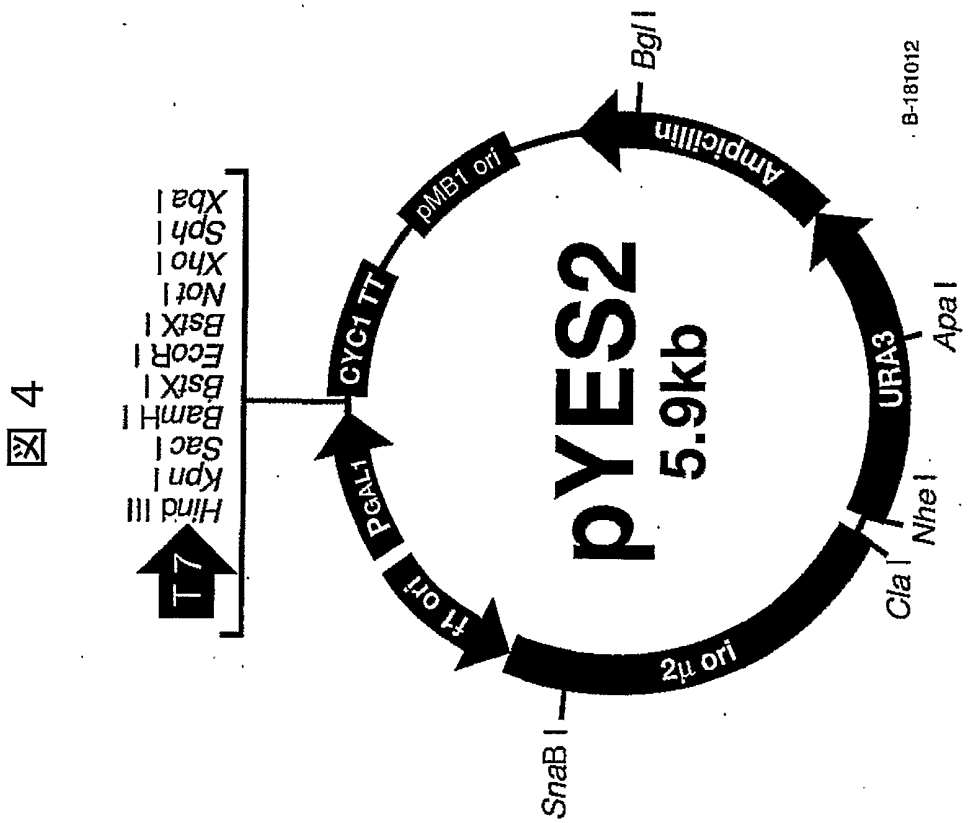

pYES2
5.9kb
B-181012
Bgl I
Ampicillin
pMB1 ori
CYC1 TT
PGAL1
f1 ori
2μ ori
URA3
Apa I
Nhe I
Cla I
SnaB I
T7
Hind III
Kpn I
Sac I
BamH I
BstX I
EcoR I
BstX I
Not I
Xho I
Sph I
Xba I

図5

```
GGATCCTCTA GCTCCCTAAC ATGTAGGTGG CGGAGGGGAG ATATACAATA GAACAGATAC CAGACAAGAC
CCTAGGAGAT CGAGGGATTG TACATCCACC GCCTCCCCTC TATATGTTAT CTTGTCTATG GTCTGTTCTG
        10         20         30         40         50         60         70

ATAATGGGCT AAACAAGACT ACACCAATTA CACTGCCTCA TTGATGGTGG TACATAACGA ACTAATACTG
TATTACCCGA TTTGTTCTGA TGTGGTTAAT GTGACGGAGT AACTACCACC ATGTATTGCT TGATTATGAC
        80         90        100        110        120        130        140

TAGCCCTAGA CTTGATAGCC ATCATCATAT CGAAGTTTCA CTACCCTTTT TCCATTTGCC ATCTATTGAA
ATCGGGATCT GAACTATCGG TAGTAGTATA GCTTCAAAGT GATGGGAAAA AGGTAAACGG TAGATAACTT
       150        160        170        180        190        200        210

GTAATAATAG GCGCATGCAA CTTCTTTTCT TTTTTTTTCT TTTCTCTCTC CCCCGTTGTT GTCTCACCAT
CATTATTATC CGCGTACGTT GAAGAAAAGA AAAAAAAAGA AAAGAGAGAG GGGGCAACAA CAGAGTGGTA
       220        230        240        250        260        270        280

ATCCGCAATG ACAAAAAAAT GATGGAAGAC ACTAAAGGAA AAAATTAACG ACAAAGACAG CACCAACAGA
TAGGCGTTAC TGTTTTTTTA CTACCTTCTG TGATTTCCTT TTTTAATTGC TGTTTCTGTC GTGGTTGTCT
       290        300        310        320        330        340        350

TGTCGTTGTT CCAGAGCTGA TGAGGGGTAT CTCGAAGCAC ACGAAACTTT TTCCTTCCTT CATTCACGCA
ACAGCAACAA GGTCTCGACT ACTCCCCATA GAGCTTCGTG TGCTTTGAAA AAGGAAGGAA GTAAGTGCGT
       360        370        380        390        400        410        420

CACTACTCTC TAATGAGCAA CGGTATACGG CCTTCCTTCC AGTTACTTGA ATTTGAAATA AAAAAAGTTT
GTGATGAGAG ATTACTCGTT GCCATATGCC GGAAGGAAGG TCAATGAACT TAAACTTTAT TTTTTTCAAA
       430        440        450        460        470        480        490

GCTGTCTTGC TATCAAGTAT AAATAGACCT GCAATTATTA ATCTTTTGTT TCCTCGTCAT TGTTCTCGTT
CGACAGAACG ATAGTTCATA TTTATCTGGA CGTTAATAAT TAGAAAACAA AGGAGCAGTA ACAAGAGCAA
       500        510        520        530        540        550        560

CCCTTTCTTC CTTGTTTCTT TTTCTGCACA ATATTTCAAG CTATACCAAG CATACAATCA ACTGGTACCC
GGGAAAGAAG GAACAAAGAA AAAGACGTGT TATAAAGTTC GATATGGTTC GTATGTTAGT TGACCATGGG
       570        580        590        600        610        620        630

GGGTCGACTC GAGCTCTAGA GGTTAACTAA GCGAATTTCT TATGATTTAT GATTTTTATT ATTAAATAAG
CCCAGCTGAG CTCGAGATCT CCAATTGATT CGCTTAAAGA ATACTAAATA CTAAAAATAA TAATTTATTC
       640        650        660        670        680        690        700

TTATAAAAAA AATAAGTGTA TACAAATTTT AAAGTGACTC TTAGGTTTTA AAACGAAAAT TCTTATTCTT
AATATTTTTT TTATTCACAT ATGTTTAAAA TTTCACTGAG AATCCAAAAT TTTGCTTTTA AGAATAAGAA
       710        720        730        740        750        760        770

GAGTAACTCT TTCCTGTAGG TCAGGTTGCT TTCTCAGGTA TAGCATGAGG TCGCTCTTAT TGACCACATC
CTCATTGAGA AAGGACATCC AGTCCAACGA AAGAGTCCAT ATCGTACTCC AGCGAGAATA ACTGGTGTAG
       780        790        800        810        820        830        840

TCTACCGGCA TGCCGAGCAA ATGCCTGCAA ATCGCTCCCC ATTTCACCCA ATTGTAGATA TGCTAACTCC
AGATGGCCGT ACGGCTCGTT TACGGACGTT TAGCGAGGGG TAAAGTGGGT TAACATCTAT ACGATTGAGG
       850        860        870        880        890        900        910

AGCAATGAGT TGATGAATCT CGGTGTGTAT TTTATGTCCT CAGAGGACAA CACCTGTTGT AATCGTTCTT
TCGTTACTCA ACTACTTAGA GCCACACATA AAATACAGGA GTCTCCTGTT GTGGACAACA TTAGCAAGAA
       920        930        940        950        960        970        980

CCACACGGAT CC
GGTGTGCCTA GG
       990
```

図6A

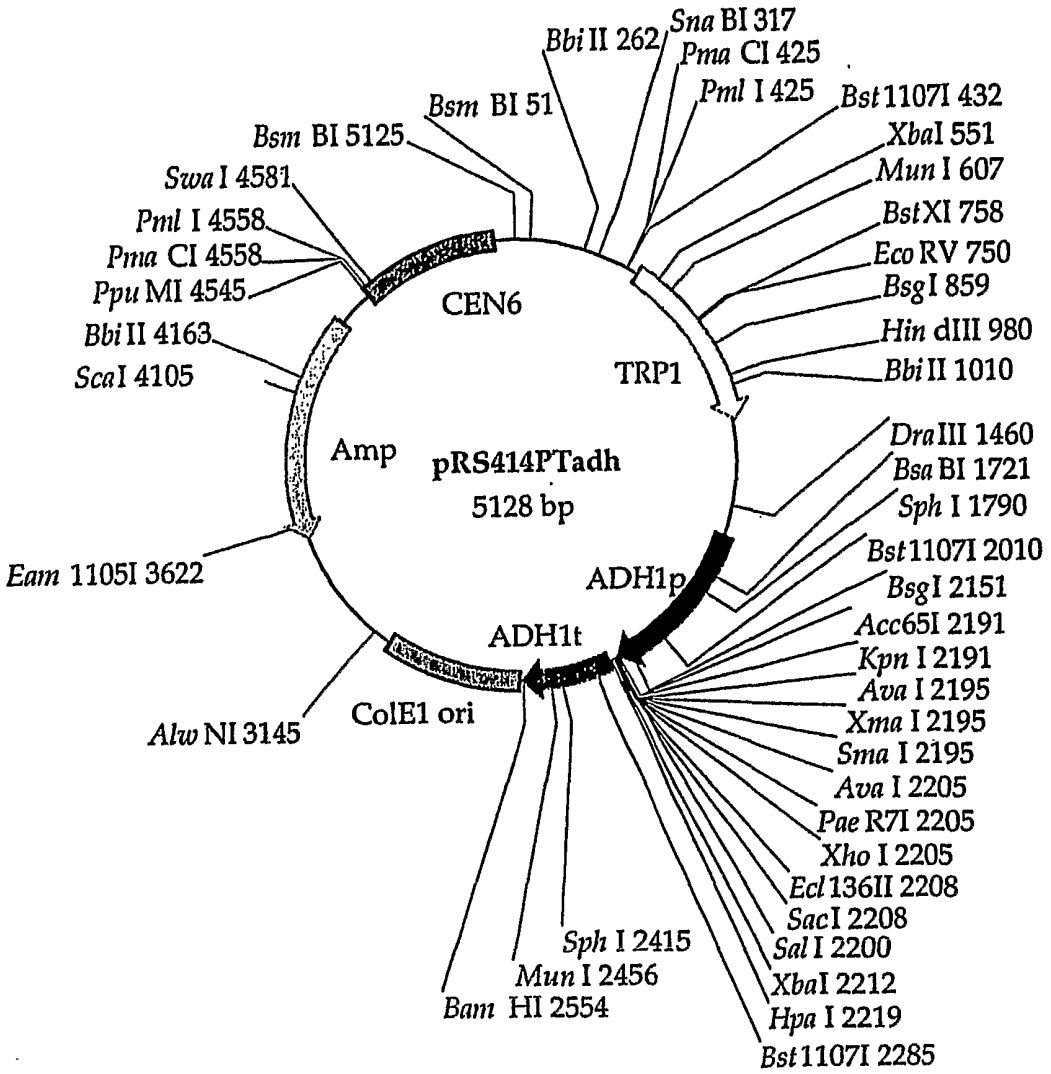

Sna BI 317
Bbi II 262
Pma CI 425
Pml I 425
Bst1107I 432
Bsm BI 51
XbaI 551
Bsm BI 5125
Mun I 607
Swa I 4581
BstXI 758
Pml I 4558
Eco RV 750
Pma CI 4558
BsgI 859
Ppu MI 4545
CEN6
Hin dIII 980
Bbi II 4163
TRP1
Bbi II 1010
Sca I 4105
DraIII 1460
Amp
pRS414PTadh
Bsa BI 1721
5128 bp
Sph I 1790
Bst1107I 2010
Eam 1105I 3622
ADH1p
BsgI 2151
Acc65I 2191
ADH1t
Kpn I 2191
Ava I 2195
ColE1 ori
Alw NI 3145
Xma I 2195
Sma I 2195
Ava I 2205
Pae R7I 2205
Xho I 2205
Ecl136II 2208
SacI 2208
Sph I 2415
Sal I 2200
Mun I 2456
XbaI 2212
Bam HI 2554
Hpa I 2219
Bst1107I 2285

図6B

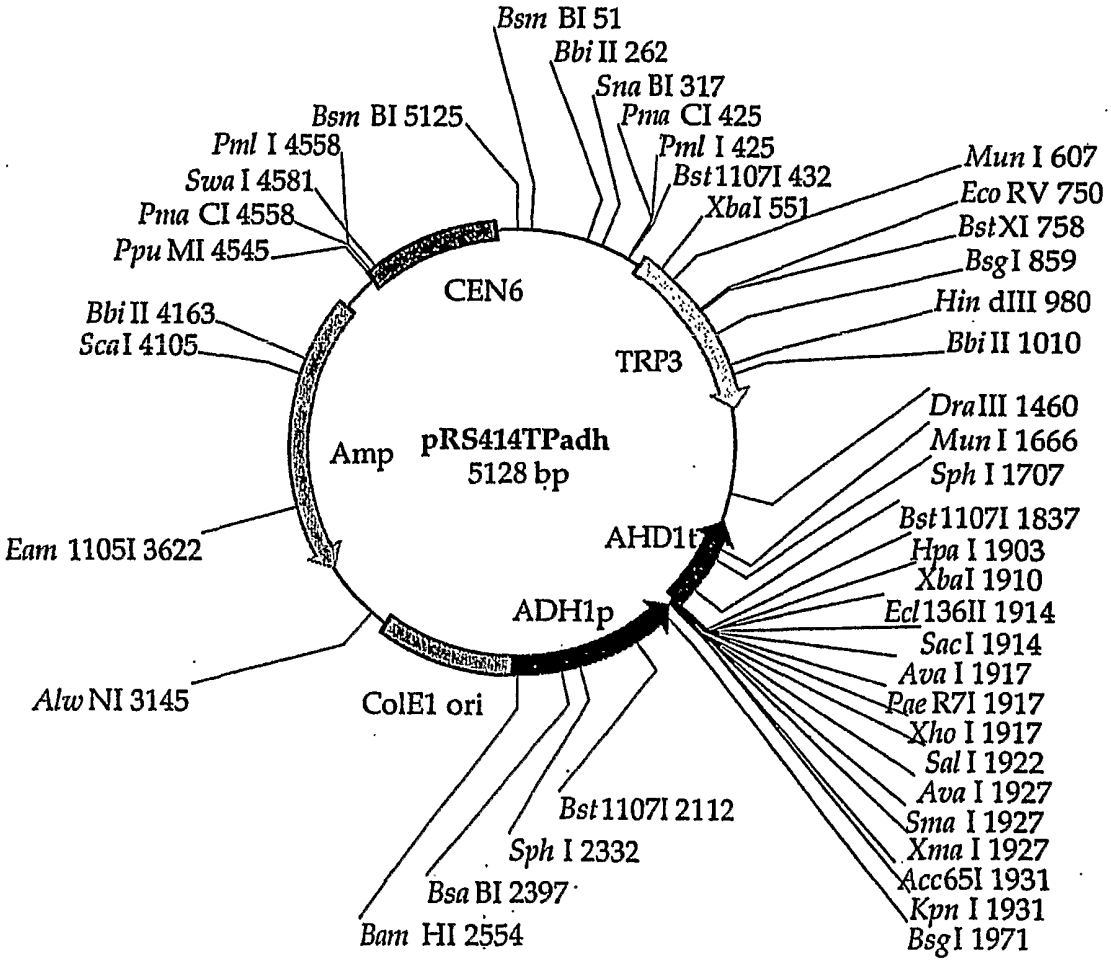

Bsm BI 51
Bbi II 262
Sna BI 317
Pma CI 425
Pml I 425
Bst1107I 432
XbaI 551
Mun I 607
Eco RV 750
BstXI 758
Bsg I 859
Hin dIII 980
Bbi II 1010
DraIII 1460
Mun I 1666
Sph I 1707
Bst1107I 1837
Hpa I 1903
XbaI 1910
Ecl136II 1914
SacI 1914
Ava I 1917
Pae R7I 1917
Xho I 1917
Sal I 1922
Ava I 1927
Sma I 1927
Xma I 1927
Acc65I 1931
Kpn I 1931
Bsg I 1971
Bsm BI 5125
Pml I 4558
Swa I 4581
Pma CI 4558
Ppu MI 4545
Bbi II 4163
ScaI 4105
Eam 1105I 3622
Alw NI 3145
Bam HI 2554
Bsa BI 2397
Sph I 2332
Bst1107I 2112
CEN6
TRP3
AHD1t
ADH1p
ColE1 ori
Amp
pRS414TPadh
5128 bp

図7A

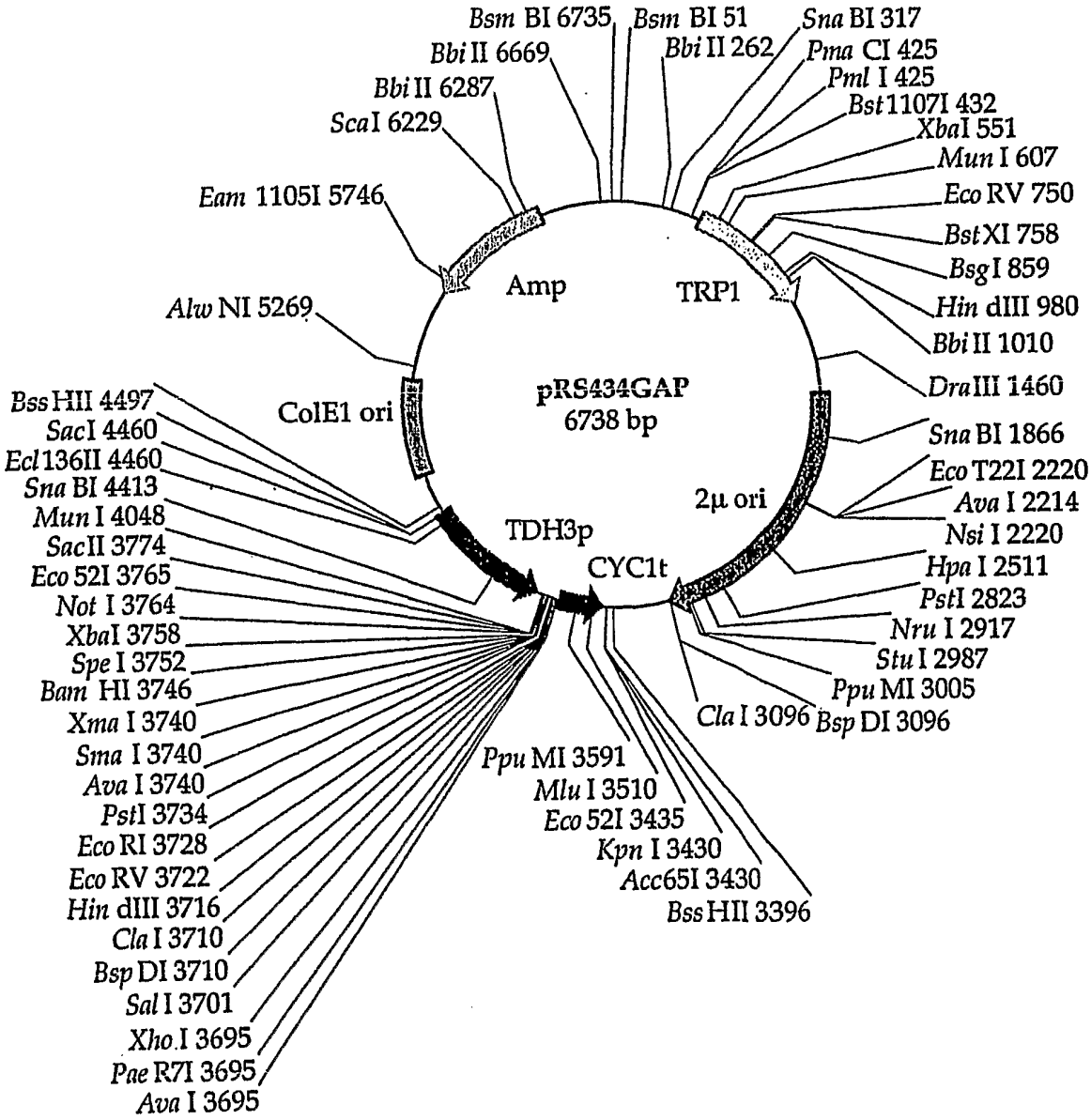

Bsm BI 6735
Bsm BI 51
Sna BI 317
Bbi II 6669
Bbi II 262
Pma CI 425
Bbi II 6287
Pml I 425
Bst1107I 432
ScaI 6229
XbaI 551
Mun I 607
Eam 1105I 5746
Eco RV 750
BstXI 758
Amp
TRP1
BsgI 859
Alw NI 5269
Hin dIII 980
Bbi II 1010
pRS434GAP
6738 bp
DraIII 1460
ColE1 ori
Bss HII 4497
Sna BI 1866
SacI 4460
Eco T22I 2220
Ecl136II 4460
2μ ori
Sna BI 4413
Ava I 2214
Mun I 4048
TDH3p
Nsi I 2220
SacII 3774
CYC1t
Hpa I 2511
Eco 52I 3765
PstI 2823
Not I 3764
Nru I 2917
XbaI 3758
Stu I 2987
Spe I 3752
Ppu MI 3005
Bam HI 3746
Cla I 3096
Bsp DI 3096
Xma I 3740
Ppu MI 3591
Sma I 3740
Mlu I 3510
Ava I 3740
Eco 52I 3435
PstI 3734
Kpn I 3430
Eco RI 3728
Acc65I 3430
Eco RV 3722
Bss HII 3396
Hin dIII 3716
Cla I 3710
Bsp DI 3710
Sal I 3701
Xho I 3695
Pae R7I 3695
Ava I 3695

図7B

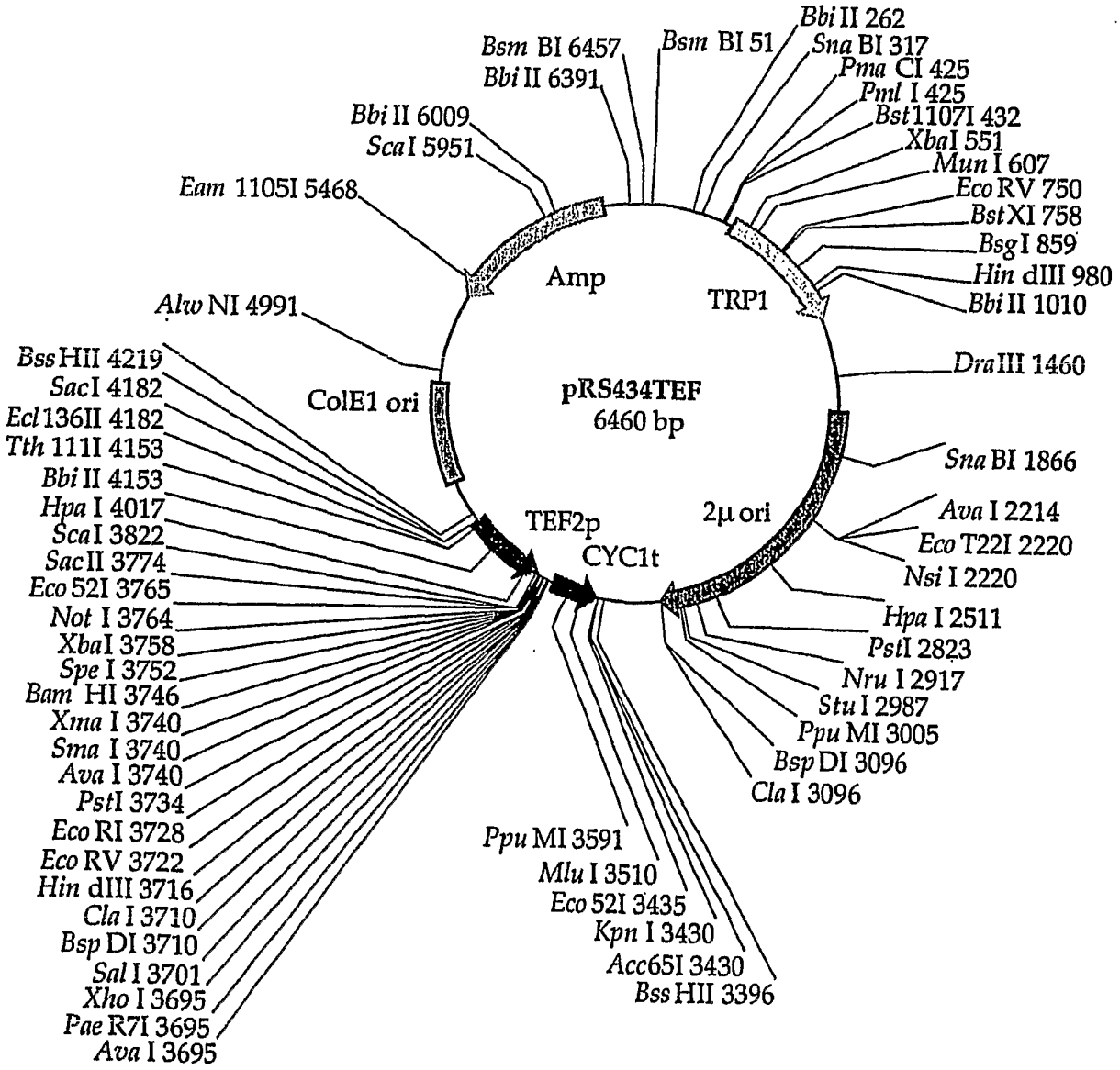

pRS434TEF
6460 bp
Amp
TRP1
ColE1 ori
2μ ori
TEF2p
CYC1t
Bbi II 262
Sna BI 317
Pma CI 425
Pml I 425
Bst1107I 432
XbaI 551
Mun I 607
Eco RV 750
BstXI 758
Bsg I 859
Hin dIII 980
Bbi II 1010
Dra III 1460
Sna BI 1866
Ava I 2214
Eco T22I 2220
Nsi I 2220
Hpa I 2511
PstI 2823
Nru I 2917
Stu I 2987
Ppu MI 3005
Bsp DI 3096
Cla I 3096
Ppu MI 3591
Mlu I 3510
Eco 52I 3435
Kpn I 3430
Acc65I 3430
Bss HII 3396
Ava I 3695
Pae R7I 3695
Xho I 3695
Sal I 3701
Bsp DI 3710
Cla I 3710
Hin dIII 3716
Eco RV 3722
Eco RI 3728
PstI 3734
Ava I 3740
Sma I 3740
Xma I 3740
Bam HI 3746
Spe I 3752
XbaI 3758
Not I 3764
Eco 52I 3765
Sac II 3774
Sca I 3822
Hpa I 4017
Bbi II 4153
Tth 111I 4153
Ecl 136II 4182
Sac I 4182
Bss HII 4219
Alw NI 4991
Eam 1105I 5468
Sca I 5951
Bbi II 6009
Bbi II 6391
Bsm BI 6457
Bsm BI 51

図7C

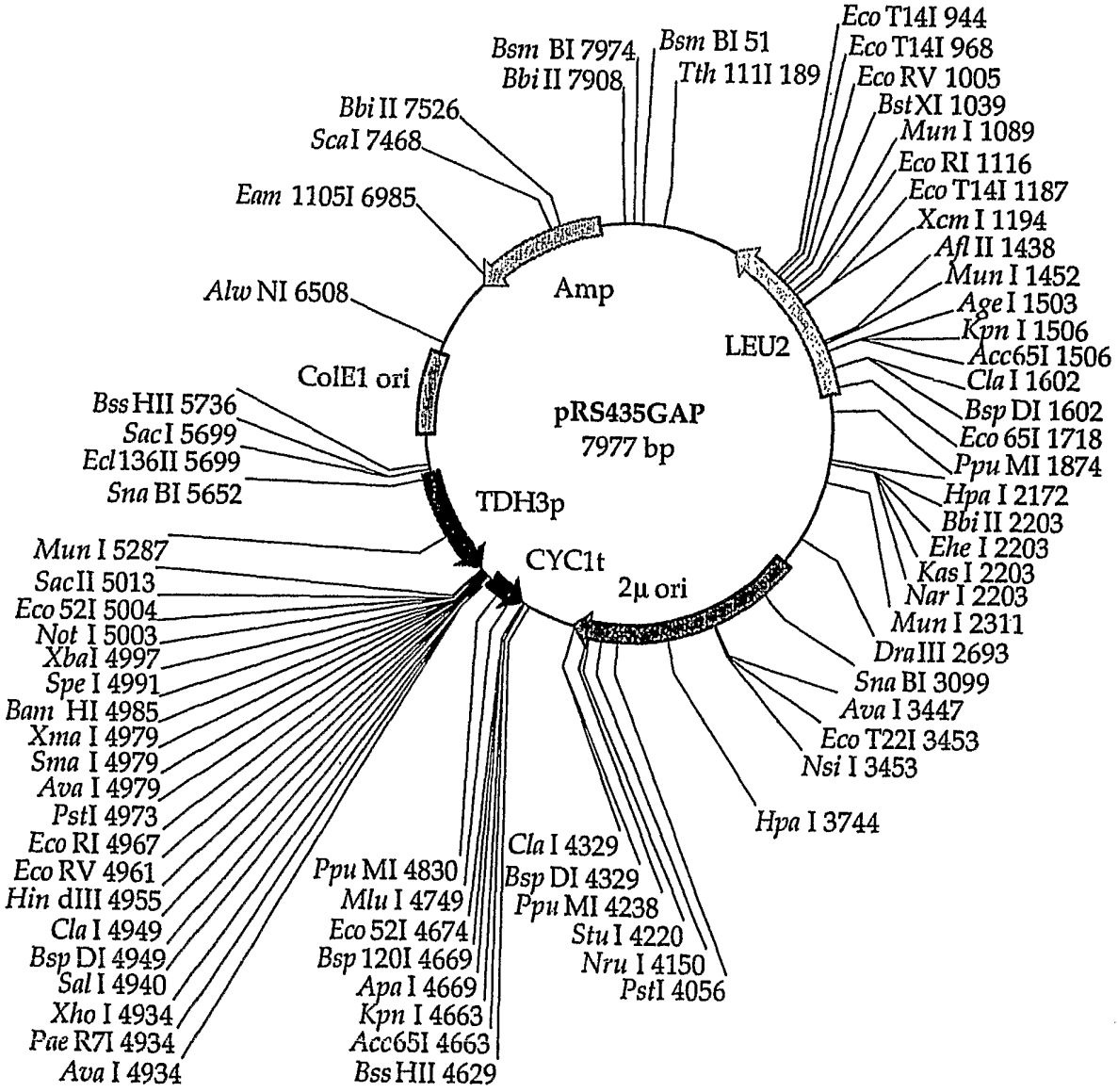

pRS435GAP
7977 bp
Amp
LEU2
ColE1 ori
TDH3p
CYC1t
2μ ori
Eco T14I 944
Eco T14I 968
Eco RV 1005
BstXI 1039
Mun I 1089
Eco RI 1116
Eco T14I 1187
Xcm I 1194
Afl II 1438
Mun I 1452
Age I 1503
Kpn I 1506
Acc65I 1506
Cla I 1602
Bsp DI 1602
Eco 65I 1718
Ppu MI 1874
Hpa I 2172
Bbi II 2203
Ehe I 2203
Kas I 2203
Nar I 2203
Mun I 2311
Dra III 2693
Sna BI 3099
Ava I 3447
Eco T22I 3453
Nsi I 3453
Hpa I 3744
Cla I 4329
Bsp DI 4329
Ppu MI 4238
Stu I 4220
Nru I 4150
PstI 4056
Ppu MI 4830
Mlu I 4749
Eco 52I 4674
Bsp 120I 4669
Apa I 4669
Kpn I 4663
Acc65I 4663
Bss HII 4629
Mun I 5287
Sac II 5013
Eco 52I 5004
Not I 5003
Xba I 4997
Spe I 4991
Bam HI 4985
Xma I 4979
Sma I 4979
Ava I 4979
PstI 4973
Eco RI 4967
Eco RV 4961
Hin dIII 4955
Cla I 4949
Bsp DI 4949
Sal I 4940
Xho I 4934
Pae R7I 4934
Ava I 4934
Bss HII 5736
Sac I 5699
Ecl 136II 5699
Sna BI 5652
Alw NI 6508
Eam 1105I 6985
Sca I 7468
Bbi II 7526
Bsm BI 7974
Bbi II 7908
Bsm BI 51
Tth 111I 189

図7D

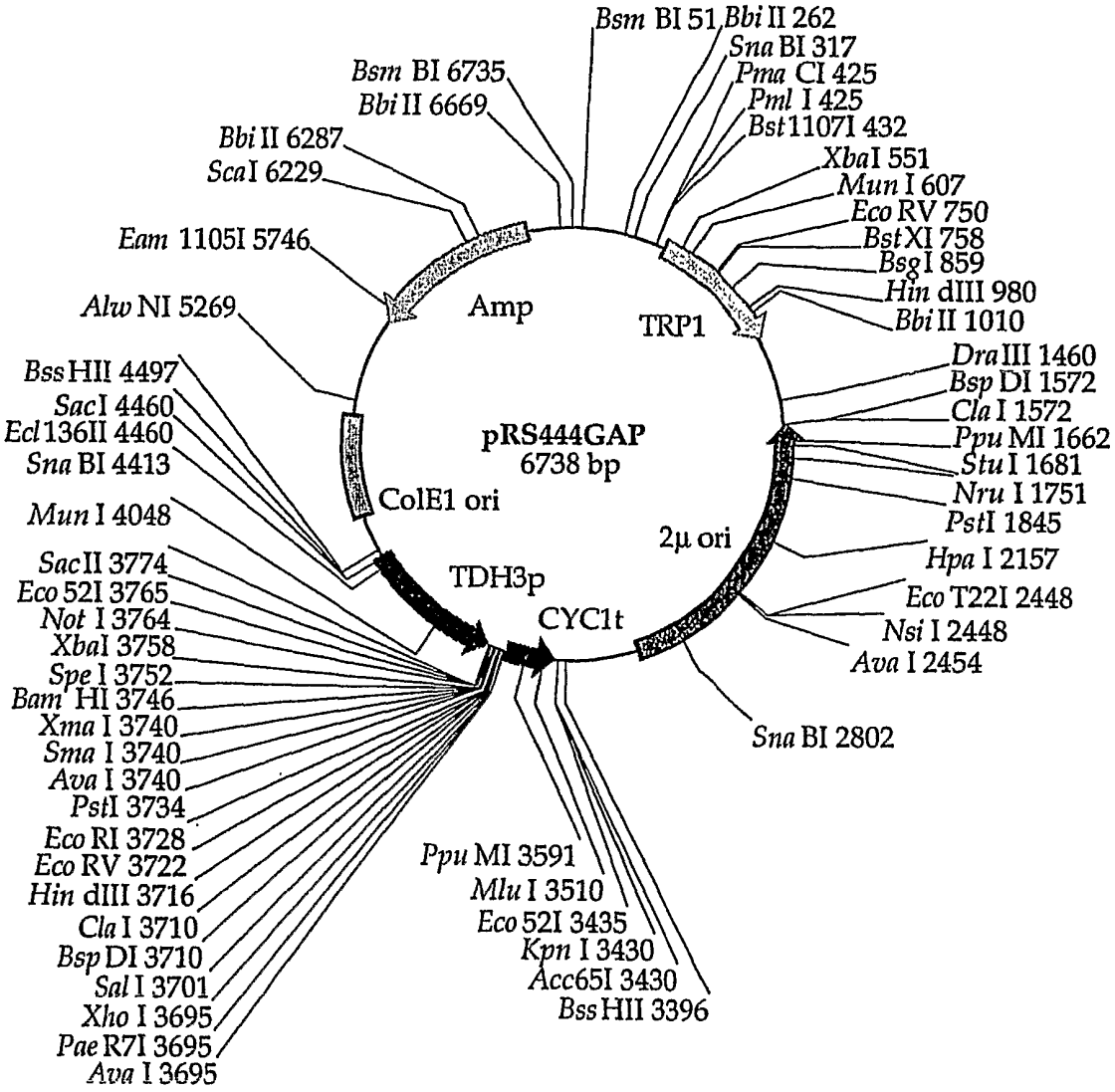

pRS444GAP
6738 bp
Amp
TRP1
ColE1 ori
2μ ori
TDH3p
CYC1t
Bsm BI 51
Bbi II 262
Sna BI 317
Pma CI 425
Pml I 425
Bst1107I 432
XbaI 551
Mun I 607
Eco RV 750
BstXI 758
BsgI 859
Hin dIII 980
Bbi II 1010
DraIII 1460
Bsp DI 1572
Cla I 1572
Ppu MI 1662
Stu I 1681
Nru I 1751
PstI 1845
Hpa I 2157
Eco T22I 2448
Nsi I 2448
Ava I 2454
Sna BI 2802
Ppu MI 3591
Mlu I 3510
Eco 52I 3435
Kpn I 3430
Acc65I 3430
Bss HII 3396
Ava I 3695
Pae R7I 3695
Xho I 3695
Sal I 3701
Bsp DI 3710
Cla I 3710
Hin dIII 3716
Eco RV 3722
Eco RI 3728
PstI 3734
Ava I 3740
Sma I 3740
Xma I 3740
Bam HI 3746
Spe I 3752
Xba I 3758
Not I 3764
Eco 52I 3765
Sac II 3774
Mun I 4048
Sna BI 4413
Ecl136II 4460
Sac I 4460
Bss HII 4497
Alw NI 5269
Eam 1105I 5746
Sca I 6229
Bbi II 6287
Bsm BI 6735
Bbi II 6669

図7E

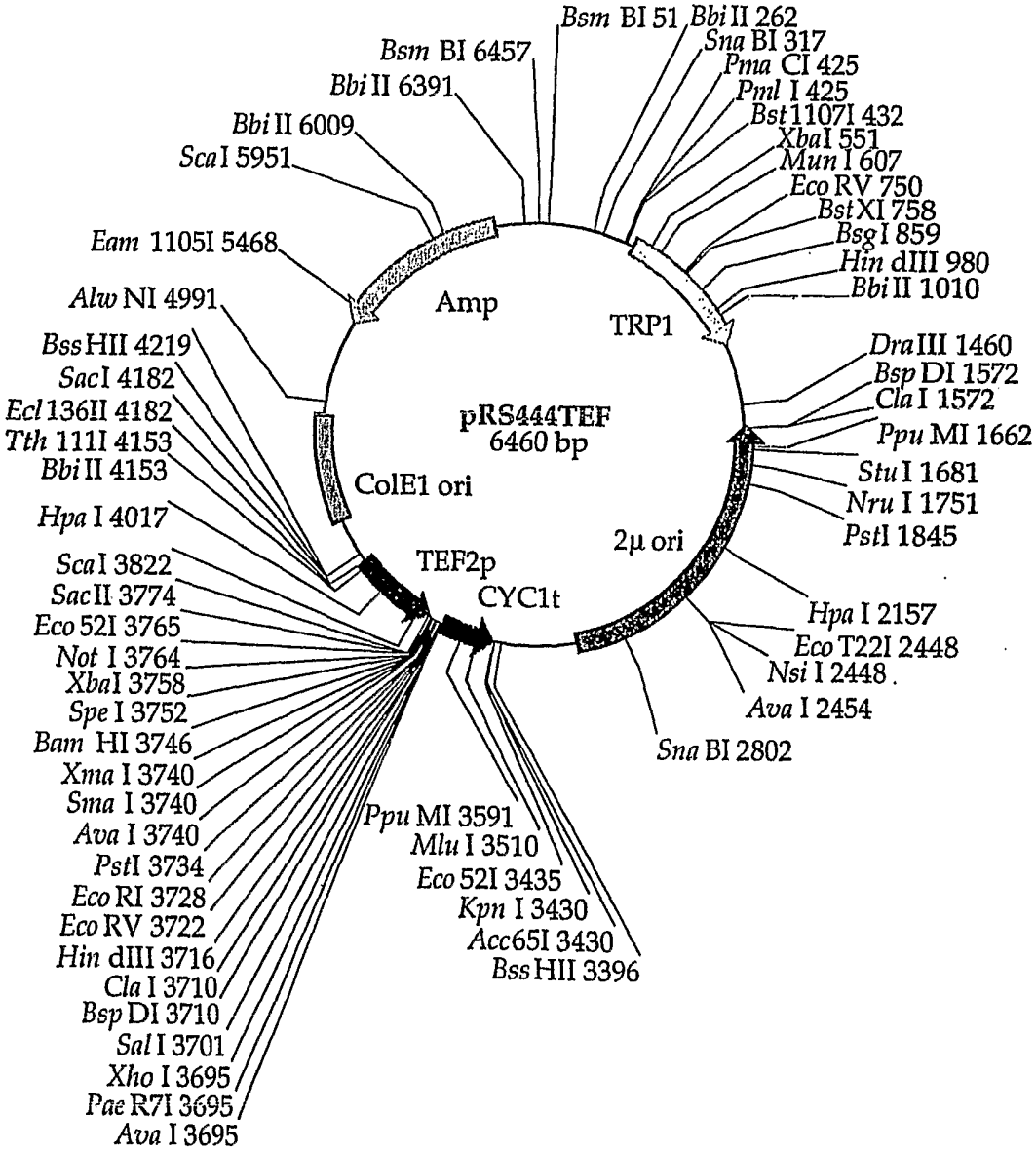

Bsm BI 51
Bbi II 262
Sna BI 317
Pma CI 425
Pml I 425
Bst1107I 432
XbaI 551
Mun I 607
Eco RV 750
Bst XI 758
Bsg I 859
Hin dIII 980
Bbi II 1010
Dra III 1460
Bsp DI 1572
Cla I 1572
Ppu MI 1662
Stu I 1681
Nru I 1751
PstI 1845
Hpa I 2157
Eco T22I 2448
Nsi I 2448
Ava I 2454
Sna BI 2802
Ppu MI 3591
Mlu I 3510
Eco 52I 3435
Kpn I 3430
Acc65I 3430
Bss HII 3396
Sca I 3822
Sac II 3774
Eco 52I 3765
Not I 3764
XbaI 3758
Spe I 3752
Bam HI 3746
Xma I 3740
Sma I 3740
Ava I 3740
PstI 3734
Eco RI 3728
Eco RV 3722
Hin dIII 3716
Cla I 3710
Bsp DI 3710
Sal I 3701
Xho I 3695
Pae R7I 3695
Ava I 3695
Hpa I 4017
Ecl 136II 4182
Tth 111I 4153
Bbi II 4153
Bss HII 4219
Sac I 4182
Alw NI 4991
Eam 1105I 5468
Sca I 5951
Bbi II 6009
Bbi II 6391
Bsm BI 6457
Amp
TRP1
pRS444TEF
6460 bp
ColE1 ori
2μ ori
TEF2p
CYC1t

図7F

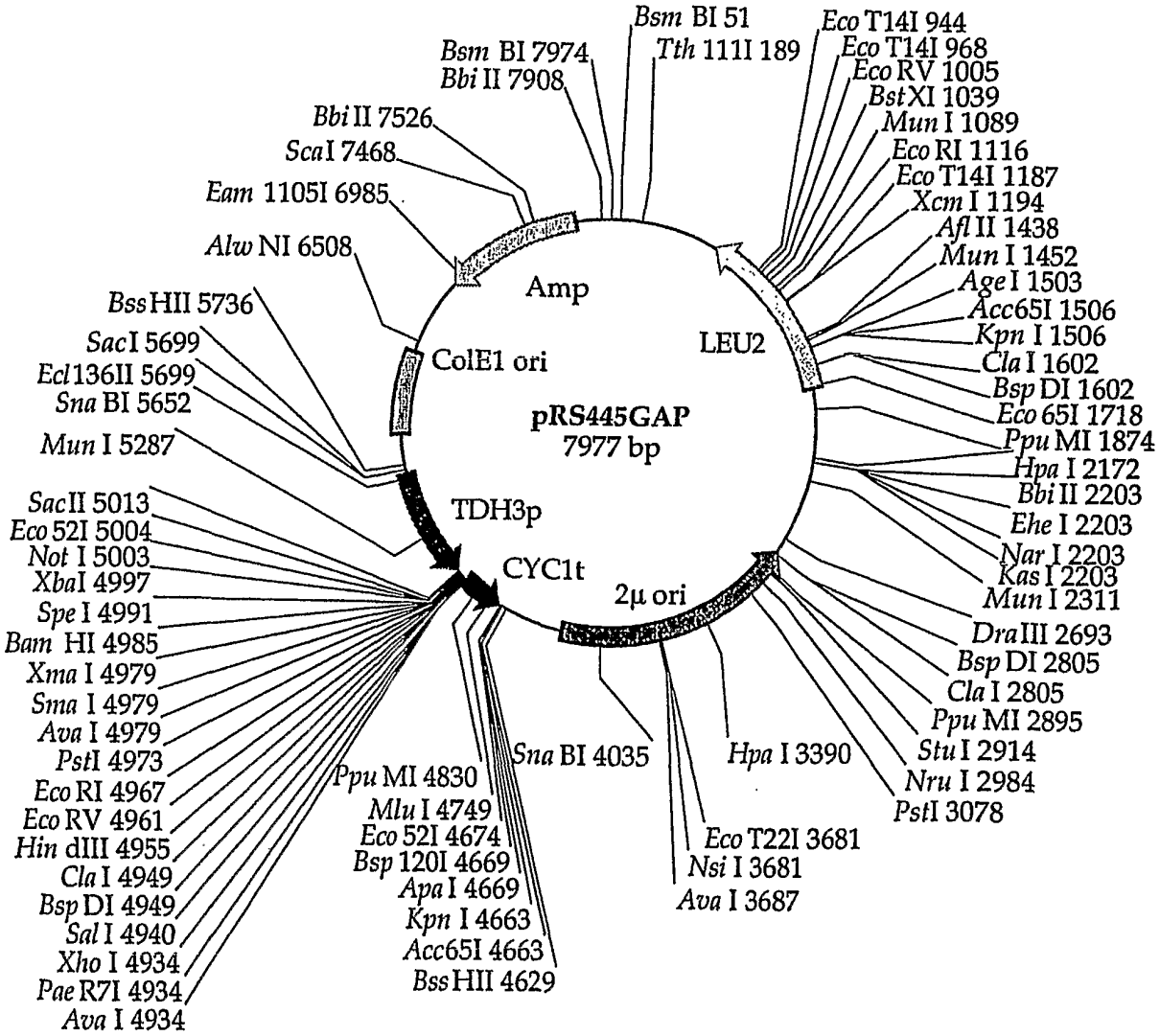

pRS445GAP
7977 bp
Amp
ColE1 ori
LEU2
TDH3p
CYC1t
2μ ori
Bsm BI 51
Tth 111I 189
Eco T14I 944
Eco T14I 968
Eco RV 1005
BstXI 1039
Mun I 1089
Eco RI 1116
Eco T14I 1187
Xcm I 1194
AflII 1438
Mun I 1452
Age I 1503
Acc65I 1506
Kpn I 1506
Cla I 1602
Bsp DI 1602
Eco 65I 1718
Ppu MI 1874
Hpa I 2172
Bbi II 2203
Ehe I 2203
Nar I 2203
Kas I 2203
Mun I 2311
DraIII 2693
Bsp DI 2805
Cla I 2805
Ppu MI 2895
Stu I 2914
Nru I 2984
PstI 3078
Eco T22I 3681
Nsi I 3681
Ava I 3687
Hpa I 3390
Sna BI 4035
Ppu MI 4830
Mlu I 4749
Eco 52I 4674
Bsp 120I 4669
Apa I 4669
Kpn I 4663
Acc65I 4663
BssHII 4629
Bsm BI 7974
Bbi II 7908
Bbi II 7526
ScaI 7468
Eam 1105I 6985
Alw NI 6508
BssHII 5736
SacI 5699
Ecl136II 5699
Sna BI 5652
Mun I 5287
SacII 5013
Eco 52I 5004
Not I 5003
XbaI 4997
Spe I 4991
Bam HI 4985
Xma I 4979
Sma I 4979
Ava I 4979
PstI 4973
Eco RI 4967
Eco RV 4961
Hin dIII 4955
Cla I 4949
Bsp DI 4949
Sal I 4940
Xho I 4934
Pae R7I 4934
Ava I 4934

図8

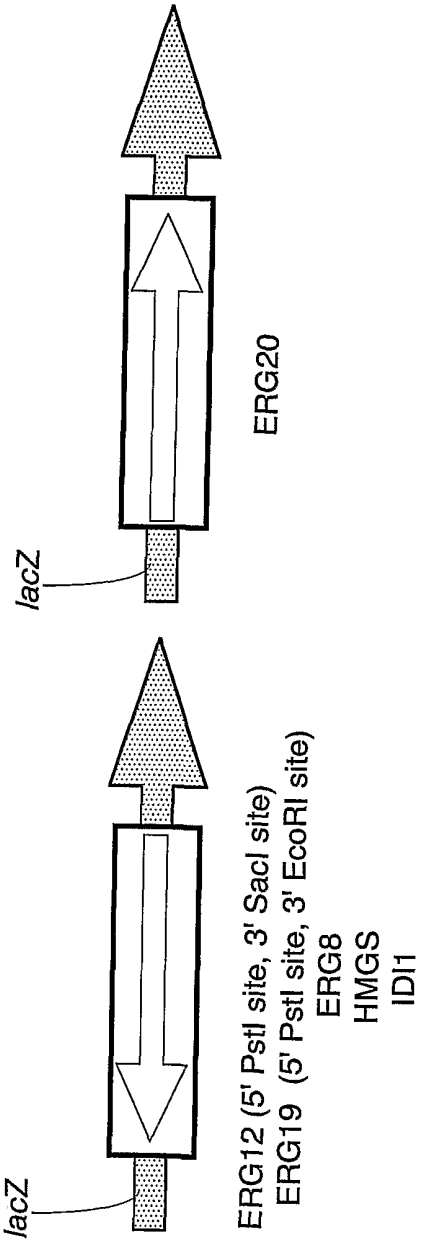

lacZ
ERG20
lacZ
ERG12 (5' PstI site, 3' SacI site)
ERG19 (5' PstI site, 3' EcoRI site)
ERG8
HMGS
IDI1

図 9

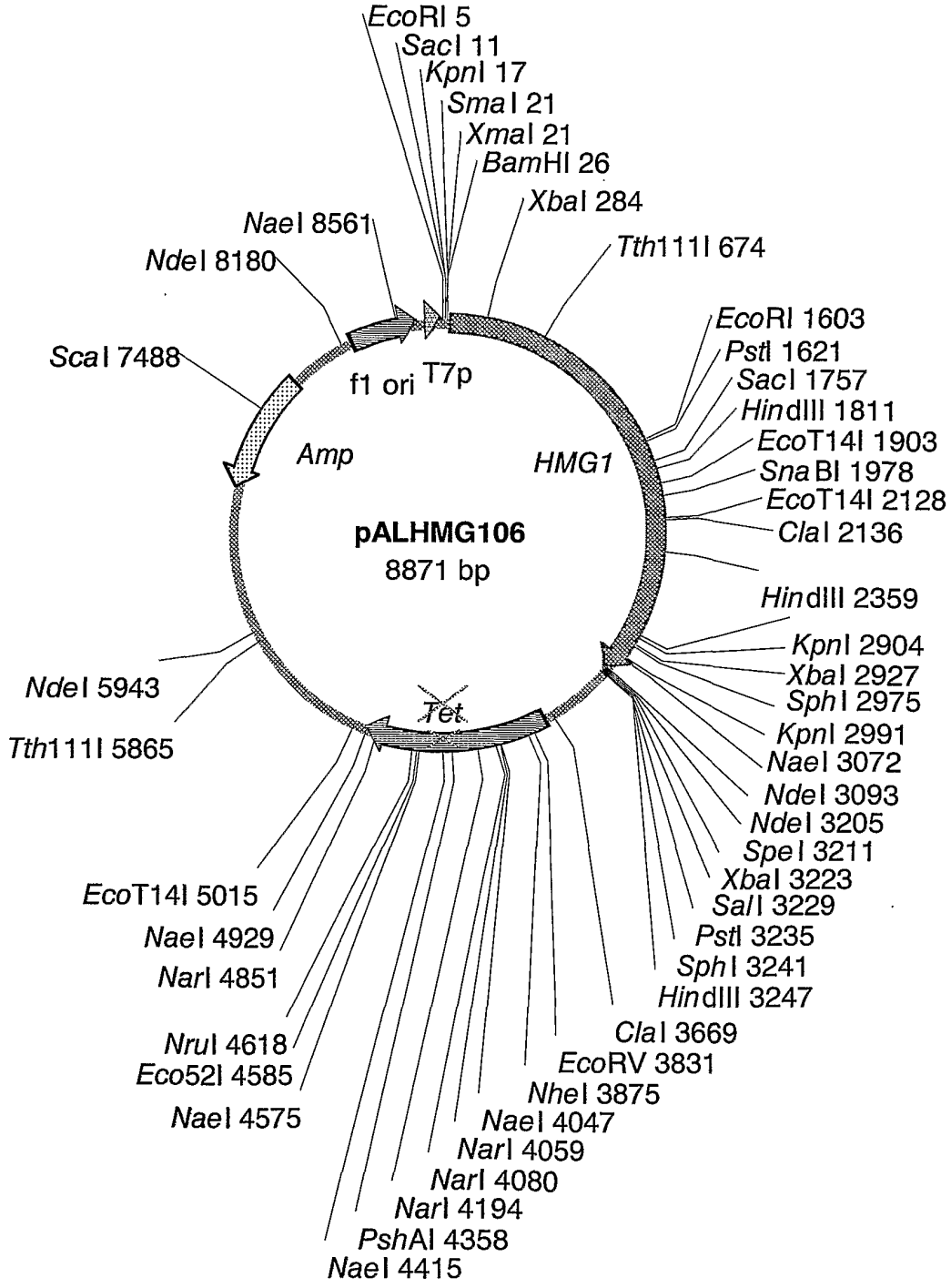

EcoRI 5
SacI 11
KpnI 17
SmaI 21
XmaI 21
BamHI 26
XbaI 284
Tth111I 674
EcoRI 1603
PstI 1621
SacI 1757
HindIII 1811
EcoT14I 1903
SnaBI 1978
EcoT14I 2128
ClaI 2136
HindIII 2359
KpnI 2904
XbaI 2927
SphI 2975
KpnI 2991
NaeI 3072
NdeI 3093
NdeI 3205
SpeI 3211
XbaI 3223
SalI 3229
PstI 3235
SphI 3241
HindIII 3247
ClaI 3669
EcoRV 3831
NheI 3875
NaeI 4047
NarI 4059
NarI 4080
NarI 4194
PshAI 4358
NaeI 4415
NaeI 4575
Eco52I 4585
NruI 4618
NarI 4851
NaeI 4929
EcoT14I 5015
Tth111I 5865
NdeI 5943
ScaI 7488
NdeI 8180
NaeI 8561
f1 ori
T7p
Amp
HMG1
Tet
pALHMG106
8871 bp

図10

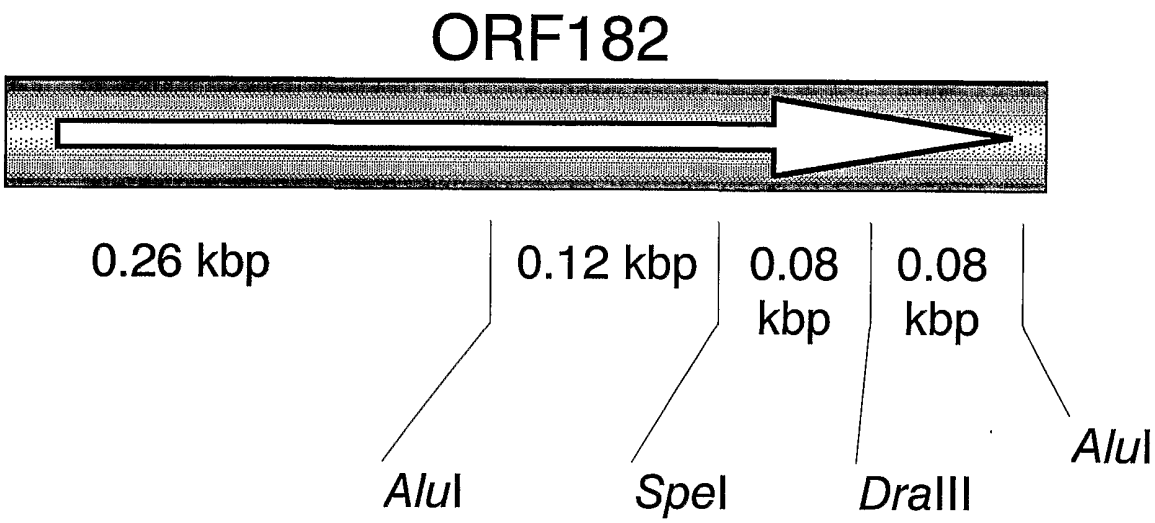


図11

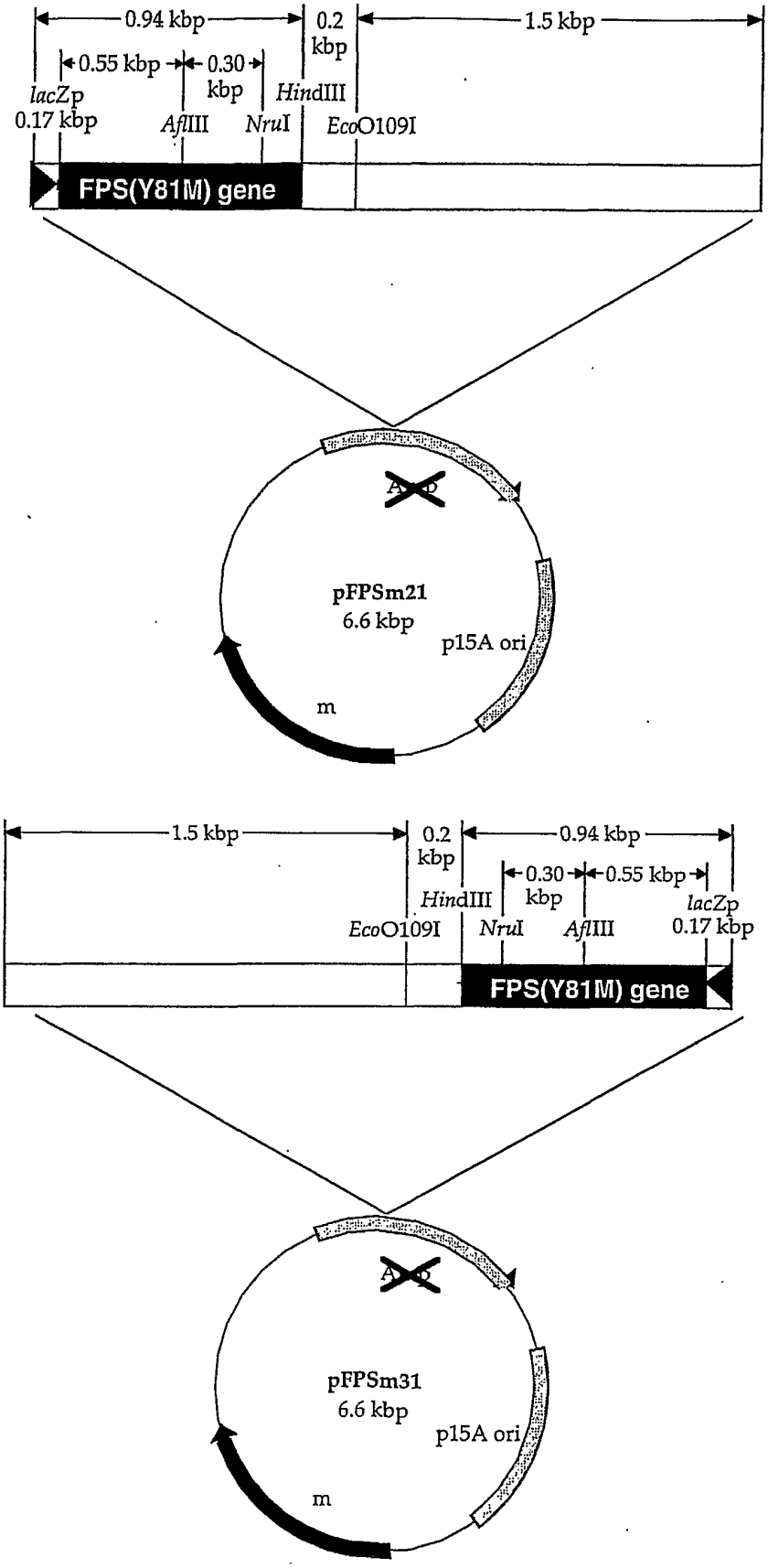

0.94 kbp
0.2 kbp
1.5 kbp
0.55 kbp
0.30 kbp
lacZp
0.17 kbp
AflIII
NruI
HindIII
EcoO109I
FPS(Y81M) gene
pFPSm21
6.6 kbp
p15A ori
m
1.5 kbp
0.2 kbp
0.94 kbp
0.30 kbp
0.55 kbp
HindIII
EcoO109I
NruI
AflIII
lacZp
0.17 kbp
FPS(Y81M) gene
pFPSm31
6.6 kbp
p15A ori
m

図12

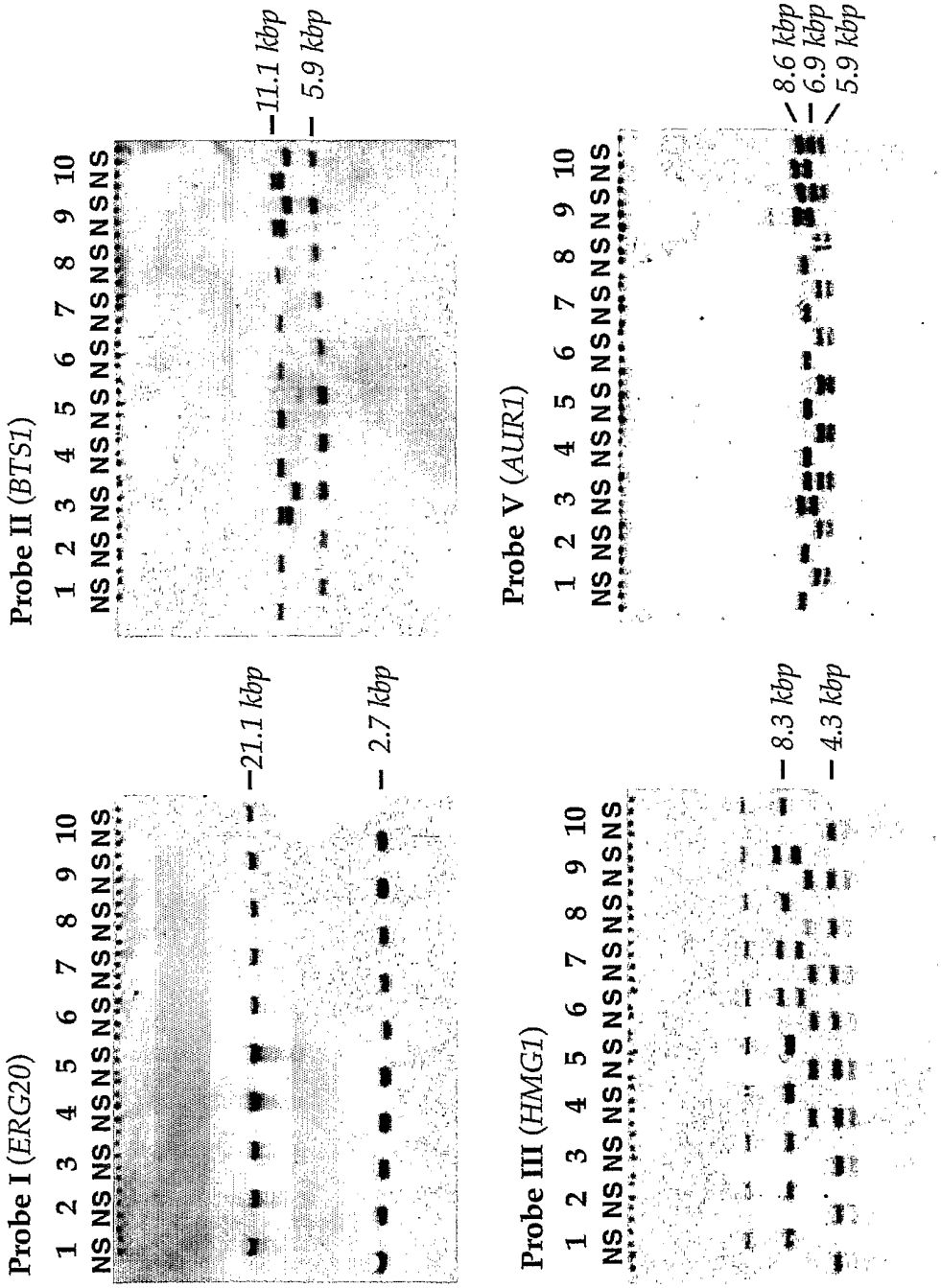

Probe I (ERG20)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
NS NS NS NS NS NS NS NS NS NS
21.1 kbp
2.7 kbp
Probe II (BTS1)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
NS NS NS NS NS NS NS NS NS NS
11.1 kbp
5.9 kbp
Probe III (HMG1)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
NS NS NS NS NS NS NS NS NS NS
8.3 kbp
4.3 kbp
Probe V (AUR1)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
NS NS NS NS NS NS NS NS NS NS
8.6 kbp
6.9 kbp
5.9 kbp

図13

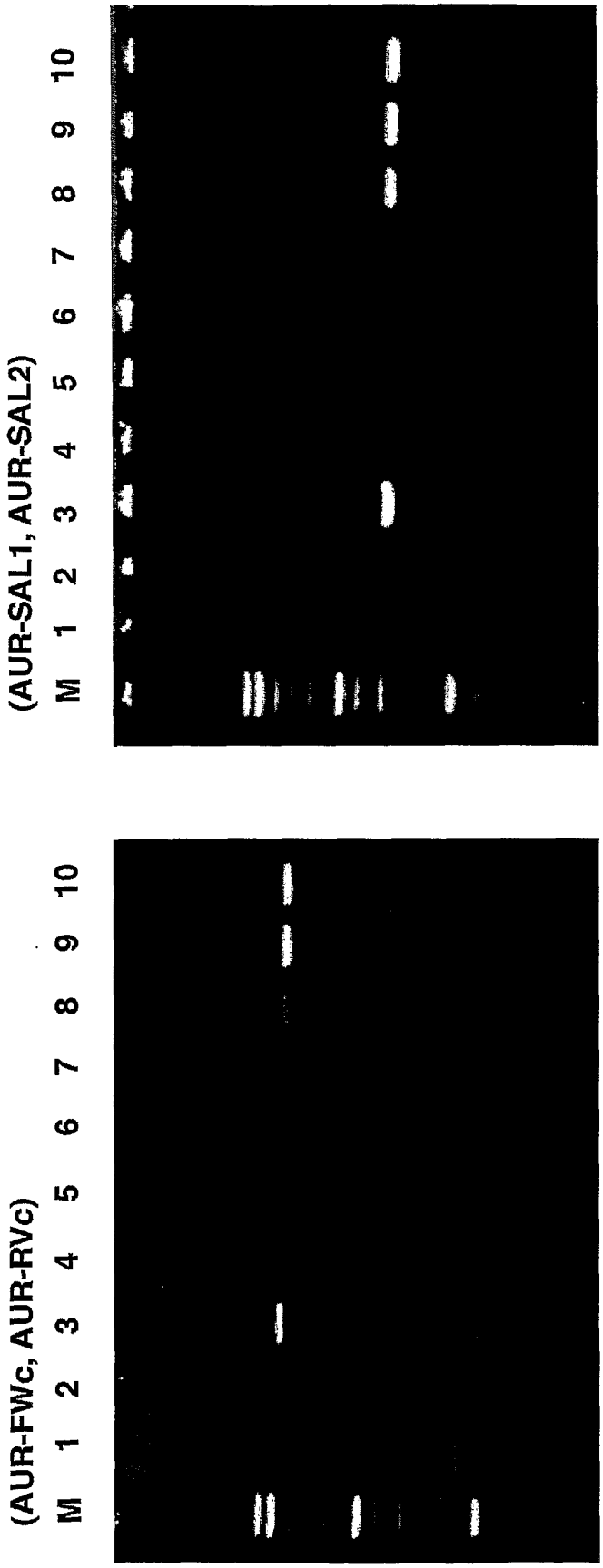

(AUR-SAL1, AUR-SAL2)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
(AUR-FWc, AUR-RVc)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

図14

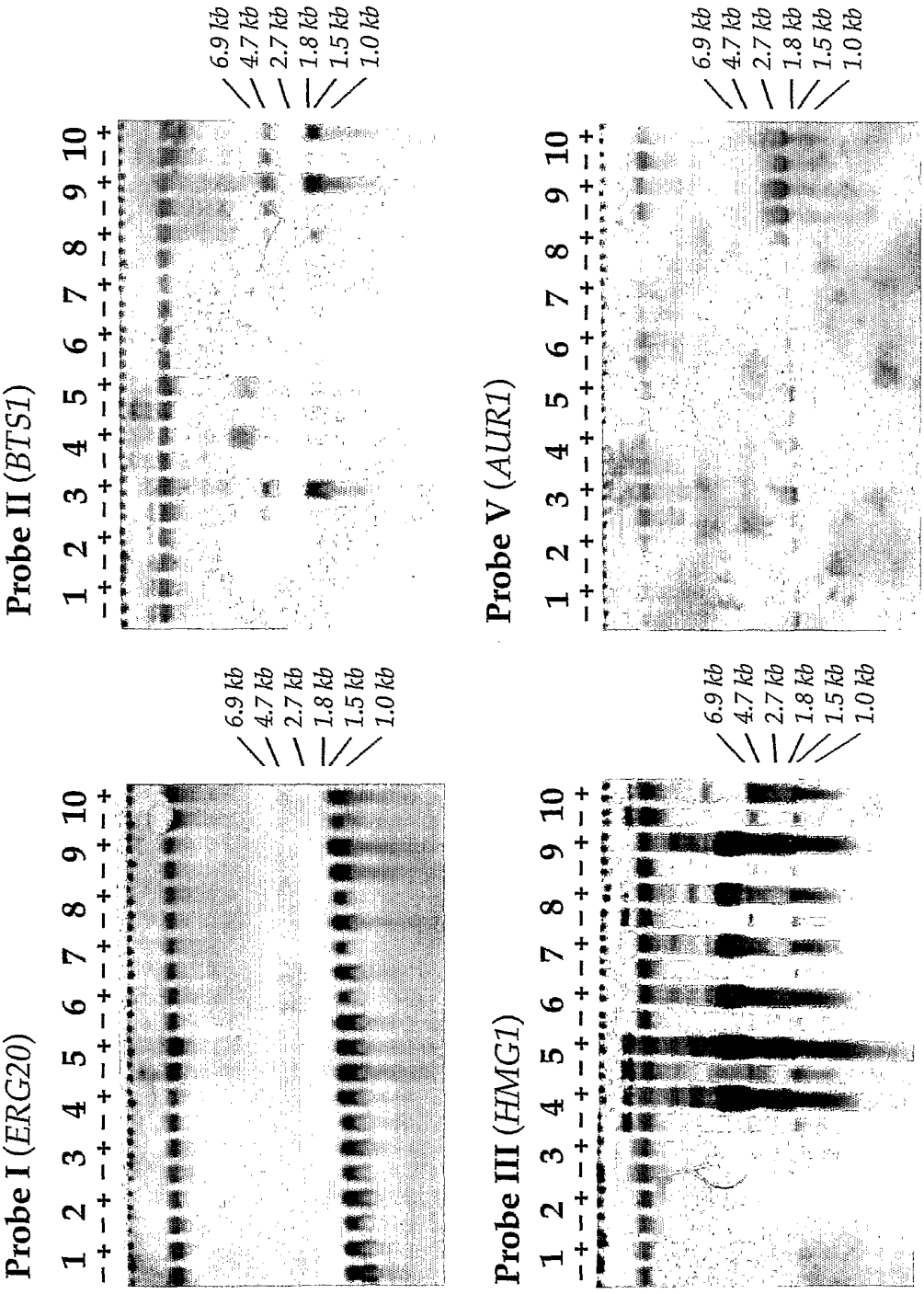

Probe I (ERG20)
Probe II (BTS1)
Probe III (HMG1)
Probe V (AUR1)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
− + − + − + − + − + − + − + − + − +
6.9 kb
4.7 kb
2.7 kb
1.8 kb
1.5 kb
1.0 kb

図15A

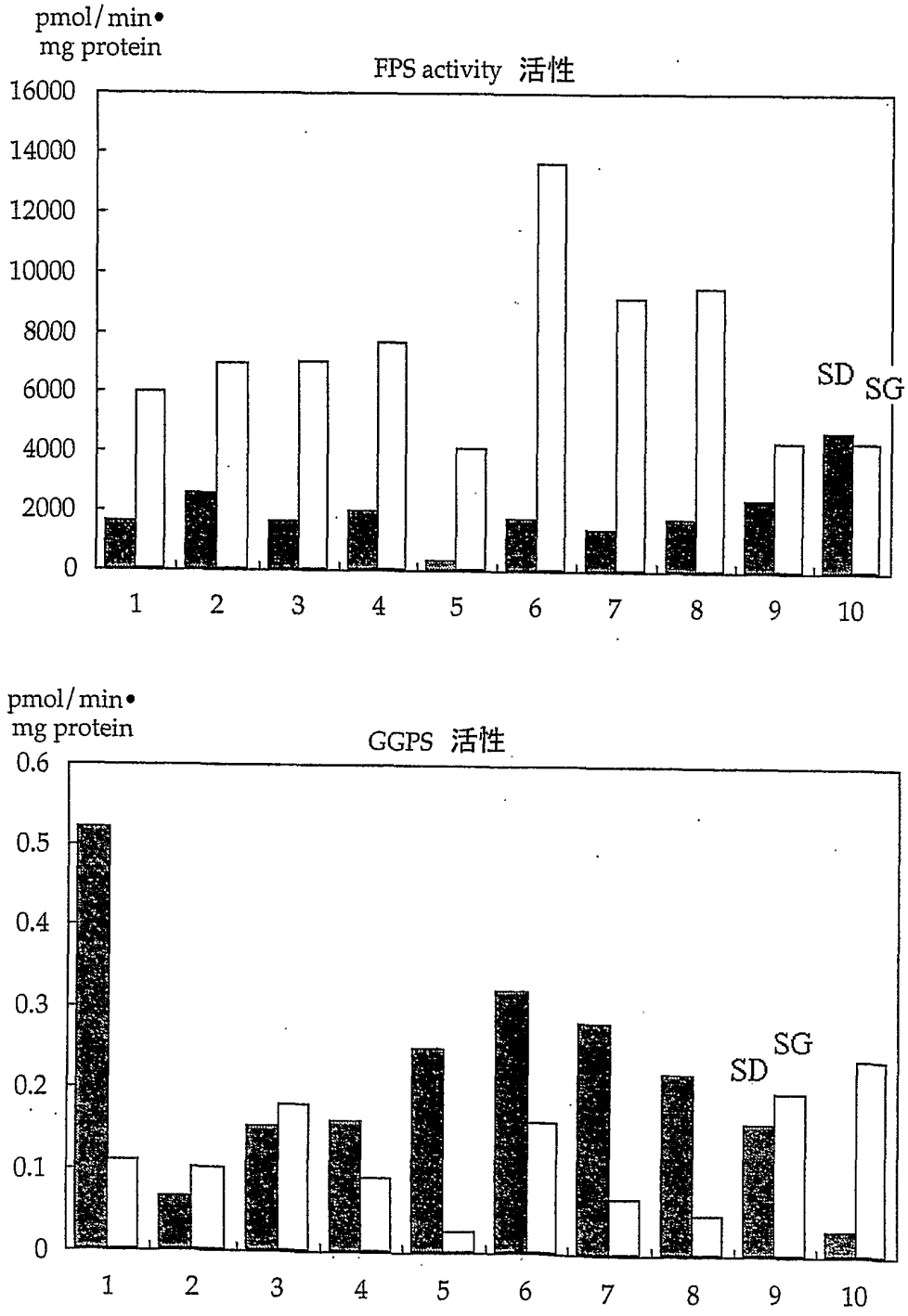

pmol/min•
mg protein
FPS activity 活性
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
SD
SG
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
pmol/min•
mg protein
GGPS 活性
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
SD
SG
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

図15B

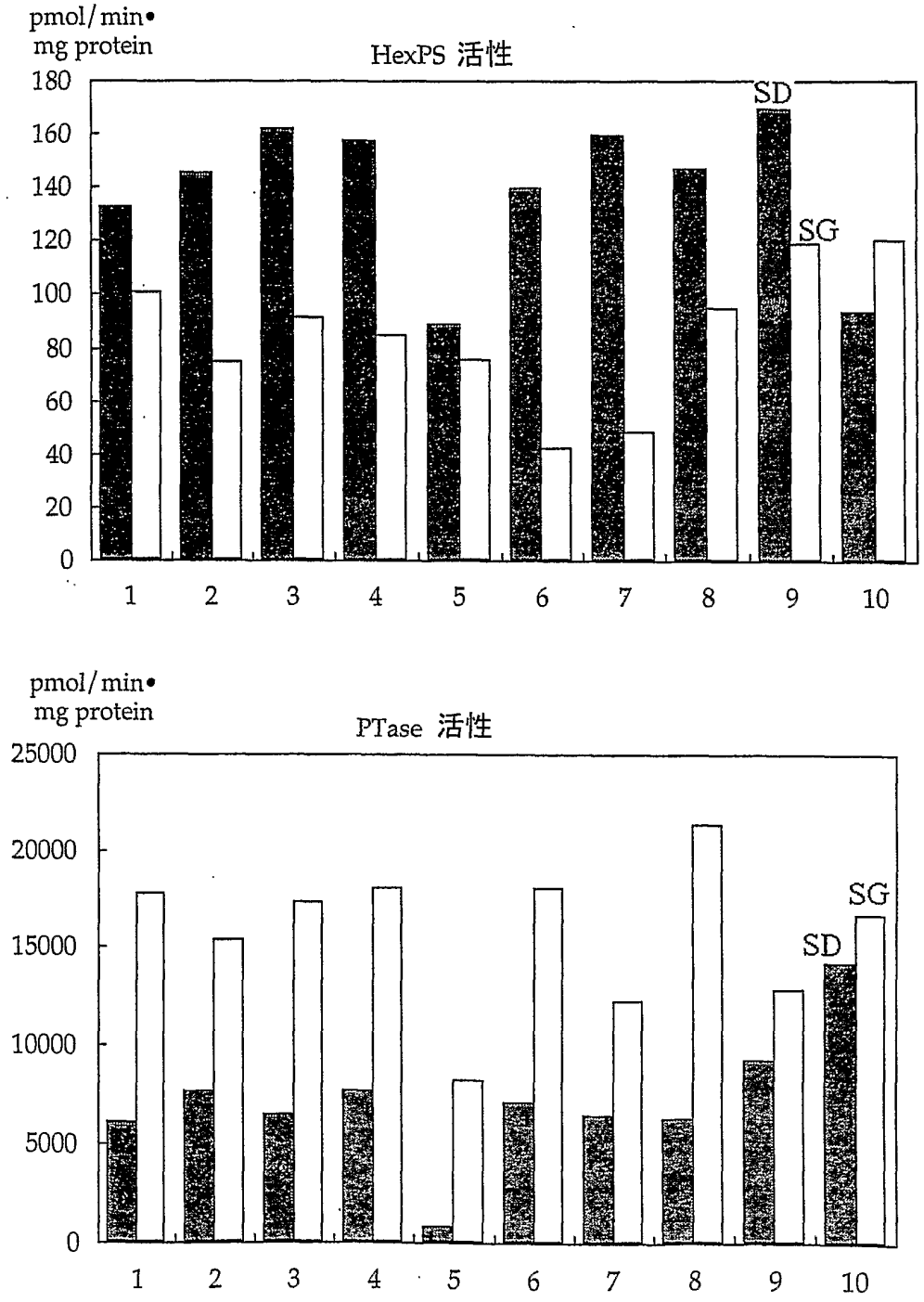

pmol/min•
mg protein
HexPS 活性
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
SD
SG
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
pmol/min•
mg protein
PTase 活性
25000
20000
15000
10000
5000
0
SG
SD
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

図16

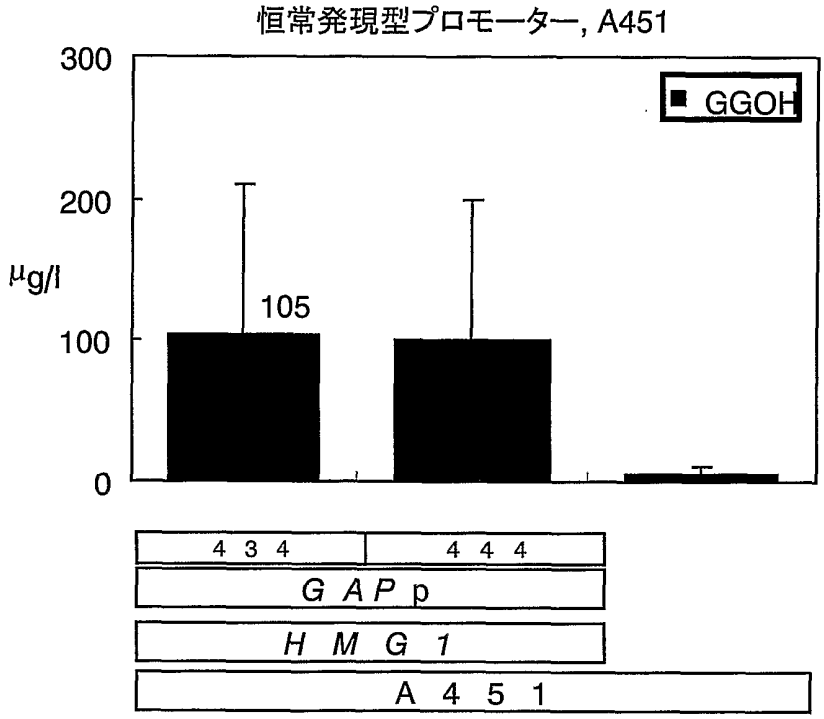

恒常発現型プロモーター, A451
300
200
100
0
μg/l
105
GGOH
434
444
GAPp
HMG1
A451

図17

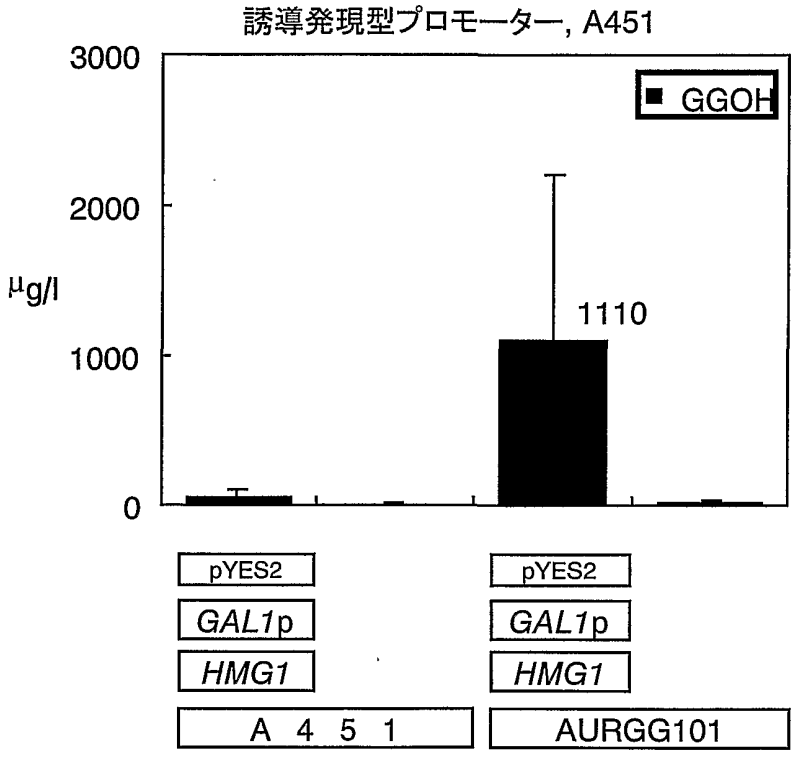

誘導発現型プロモーター, A451
3000
2000
1000
0
μg/l
GGOH
1110
pYES2
GAL1p
HMG1
A 4 5 1
pYES2
GAL1p
HMG1
AURGG101

図18

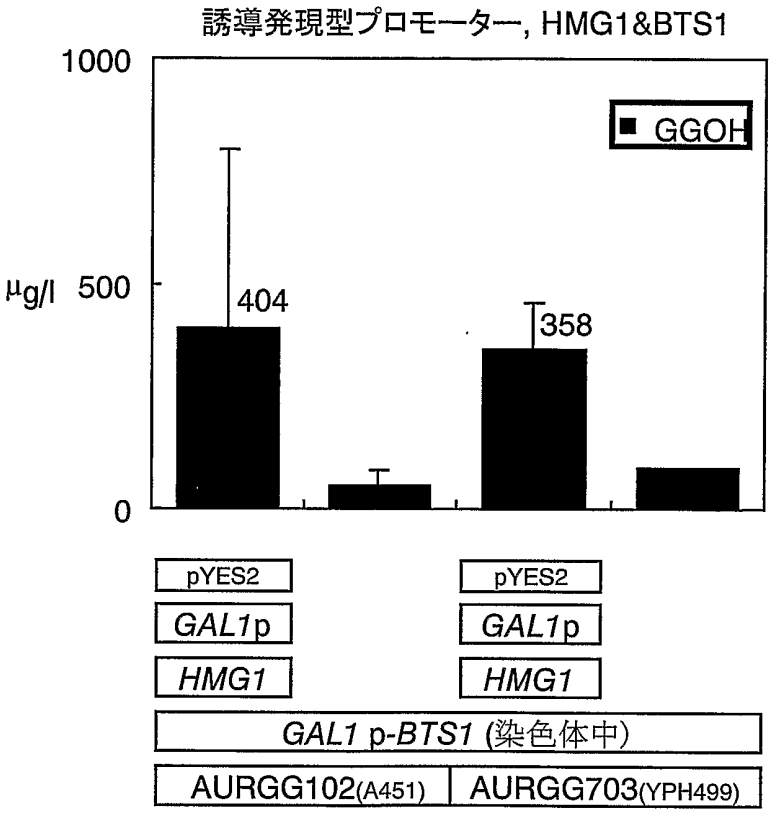

誘導発現型プロモーター, HMG1&BTS1
1000
500
0
μg/l
GGOH
404
358
pYES2
GAL1p
HMG1
pYES2
GAL1p
HMG1
GAL1 p-BTS1 (染色体中)
AURGG102(A451)
AURGG703(YPH499)

図19

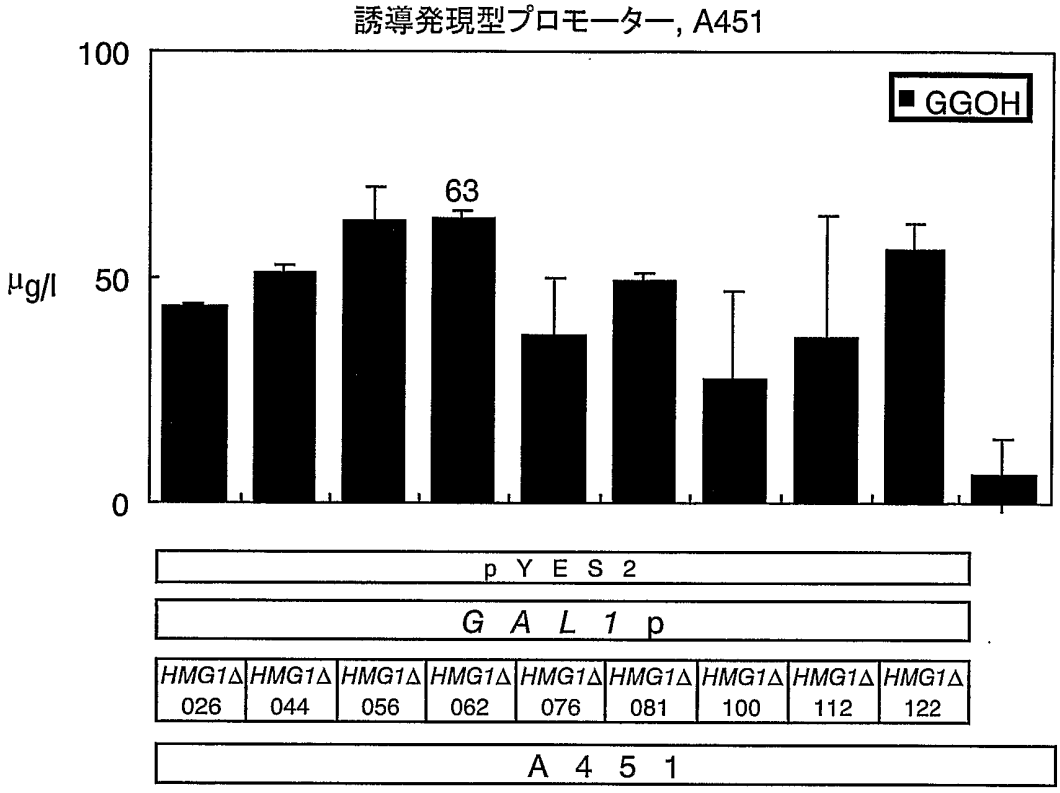

誘導発現型プロモーター, A451
100
50
0
μg/l
■ GGOH
63
pYES2
GAL1p
HMG1Δ 026
HMG1Δ 044
HMG1Δ 056
HMG1Δ 062
HMG1Δ 076
HMG1Δ 081
HMG1Δ 100
HMG1Δ 112
HMG1Δ 122
A451

図20

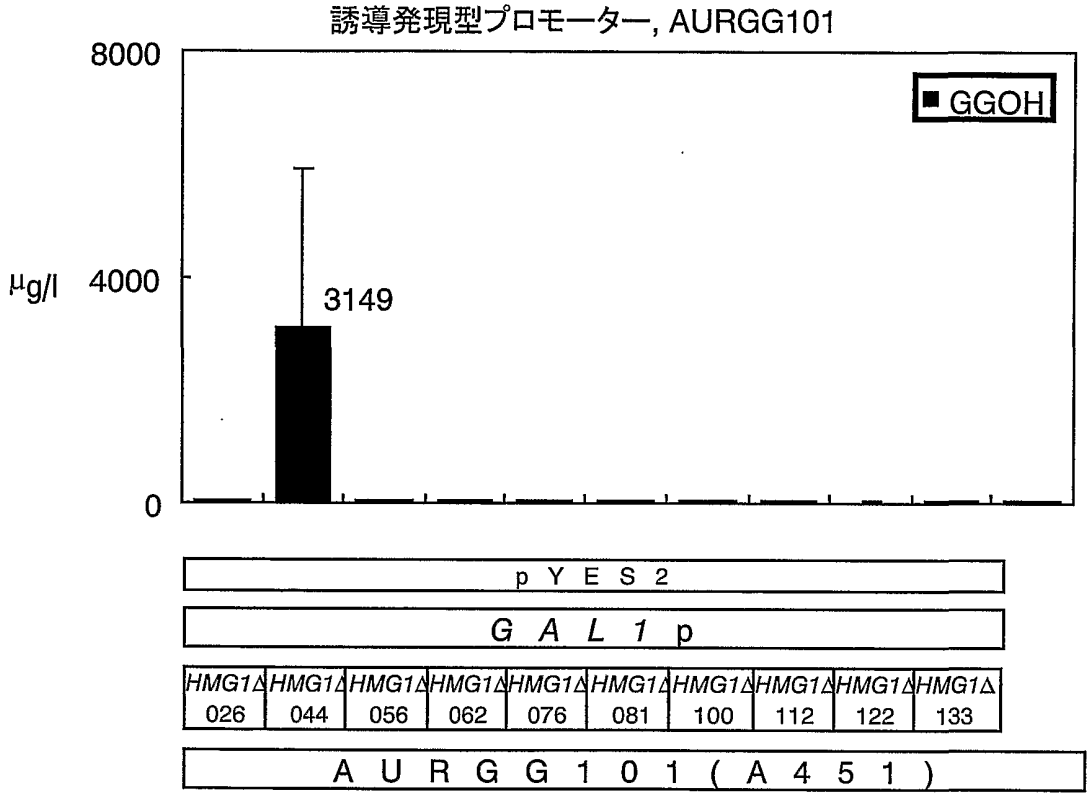

誘導発現型プロモーター, AURGG101
8000
4000
0
μg/l
GGOH
3149
pYES2
GAL1p
HMG1Δ 026
HMG1Δ 044
HMG1Δ 056
HMG1Δ 062
HMG1Δ 076
HMG1Δ 081
HMG1Δ 100
HMG1Δ 112
HMG1Δ 122
HMG1Δ 133
AURGG101(A451)

図21

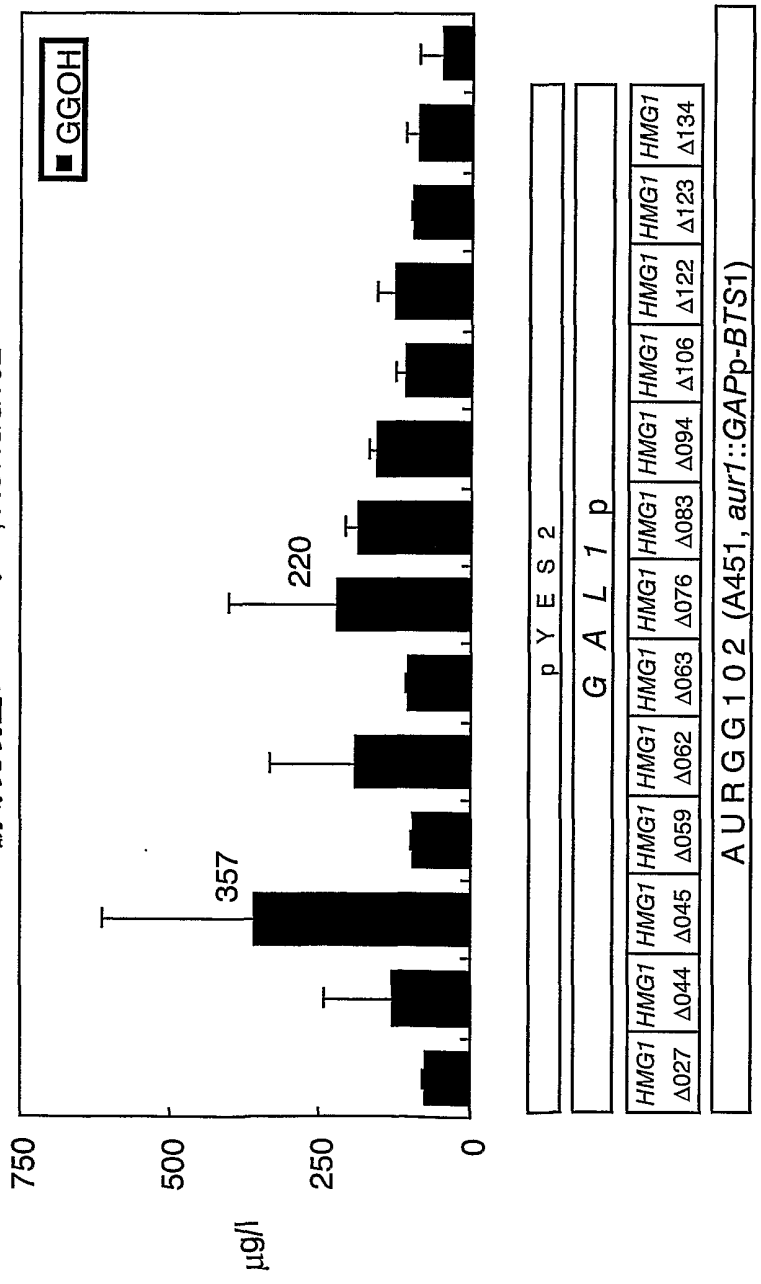

誘導発現型プロモーター, AURGG102
GGOH
750
500
250
0
μg/l
357
220
pYES2
GAL1p
HMG1 Δ027
HMG1 Δ044
HMG1 Δ045
HMG1 Δ059
HMG1 Δ062
HMG1 Δ063
HMG1 Δ076
HMG1 Δ083
HMG1 Δ094
HMG1 Δ106
HMG1 Δ122
HMG1 Δ123
HMG1 Δ134
AURGG102 (A451, aur1::GAPp-BTS1)

図22

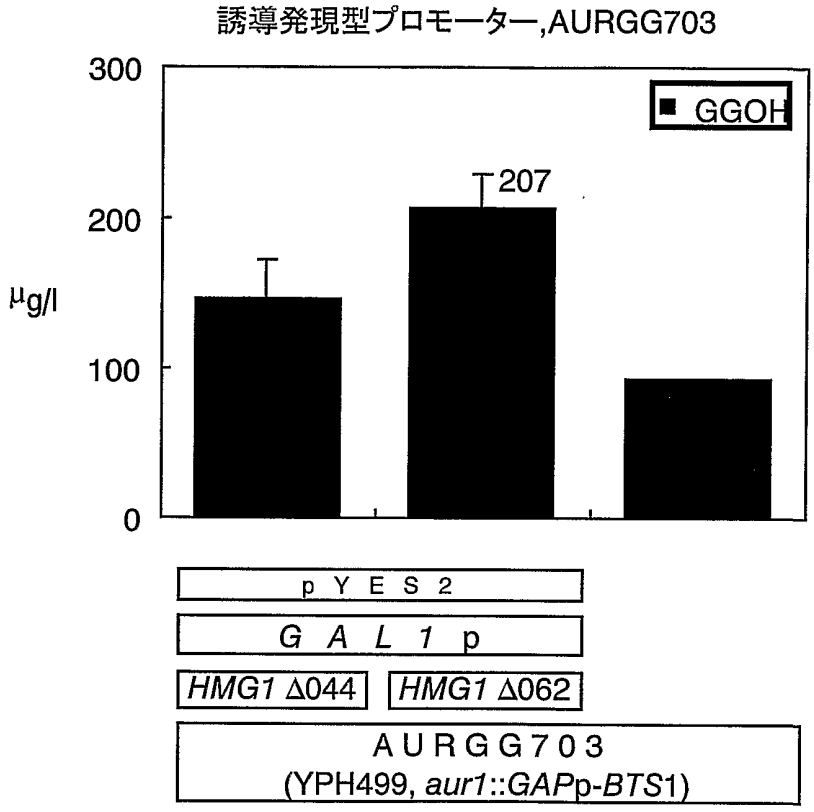

誘導発現型プロモーター,AURGG703
300
200
100
0
μg/l
GGOH
207
pYES2
GAL1p
HMG1 Δ044
HMG1 Δ062
AURGG703
(YPH499, aur1::GAPp-BTS1)

図23

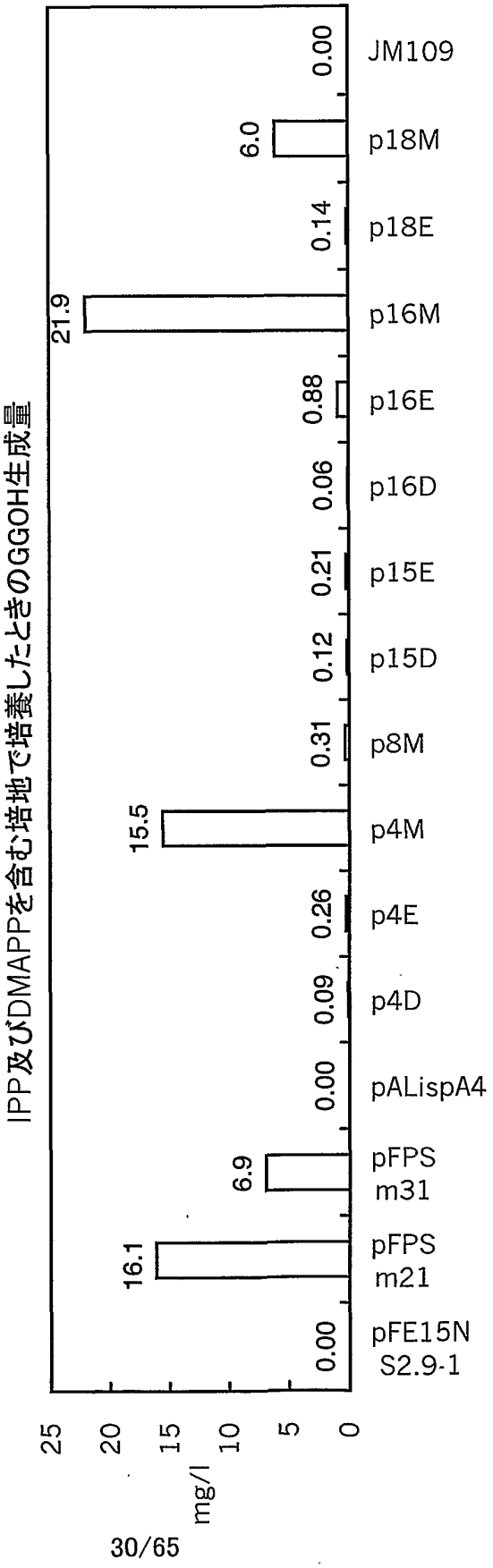

IPP及びDMAPPを含む培地で培養したときのGGOH生成量
mg/l
25
20
15
10
5
0
JM109
p18M
p18E
p16M
p16E
p16D
p15E
p15D
p8M
p4M
p4E
p4D
pALispA4
pFPS m31
pFPS m21
pFE15N S2.9-1
0.00
6.0
0.14
21.9
0.88
0.06
0.21
0.12
0.31
15.5
0.26
0.09
0.00
6.9
16.1
0.00

図24

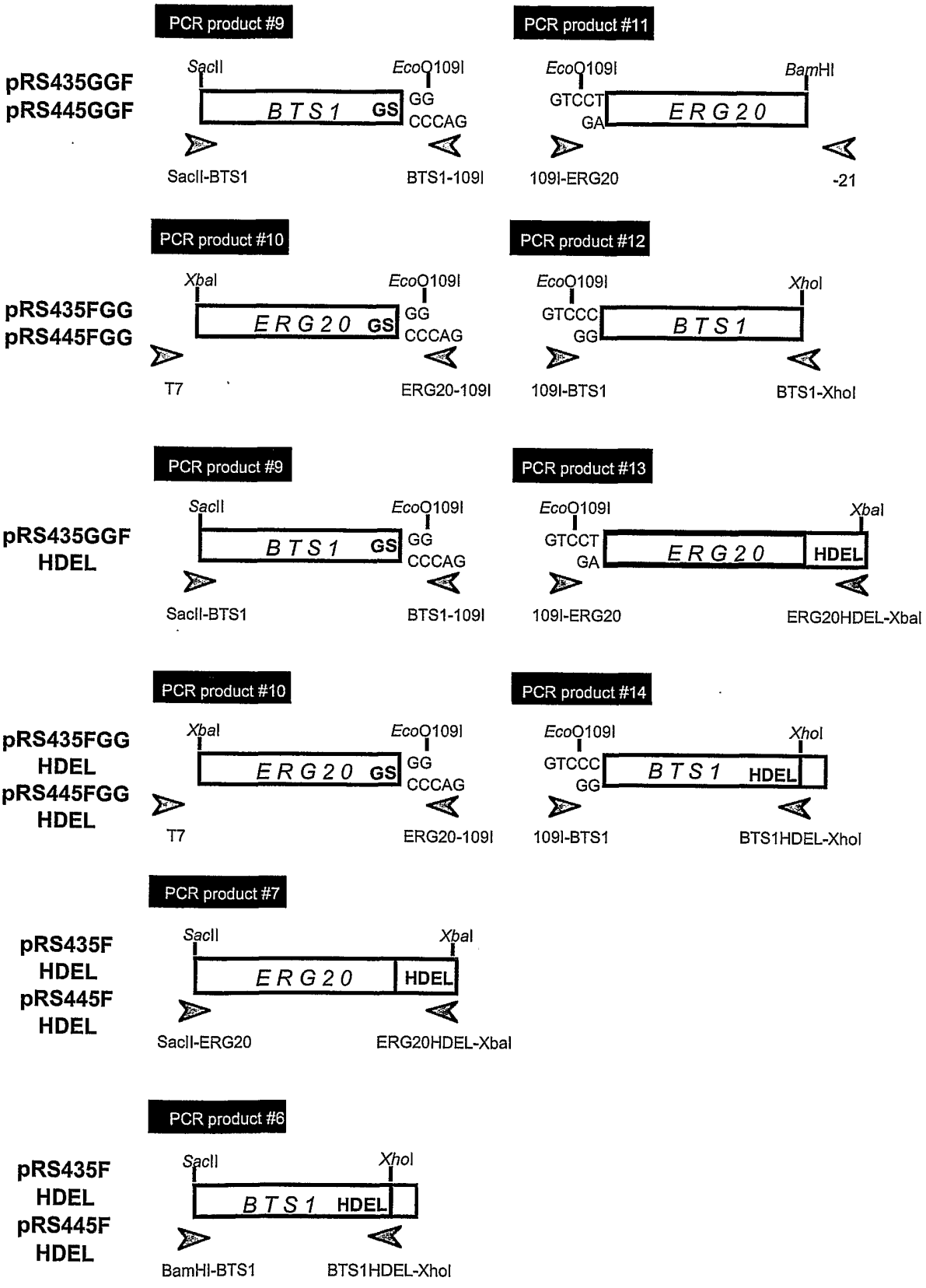

pRS435GGF
pRS445GGF
PCR product #9
SacII
EcoO109I
BTS1 GS
GG
CCCAG
SacII-BTS1
BTS1-109I
PCR product #11
EcoO109I
BamHI
GTCCT
GA
ERG20
109I-ERG20
-21
pRS435FGG
pRS445FGG
PCR product #10
XbaI
EcoO109I
ERG20 GS
GG
CCCAG
T7
ERG20-109I
PCR product #12
EcoO109I
XhoI
GTCCC
GG
BTS1
109I-BTS1
BTS1-XhoI
pRS435GGF
HDEL
PCR product #9
SacII
EcoO109I
BTS1 GS
GG
CCCAG
SacII-BTS1
BTS1-109I
PCR product #13
EcoO109I
XbaI
GTCCT
GA
ERG20
HDEL
109I-ERG20
ERG20HDEL-XbaI
pRS435FGG
HDEL
pRS445FGG
HDEL
PCR product #10
XbaI
EcoO109I
ERG20 GS
GG
CCCAG
T7
ERG20-109I
PCR product #14
EcoO109I
XhoI
GTCCC
GG
BTS1
HDEL
109I-BTS1
BTS1HDEL-XhoI
pRS435F
HDEL
pRS445F
HDEL
PCR product #7
SacII
XbaI
ERG20
HDEL
SacII-ERG20
ERG20HDEL-XbaI
pRS435F
HDEL
pRS445F
HDEL
PCR product #6
SacII
XhoI
BTS1
HDEL
BamHI-BTS1
BTS1HDEL-XhoI

図25

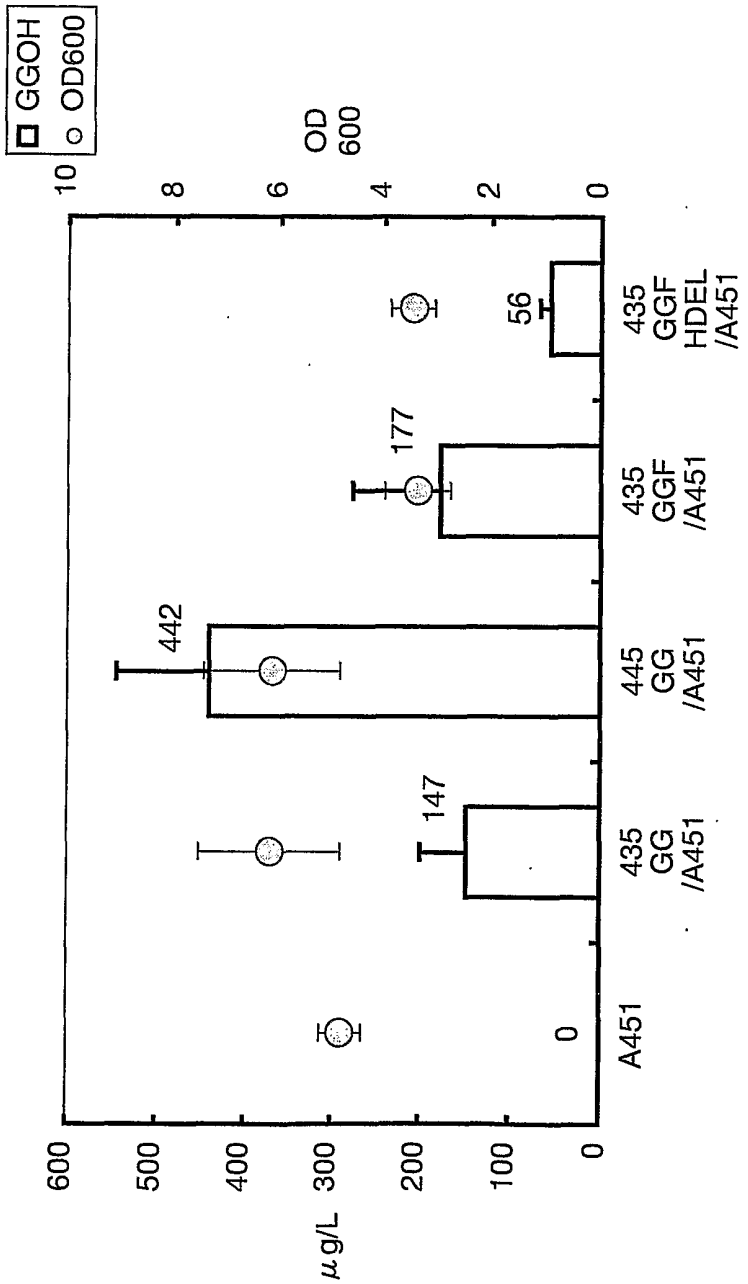

GGOH
OD600
OD 600
μg/L
A451
435 GG /A451
445 GG /A451
435 GGF /A451
435 GGF HDEL /A451
147
442
177
56

図26

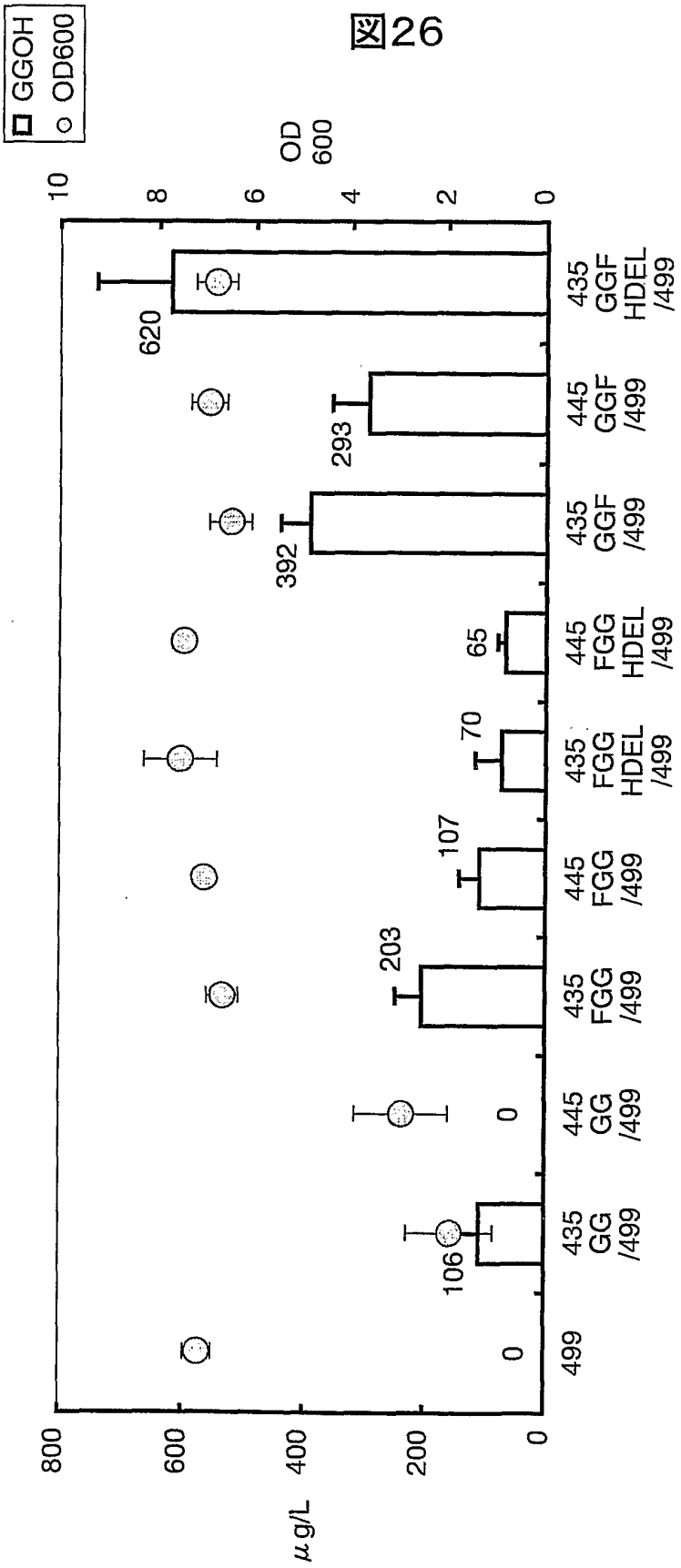

GGOH
OD600
OD 600
μg/L
800
600
400
200
0
10
8
6
4
2
0
620
293
392
65
70
107
203
0
106
0
499
435 GGF HDEL /499
445 GGF /499
435 GGF /499
445 FGG HDEL /499
435 FGG HDEL /499
445 FGG /499
435 FGG /499
445 GG /499
435 GG /499

図27

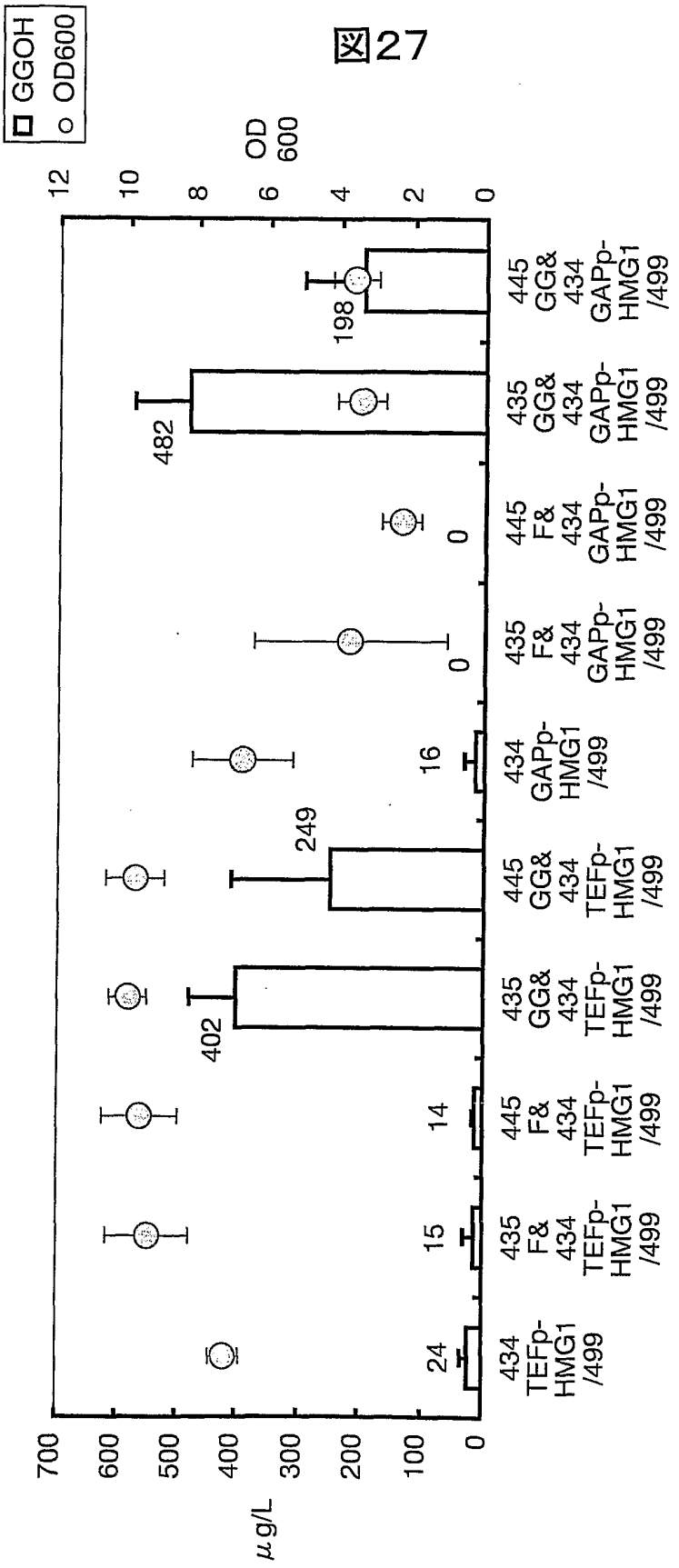

GGOH
OD600
OD 600
μg/L
0
100
200
300
400
500
600
700
0
2
4
6
8
10
12
24
15
14
402
249
16
0
0
482
198
434 TEFp-HMG1 /499
435 F& 434 TEFp-HMG1 /499
445 F& 434 TEFp-HMG1 /499
435 GG& 434 TEFp-HMG1 /499
445 GG& 434 TEFp-HMG1 /499
434 GAPp-HMG1 /499
435 F& 434 GAPp-HMG1 /499
445 F& 434 GAPp-HMG1 /499
435 GG& 434 GAPp-HMG1 /499
445 GG& 434 GAPp-HMG1 /499

図28

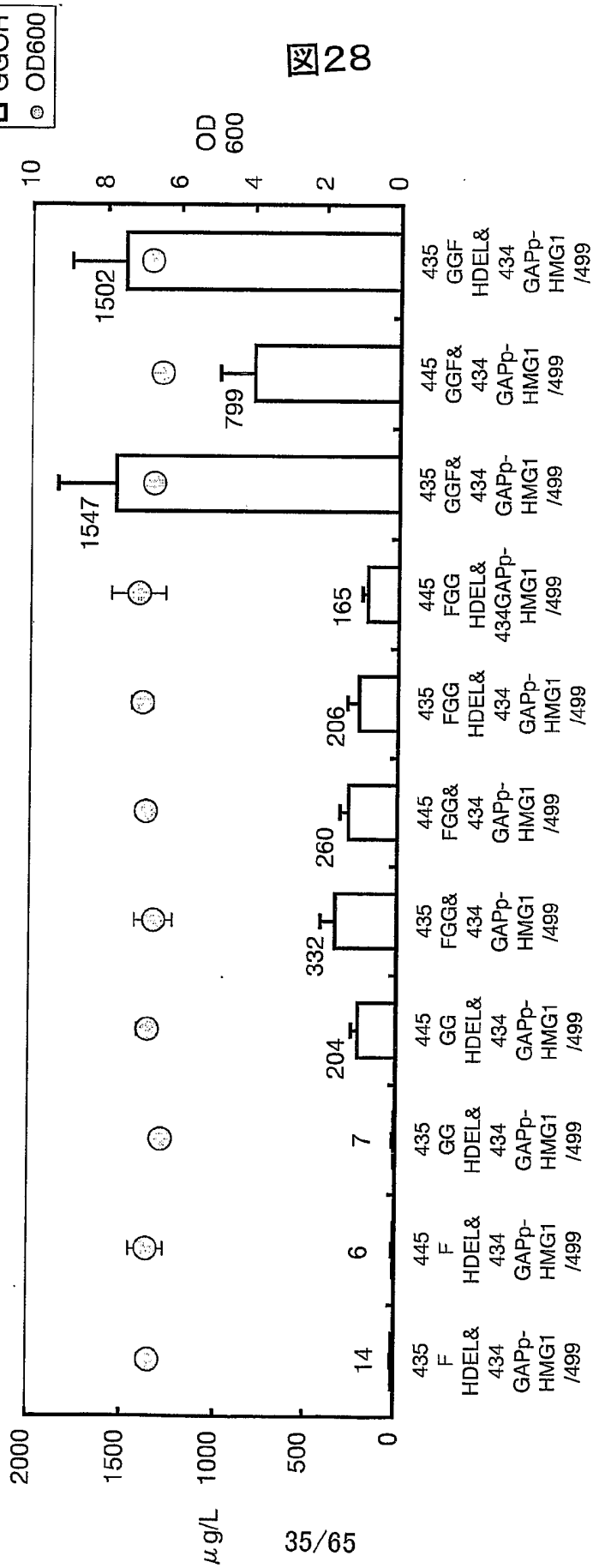
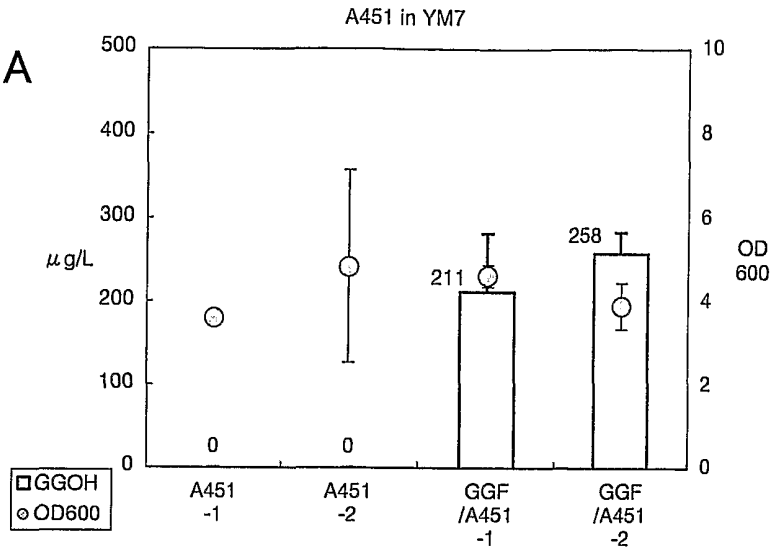
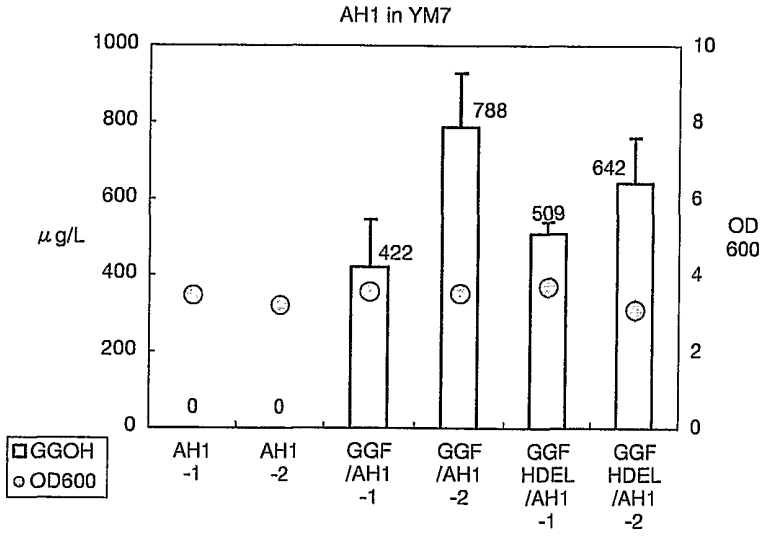

GGOH
OD600
μg/L
OD 600
2000
1500
1000
500
0
10
8
6
4
2
0
14
7
204
332
260
206
165
1547
799
1502
435 F HDEL& 434 GAPp- HMG1 /499
445 F HDEL& 434 GAPp- HMG1 /499
435 GG HDEL& 434 GAPp- HMG1 /499
445 GG HDEL& 434 GAPp- HMG1 /499
435 FGG& 434 GAPp- HMG1 /499
445 FGG& 434 GAPp- HMG1 /499
435 FGG HDEL& 434 GAPp- HMG1 /499
445 FGG HDEL& 434GAPp- HMG1 /499
435 GGF& 434 GAPp- HMG1 /499
445 GGF& 434 GAPp- HMG1 /499
435 GGF HDEL& 434 GAPp- HMG1 /499

図29A


A451 in YM7
500
400
300
200
100
0
μg/L
10
8
6
4
2
0
OD 600
258
211
0
0
GGOH
OD600
A451 -1
A451 -2
GGF /A451 -1
GGF /A451 -2


AH1 in YM7
1000
800
600
400
200
0
μg/L
10
8
6
4
2
0
OD 600
788
642
509
422
0
0
GGOH
OD600
AH1 -1
AH1 -2
GGF /AH1 -1
GGF /AH1 -2
GGF HDEL /AH1 -1
GGF HDEL /AH1 -2

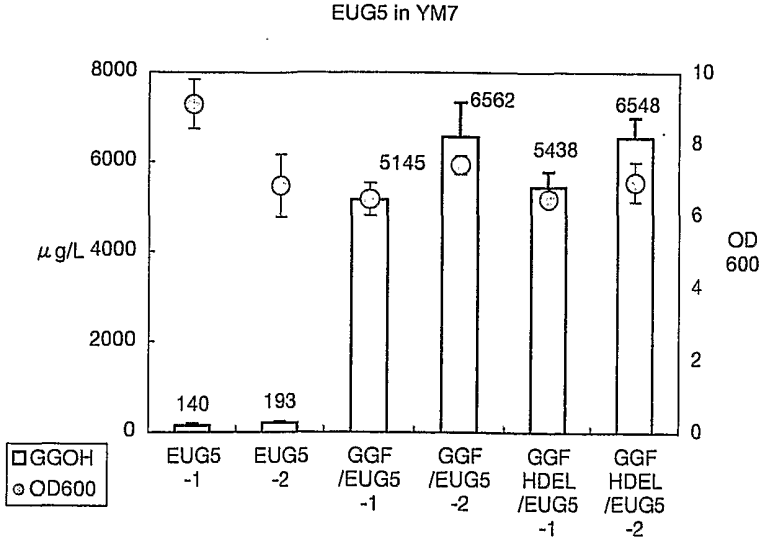
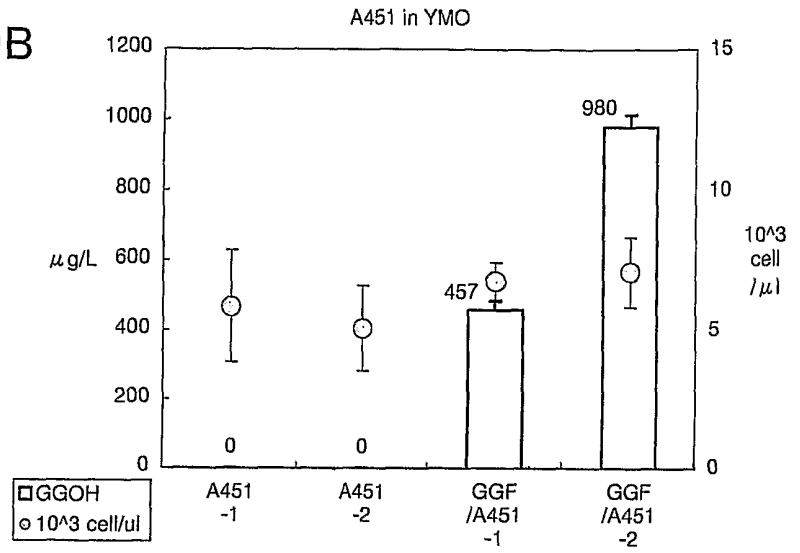
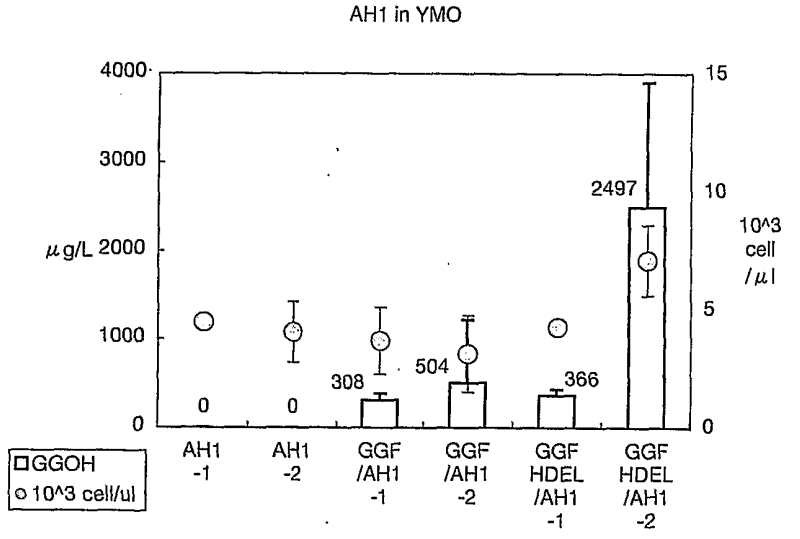

EUG5 in YM7
8000
6000
4000
2000
0
μg/L
10
8
6
4
2
0
OD 600
6562
6548
5438
5145
140
193
GGOH
OD600
EUG5 -1
EUG5 -2
GGF /EUG5 -1
GGF /EUG5 -2
GGF HDEL /EUG5 -1
GGF HDEL /EUG5 -2

図29B


A451 in YMO
μg/L
10^3 cell /μl
980
457
0
0
□GGOH
○ 10^3 cell/ul
A451 -1
A451 -2
GGF /A451 -1
GGF /A451 -2


AH1 in YMO
μg/L
10^3 cell /μl
2497
308
504
366
0
0
□GGOH
○ 10^3 cell/ul
AH1 -1
AH1 -2
GGF /AH1 -1
GGF /AH1 -2
GGF HDEL /AH1 -1
GGF HDEL /AH1 -2

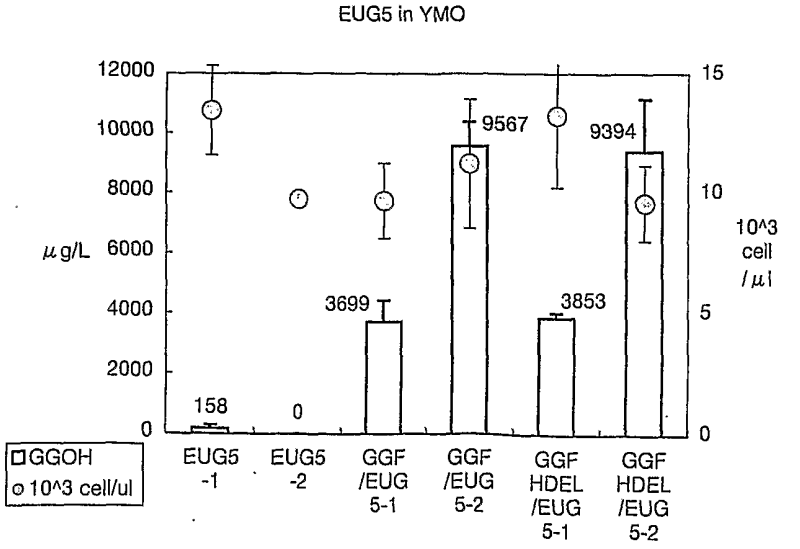
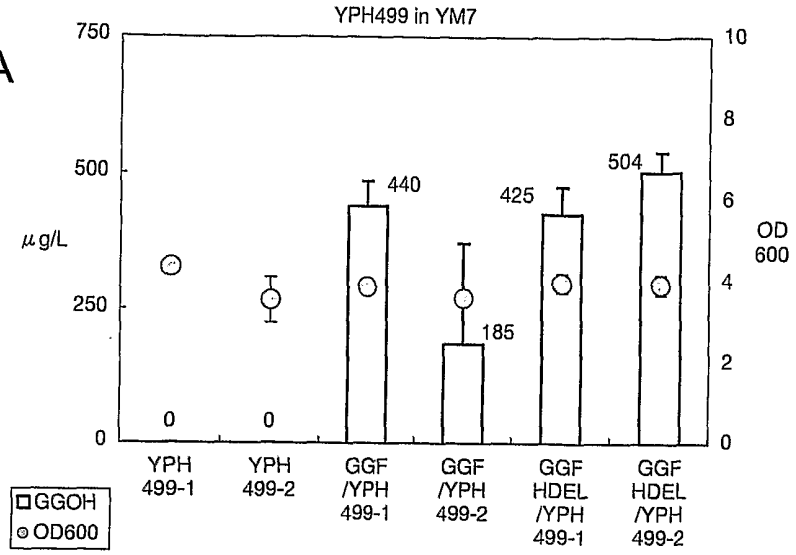
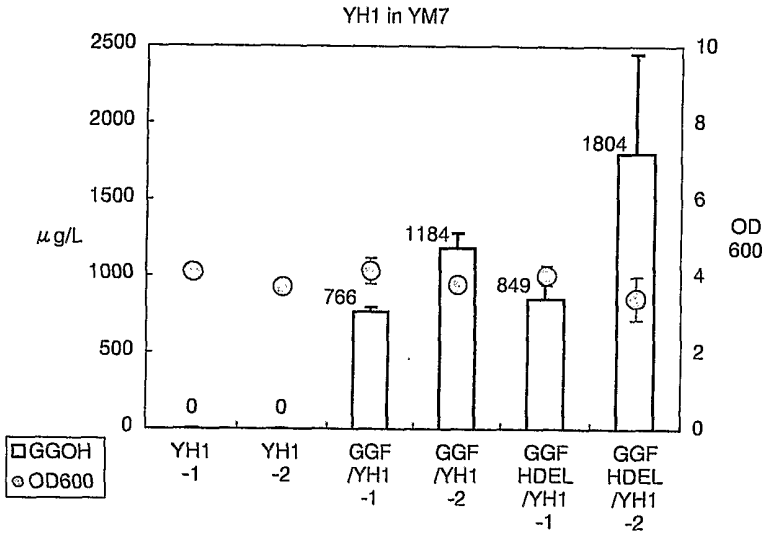

EUG5 in YMO
μg/L
10^3 cell /μl
9567
9394
3699
3853
158
0
□GGOH
○ 10^3 cell/ul
EUG5 -1
EUG5 -2
GGF /EUG 5-1
GGF /EUG 5-2
GGF HDEL /EUG 5-1
GGF HDEL /EUG 5-2

図30A


YPH499 in YM7
μg/L
OD 600
750
500
250
0
10
8
6
4
2
0
440
425
504
185
0
0
YPH 499-1
YPH 499-2
GGF /YPH 499-1
GGF /YPH 499-2
GGF HDEL /YPH 499-1
GGF HDEL /YPH 499-2
GGOH
OD600


YH1 in YM7
μg/L
OD 600
2500
2000
1500
1000
500
0
10
8
6
4
2
0
1804
1184
766
849
0
0
YH1 -1
YH1 -2
GGF /YH1 -1
GGF /YH1 -2
GGF HDEL /YH1 -1
GGF HDEL /YH1 -2
GGOH
OD600

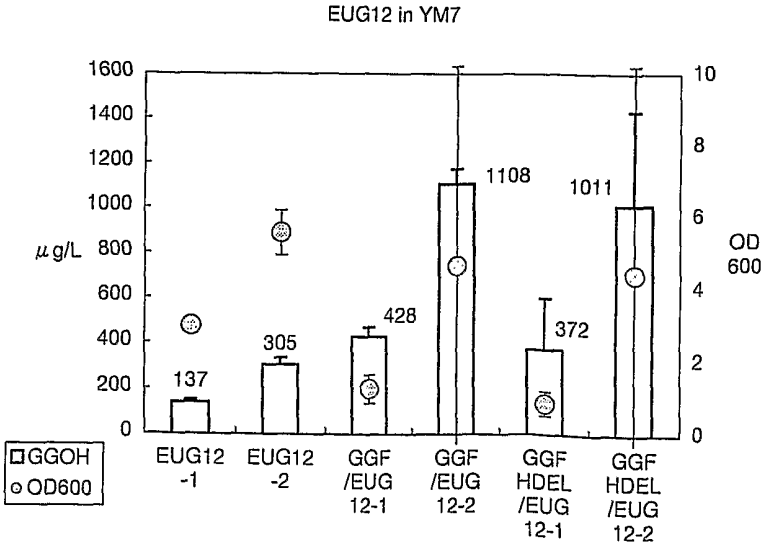
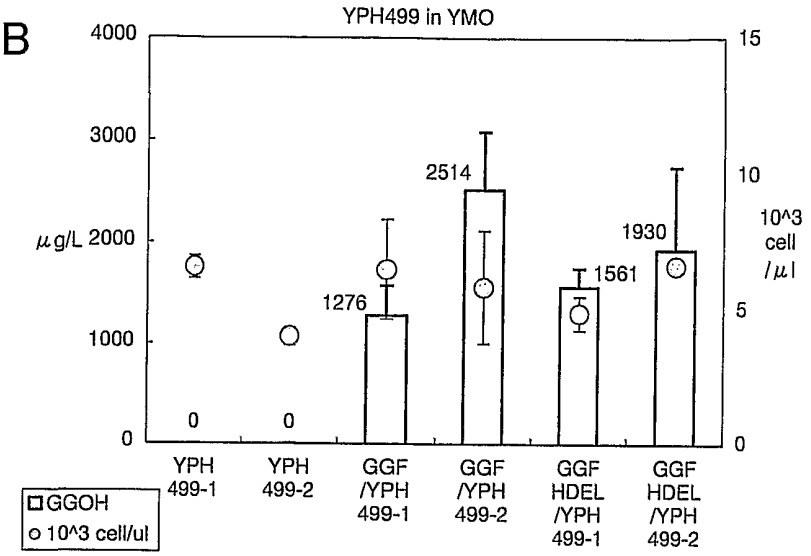
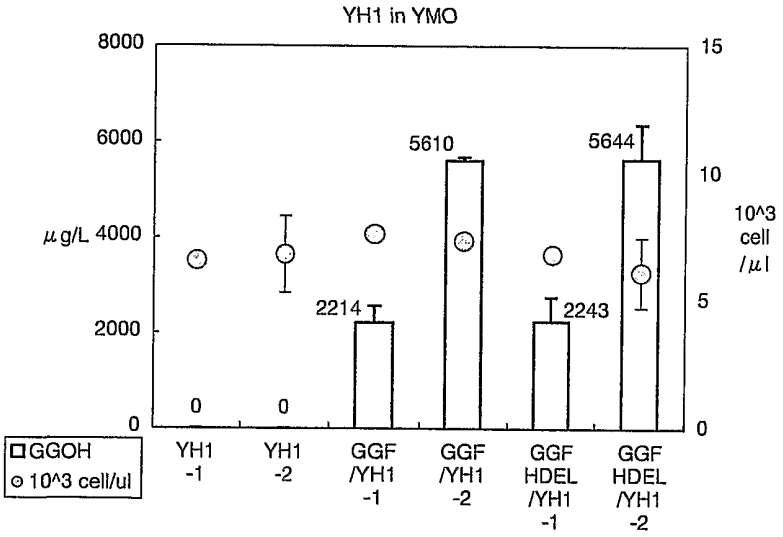

EUG12 in YM7
μg/L
OD 600
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
8
6
4
2
0
1108
1011
428
372
305
137
EUG12 -1
EUG12 -2
GGF /EUG 12-1
GGF /EUG 12-2
GGF HDEL /EUG 12-1
GGF HDEL /EUG 12-2
GGOH
OD600

図30B


YPH499 in YMO
4000
3000
2000
1000
0
μg/L
15
10
5
0
10^3 cell /μl
2514
1930
1561
1276
0
0
YPH 499-1
YPH 499-2
GGF /YPH 499-1
GGF /YPH 499-2
GGF HDEL /YPH 499-1
GGF HDEL /YPH 499-2
GGOH
10^3 cell/ul


YH1 in YMO
8000
6000
4000
2000
0
μg/L
15
10
5
0
10^3 cell /μl
5610
5644
2214
2243
0
0
YH1 -1
YH1 -2
GGF /YH1 -1
GGF /YH1 -2
GGF HDEL /YH1 -1
GGF HDEL /YH1 -2
GGOH
10^3 cell/ul

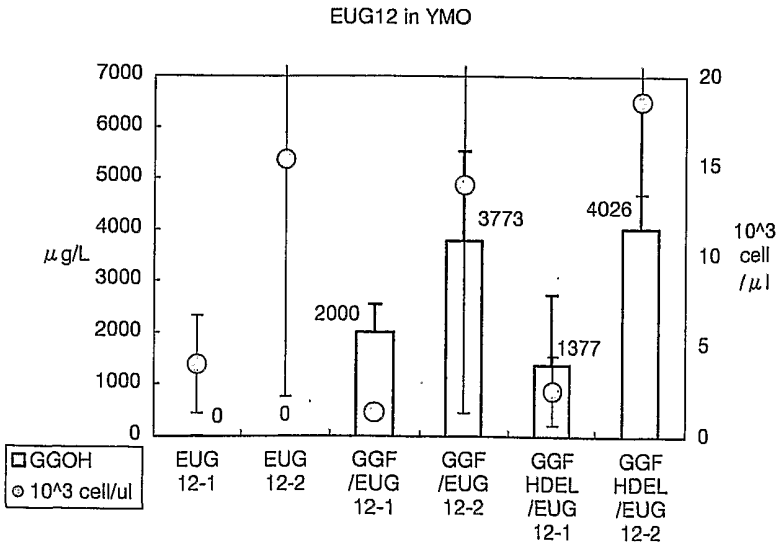

EUG12 in YMO
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
μg/L
20
15
10
5
0
10^3 cell /μl
3773
4026
2000
1377
0
0
EUG 12-1
EUG 12-2
GGF /EUG 12-1
GGF /EUG 12-2
GGF HDEL /EUG 12-1
GGF HDEL /EUG 12-2
GGOH
10^3 cell/ul

図３１Ａ

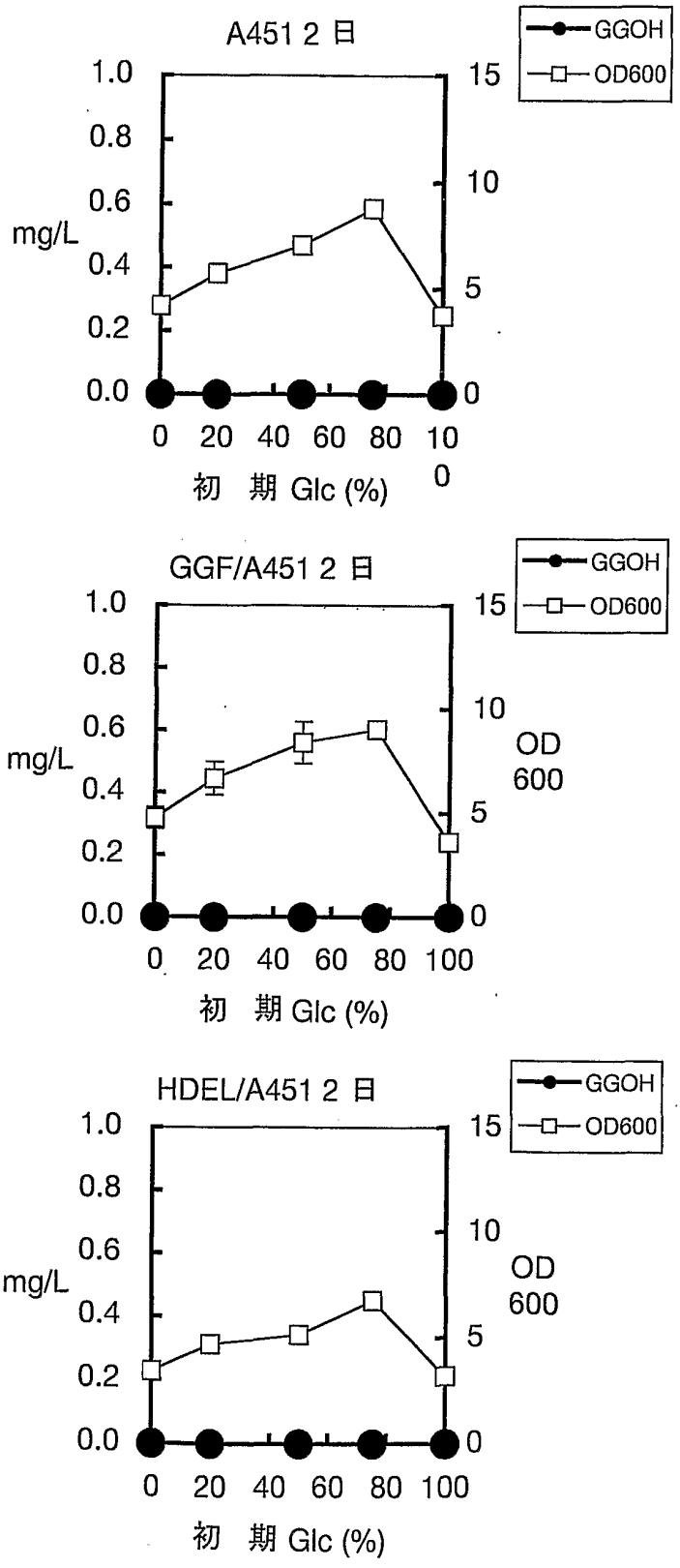


図３１Ｂ

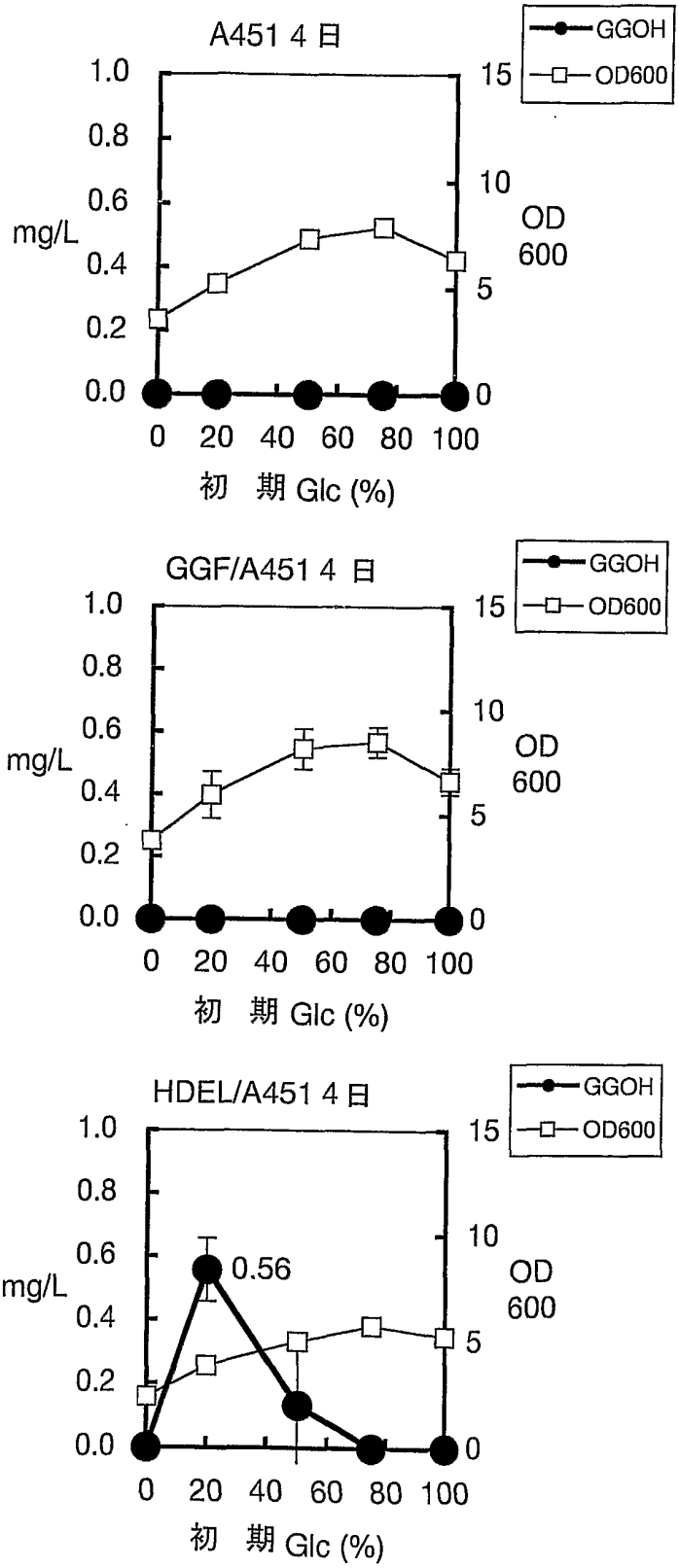
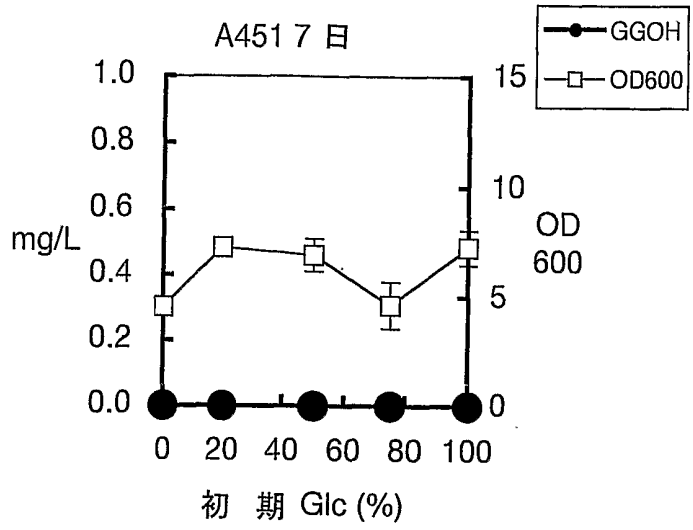
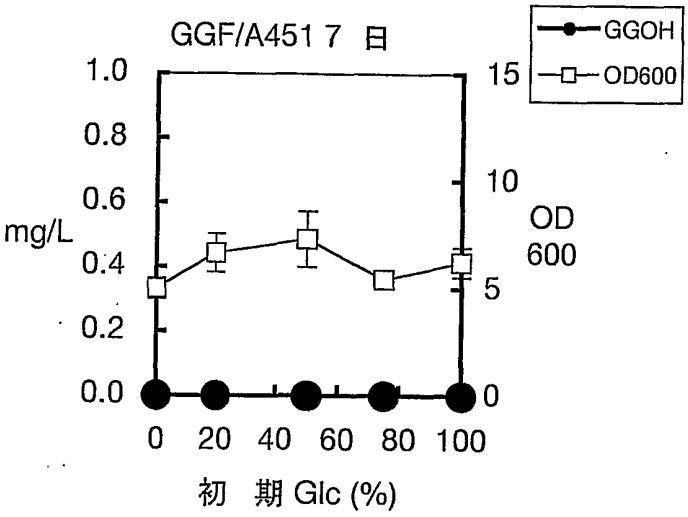

A451 4 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)
GGF/A451 4 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)
HDEL/A451 4 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
0.56
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３１Ｃ


A451 7 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)


GGF/A451 7 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

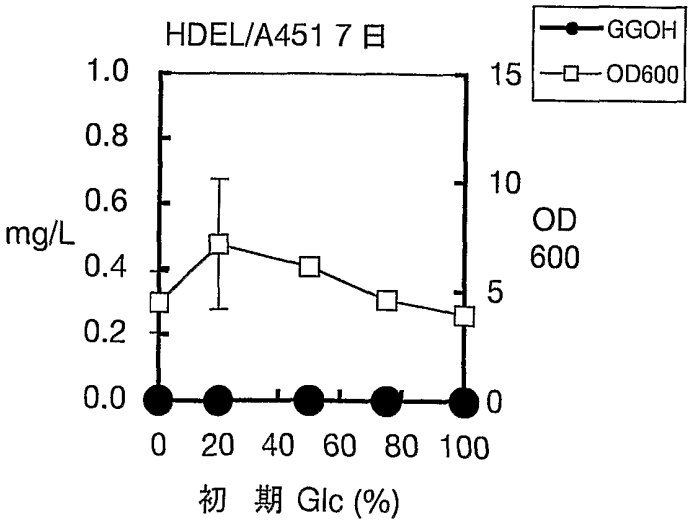
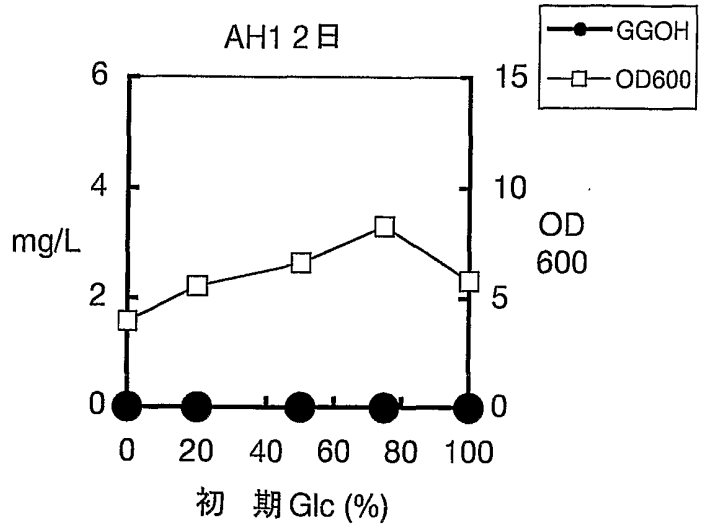
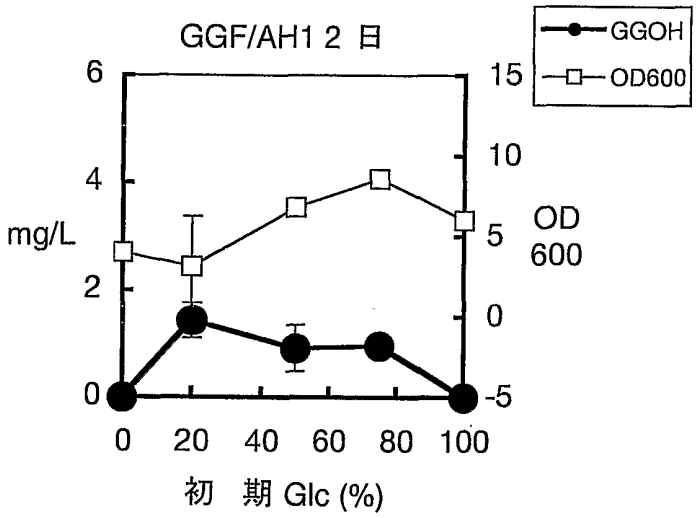

HDEL/A451 7 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３２Ａ


AH1 2日
GGOH
OD600
6
4
2
0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)


GGF/AH1 2 日
GGOH
OD600
6
4
2
0
mg/L
15
10
5
0
-5
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

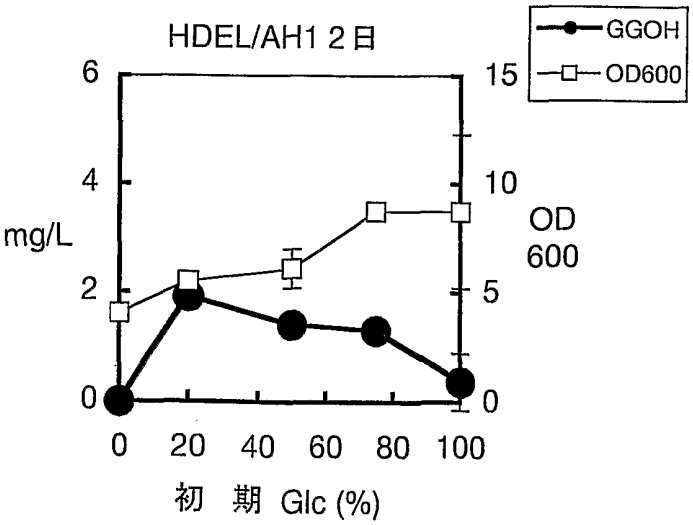
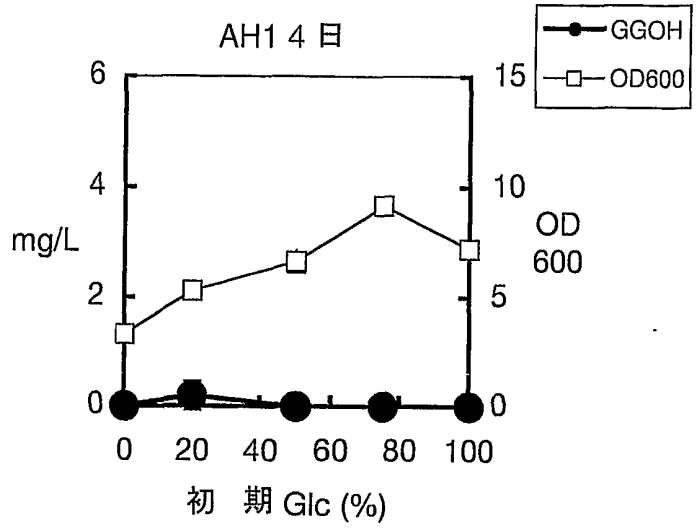
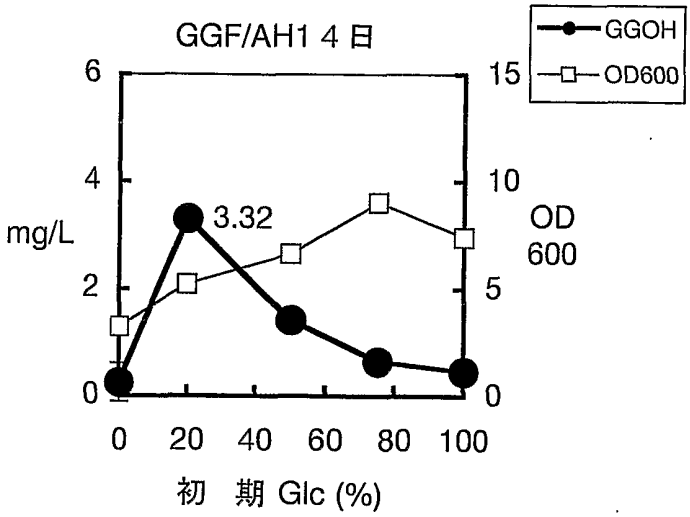

HDEL/AH1 2日
GGOH
OD600
6
4
2
0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３２Ｂ


AH1 4 日
GGOH
OD600
6
4
2
0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)


GGF/AH1 4 日
GGOH
OD600
6
4
2
0
mg/L
3.32
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

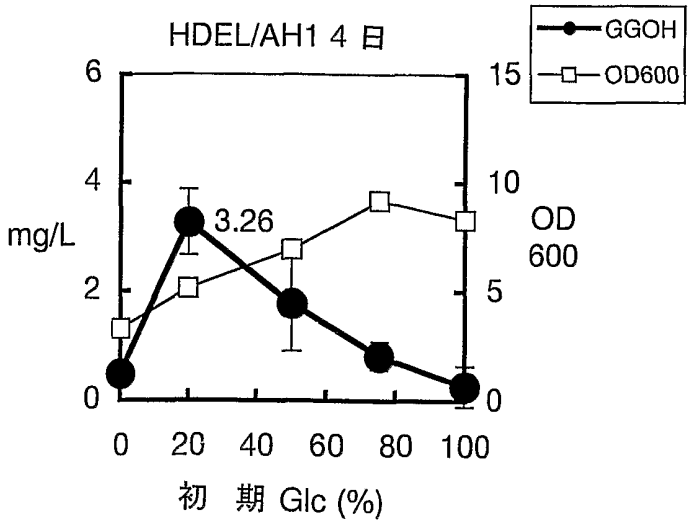

HDEL/AH1 4 日
GGOH
OD600
6
4
2
0
mg/L
3.26
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３２Ｃ

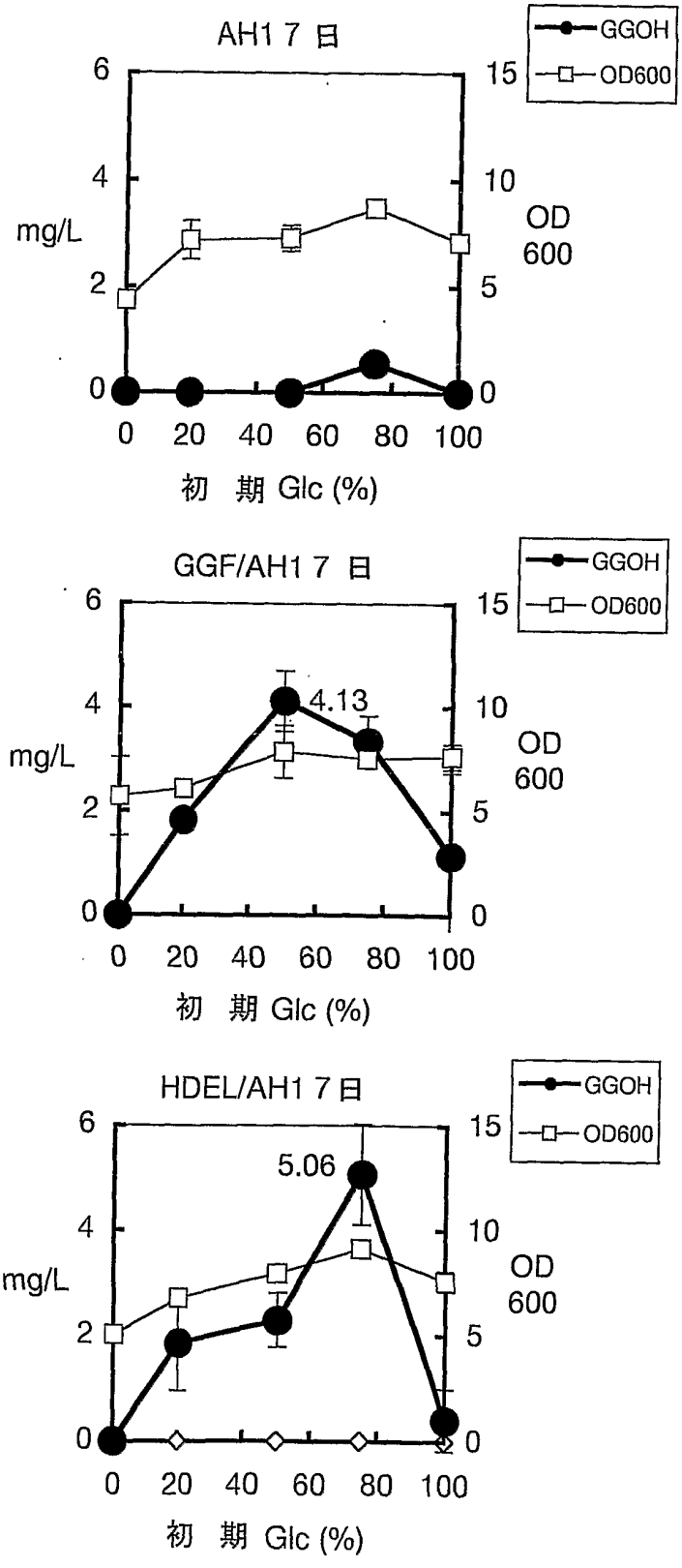
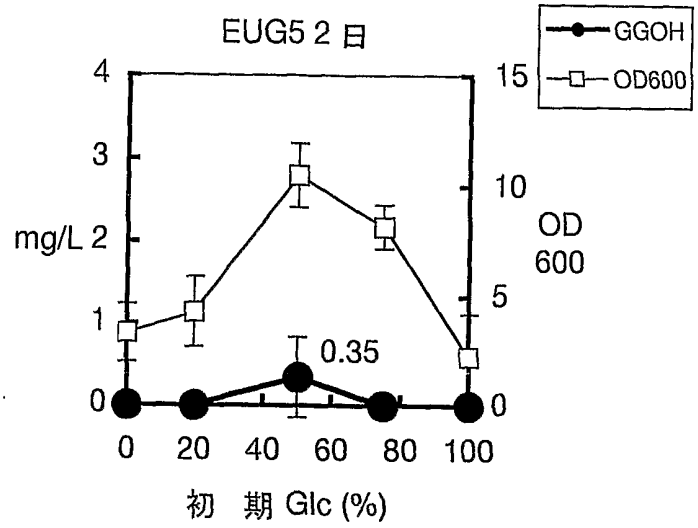
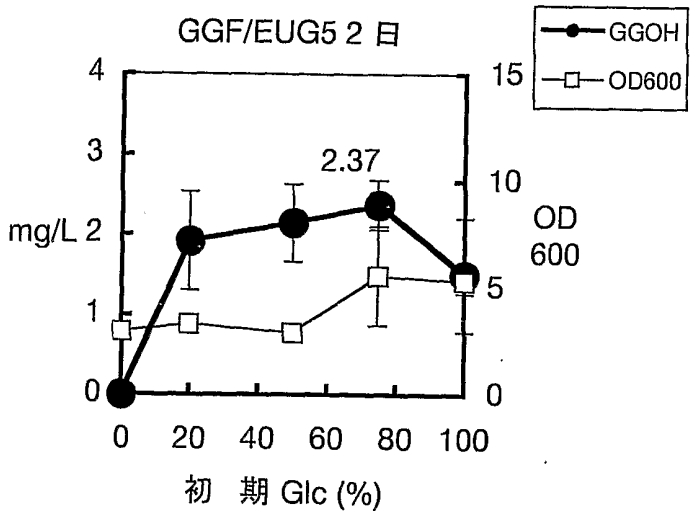

AH1 7 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/AH1 7 日
4.13
HDEL/AH1 7日
5.06

図３３Ａ


EUG5 2 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
0.35
初 期 Glc (%)


GGF/EUG5 2 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
2.37
初 期 Glc (%)

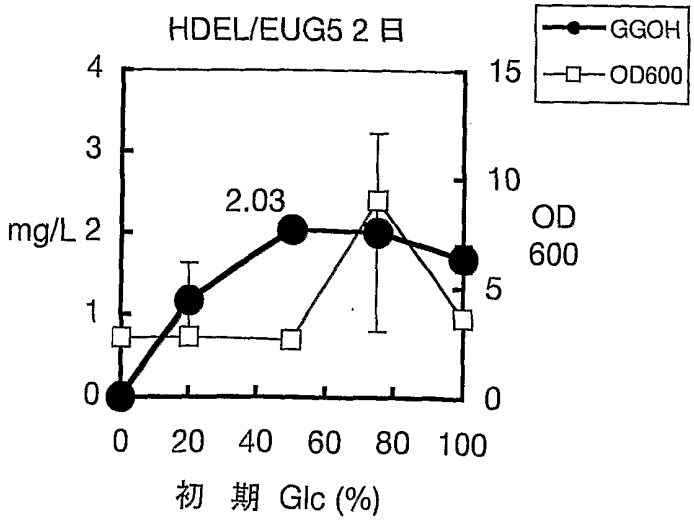

HDEL/EUG5 2 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
2.03
初 期 Glc (%)

図３３Ｂ

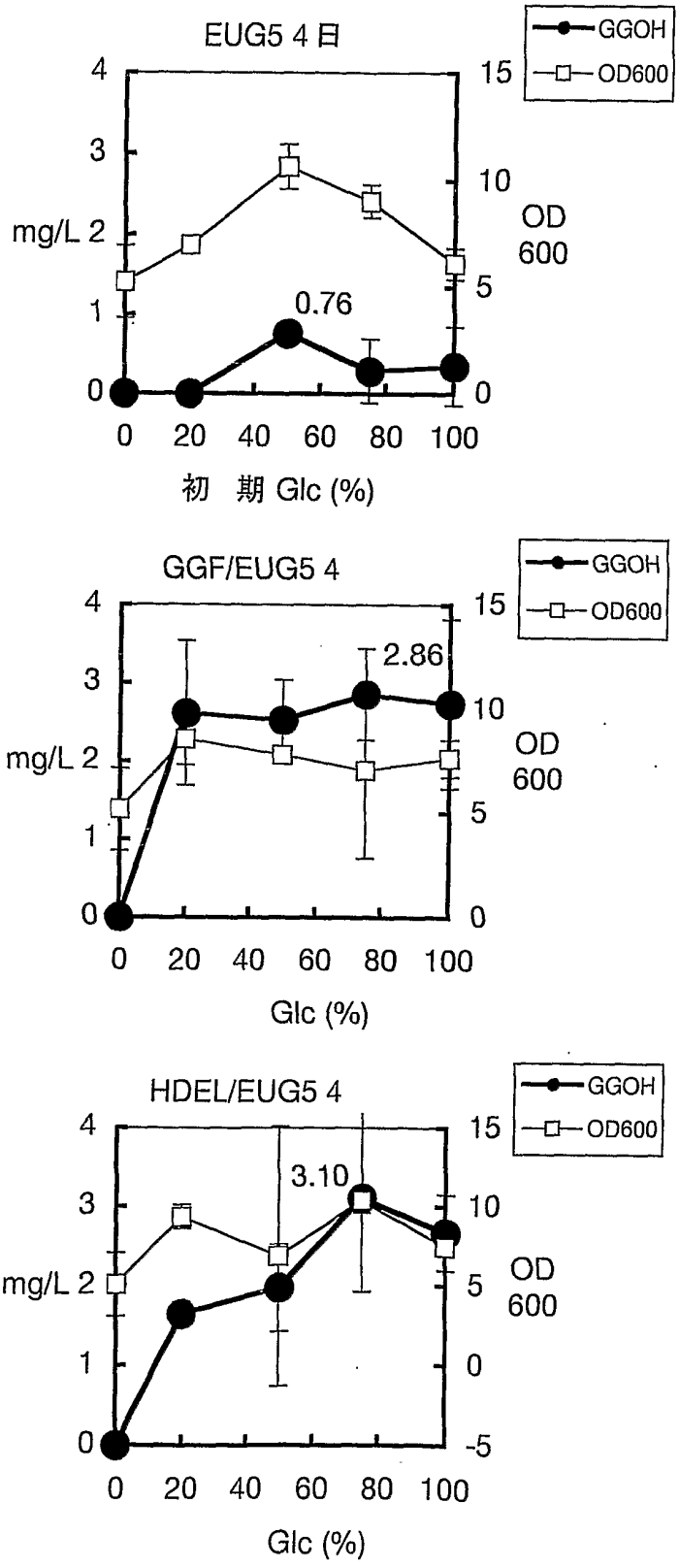
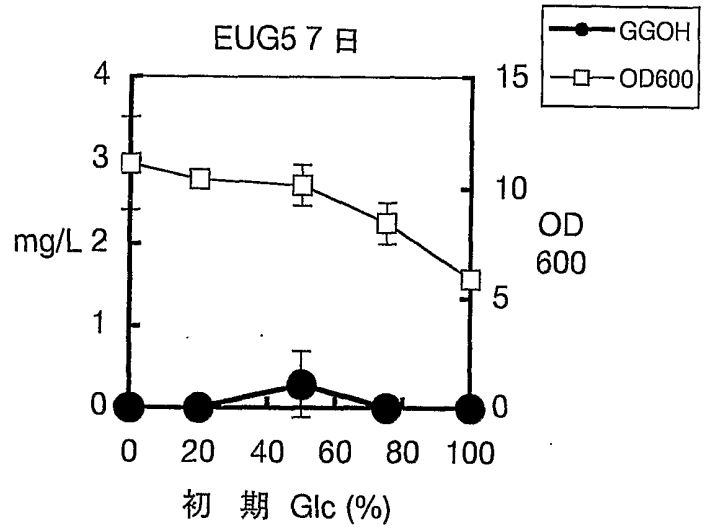
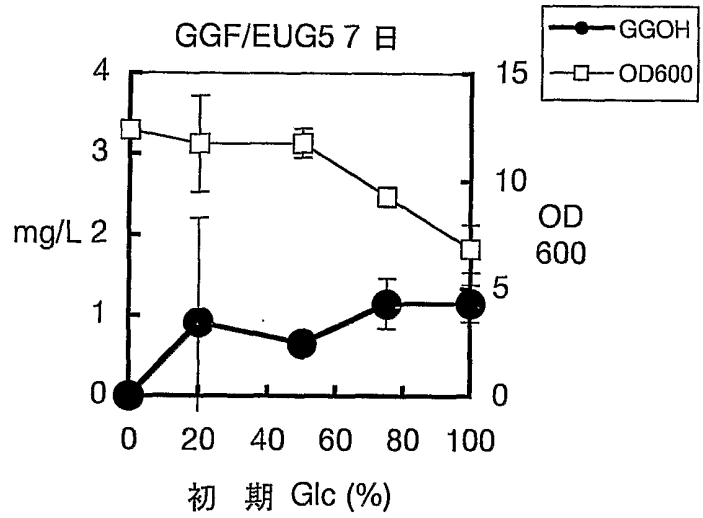

EUG5 4日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
0.76
初 期 Glc (%)
GGF/EUG5 4
2.86
Glc (%)
HDEL/EUG5 4
3.10
Glc (%)

図３３Ｃ


EUG5 7 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)


GGF/EUG5 7 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)

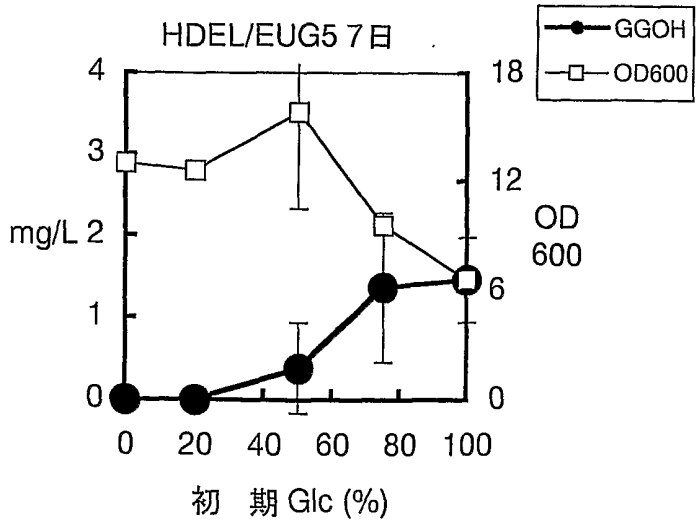
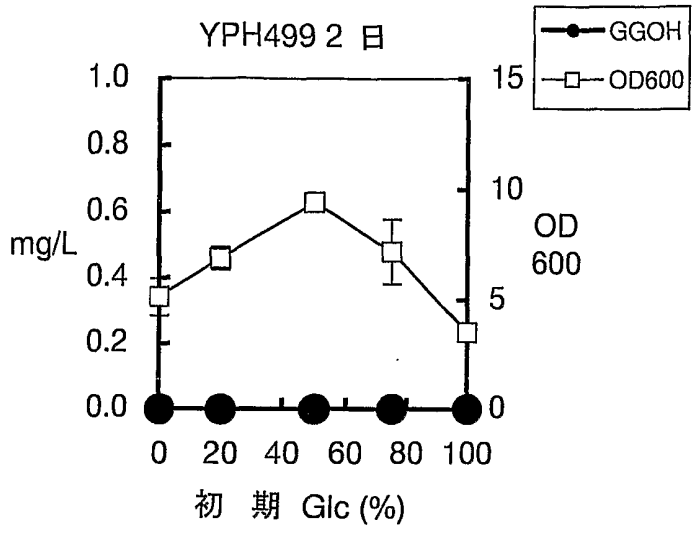
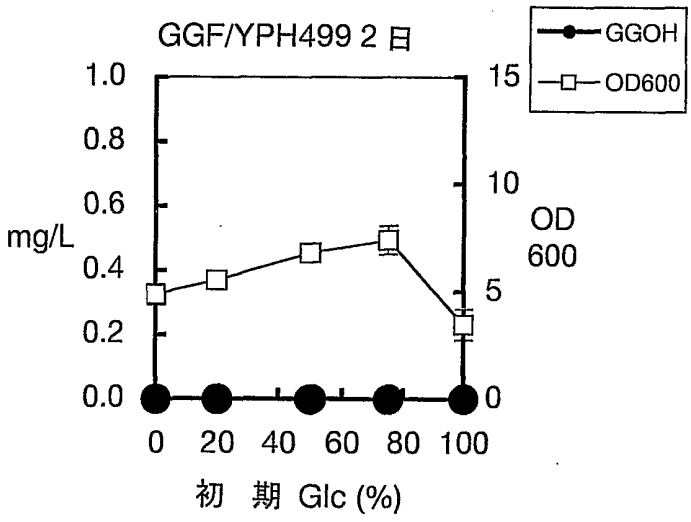

HDEL/EUG5 7日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)

図３４Ａ


YPH499 2 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)


GGF/YPH499 2 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

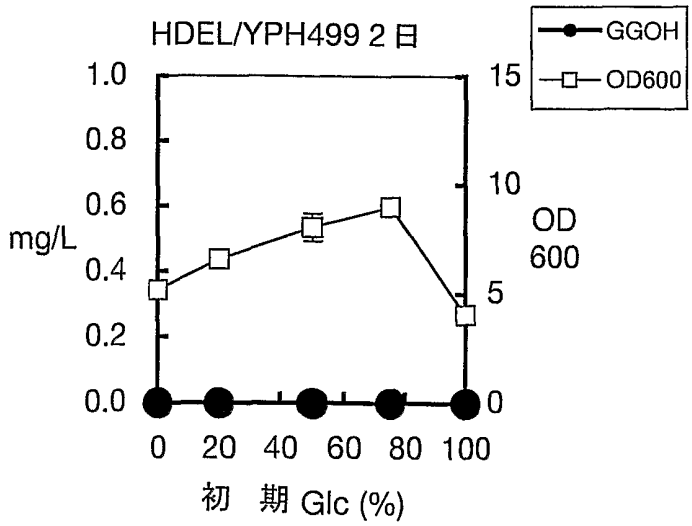
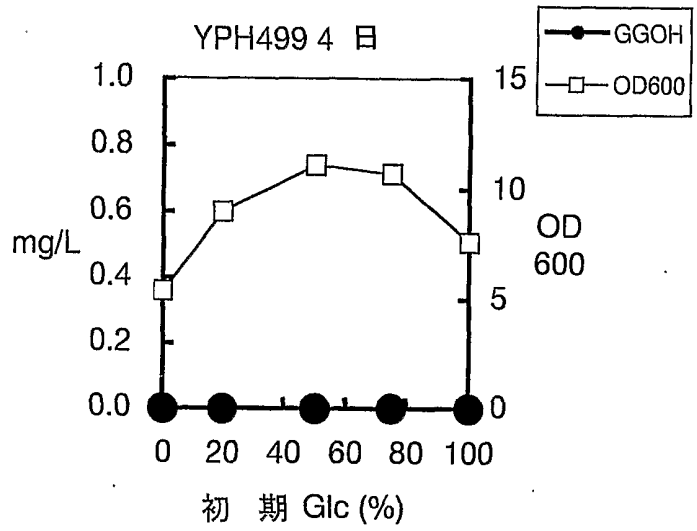
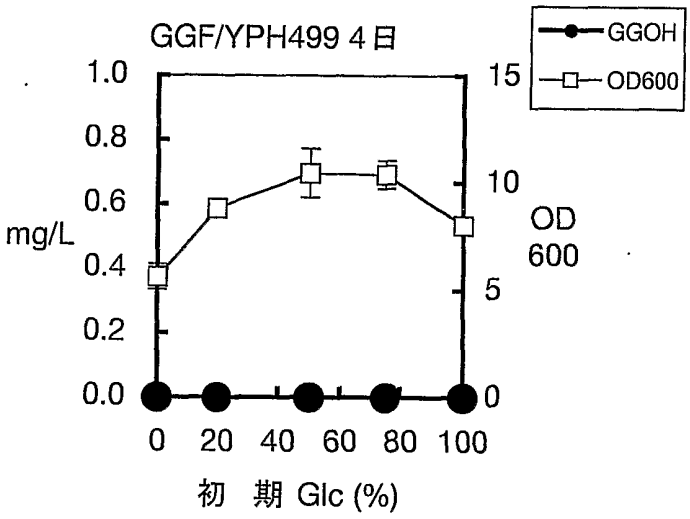

HDEL/YPH499 2 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３４Ｂ


YPH499 4 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)


GGF/YPH499 4日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

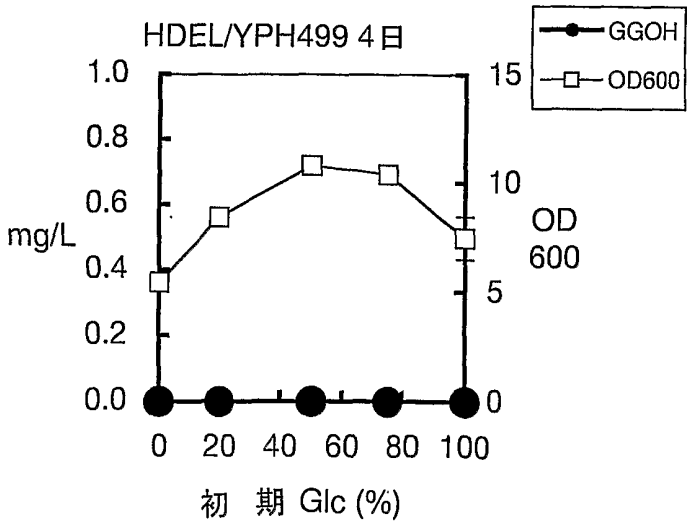

HDEL/YPH499 4日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３４Ｃ

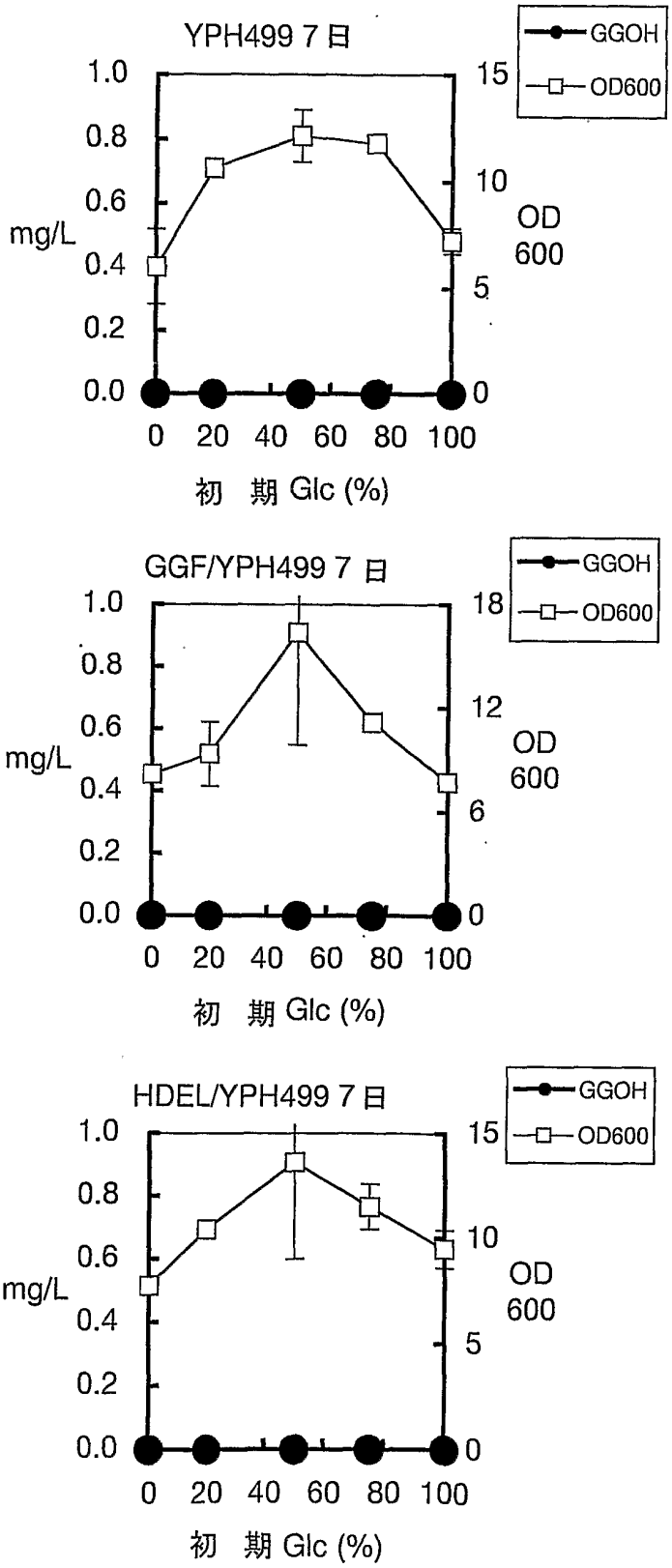

YPH499 7日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)
GGF/YPH499 7 日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
18
12
6
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)
HDEL/YPH499 7日
GGOH
OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mg/L
15
10
5
0
OD
600
0 20 40 60 80 100
初 期 Glc (%)

図３５Ａ

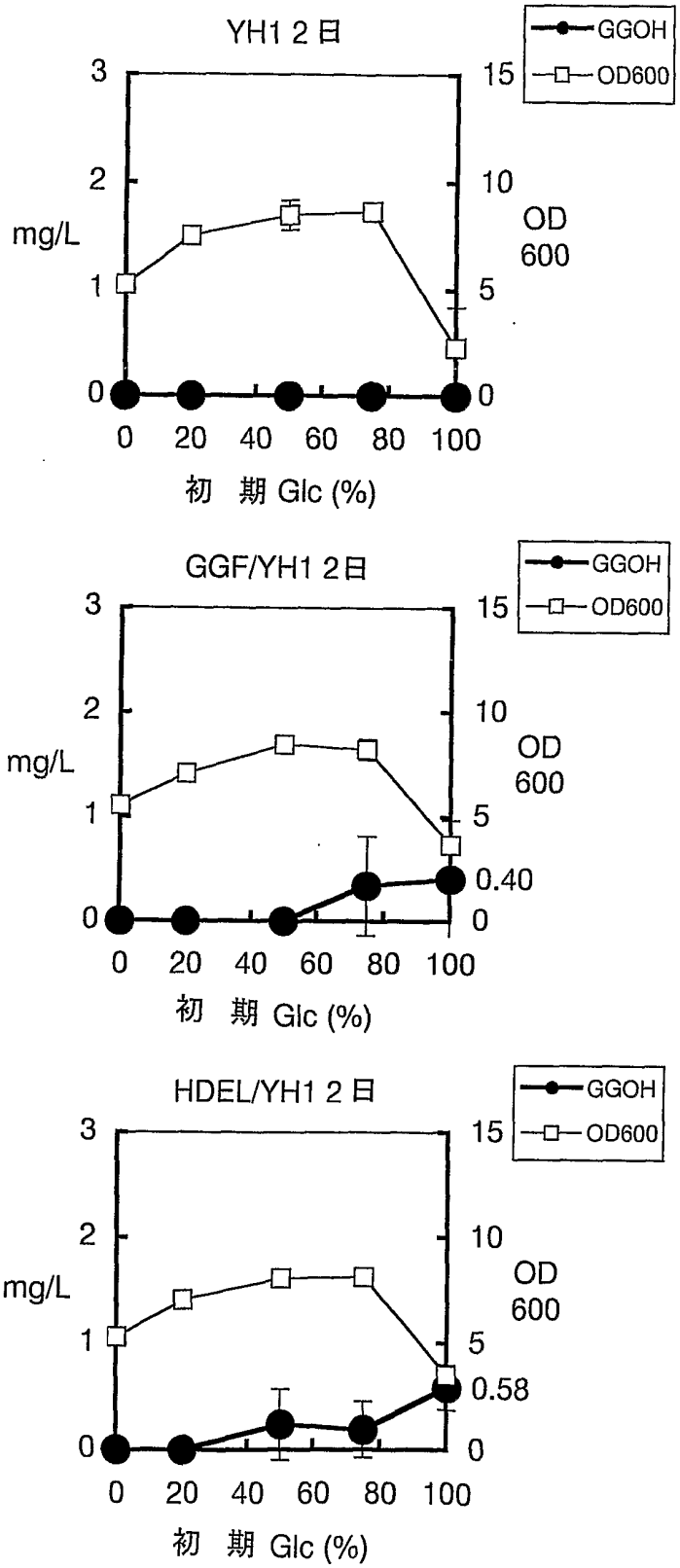

YH1 2日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/YH1 2日
0.40
HDEL/YH1 2日
0.58

図３５Ｂ

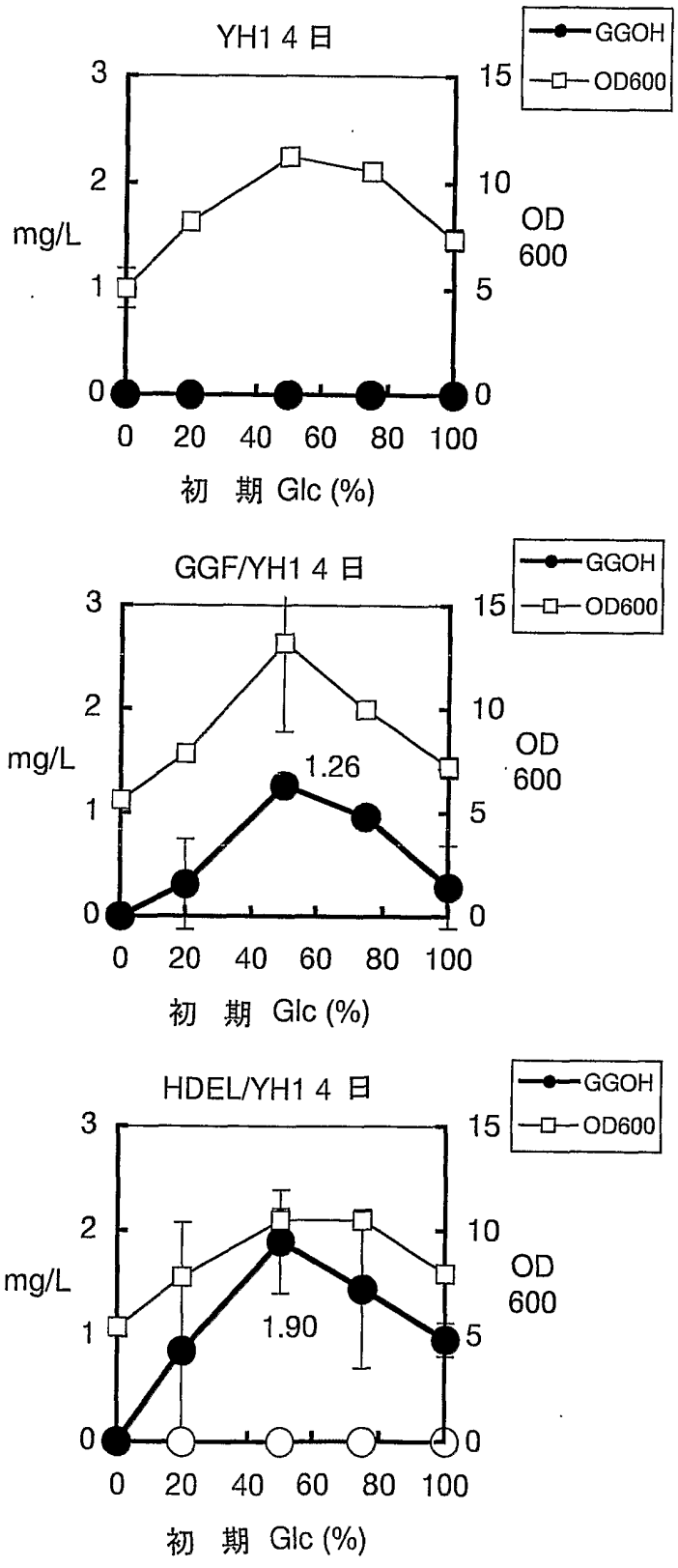

YH1 4 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/YH1 4 日
1.26
HDEL/YH1 4 日
1.90

図３５Ｃ

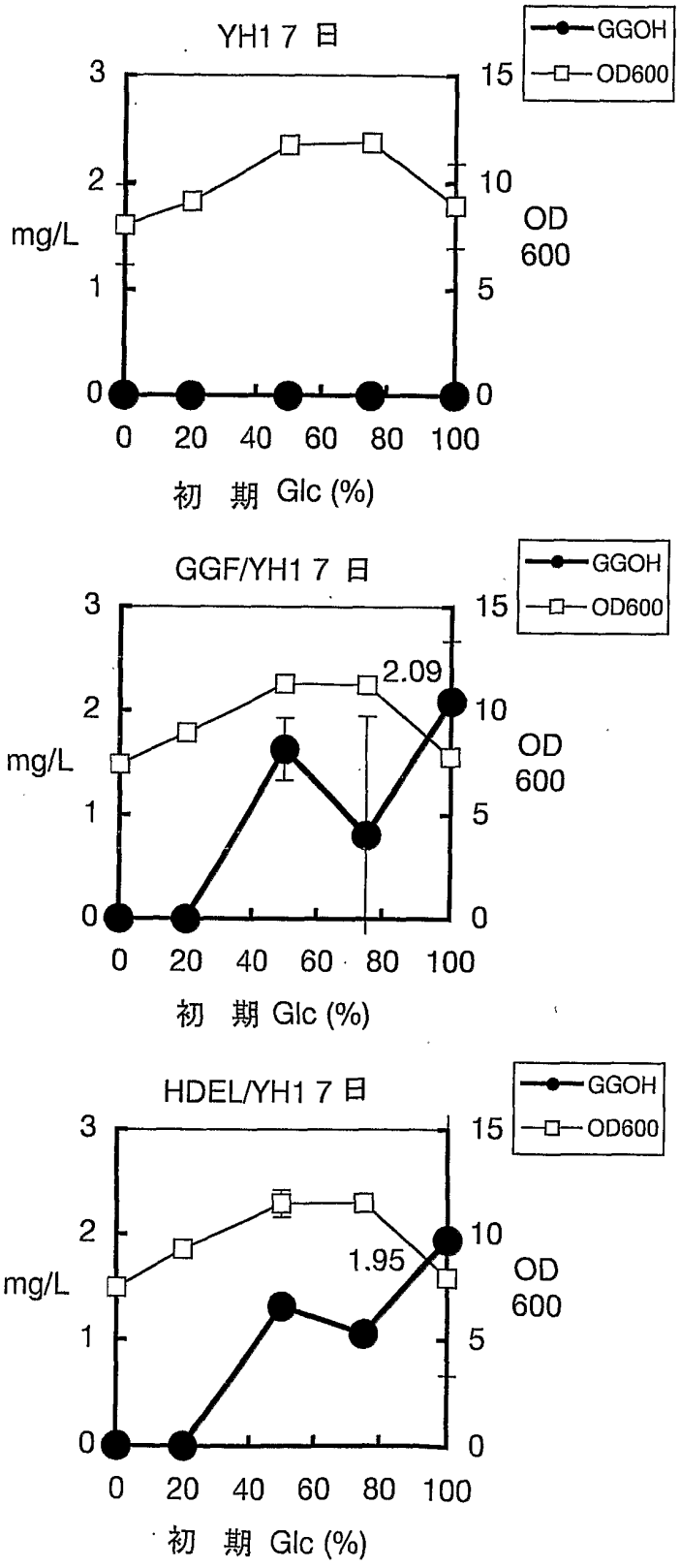

YH17 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/YH17 日
2.09
HDEL/YH17 日
1.95

図３６Ａ

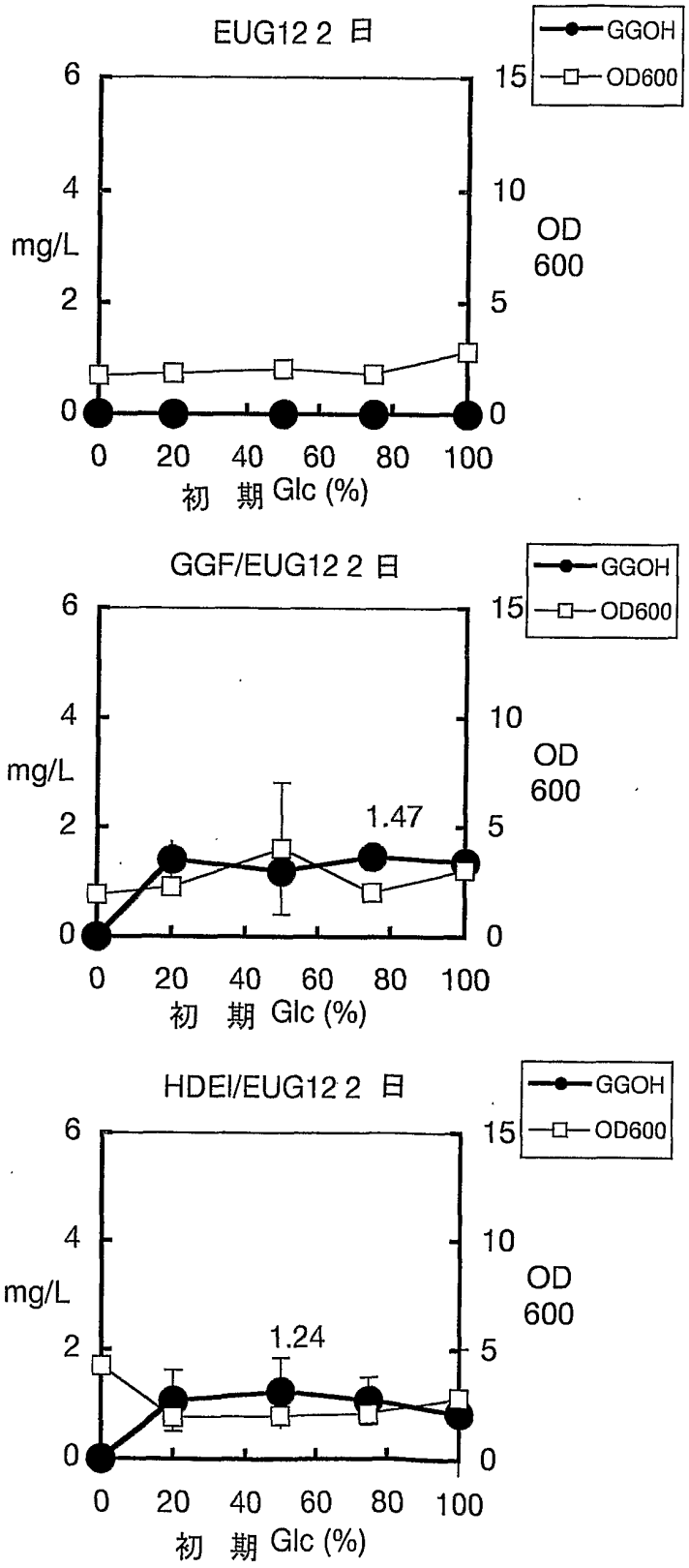

EUG12 2 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/EUG12 2 日
1.47
HDEI/EUG12 2 日
1.24

図３６Ｂ

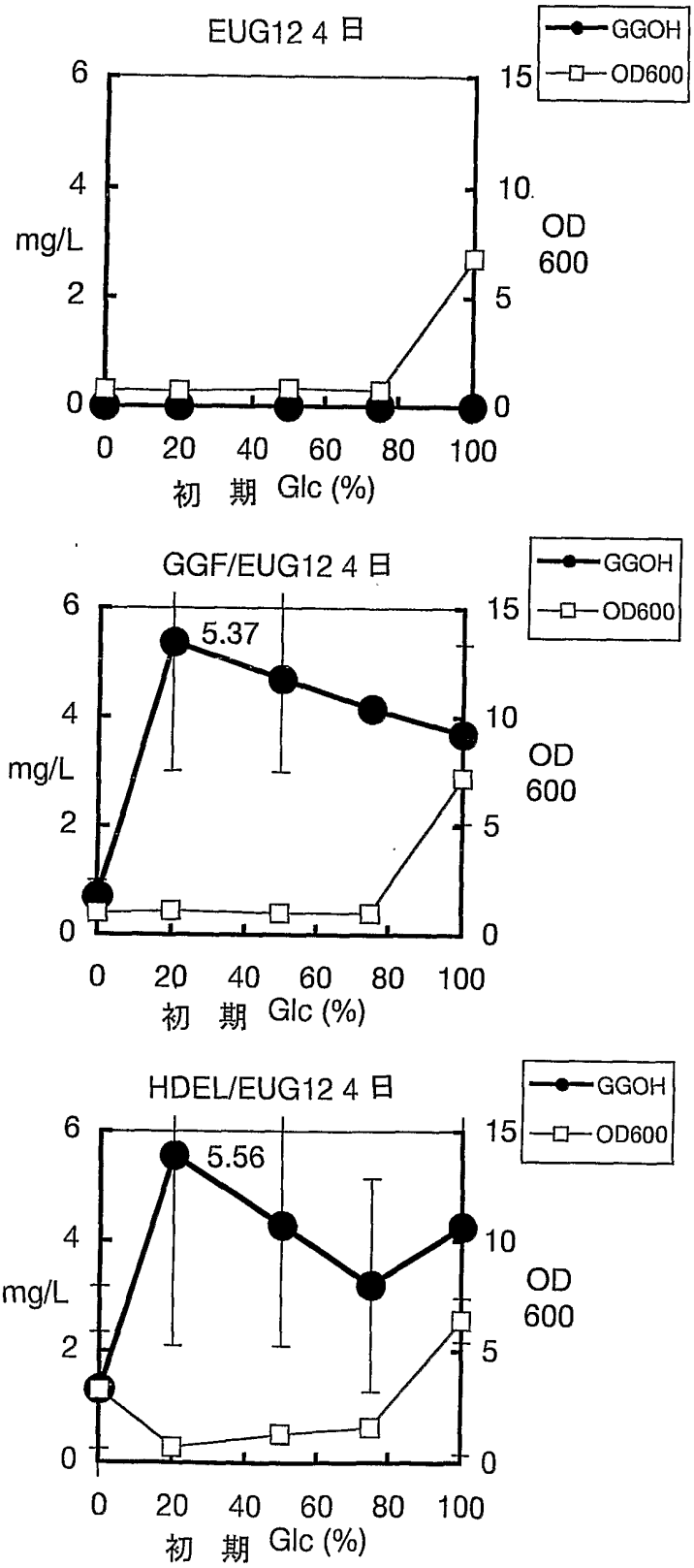

EUG12 4 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/EUG12 4 日
5.37
HDEL/EUG12 4 日
5.56

図３６Ｃ

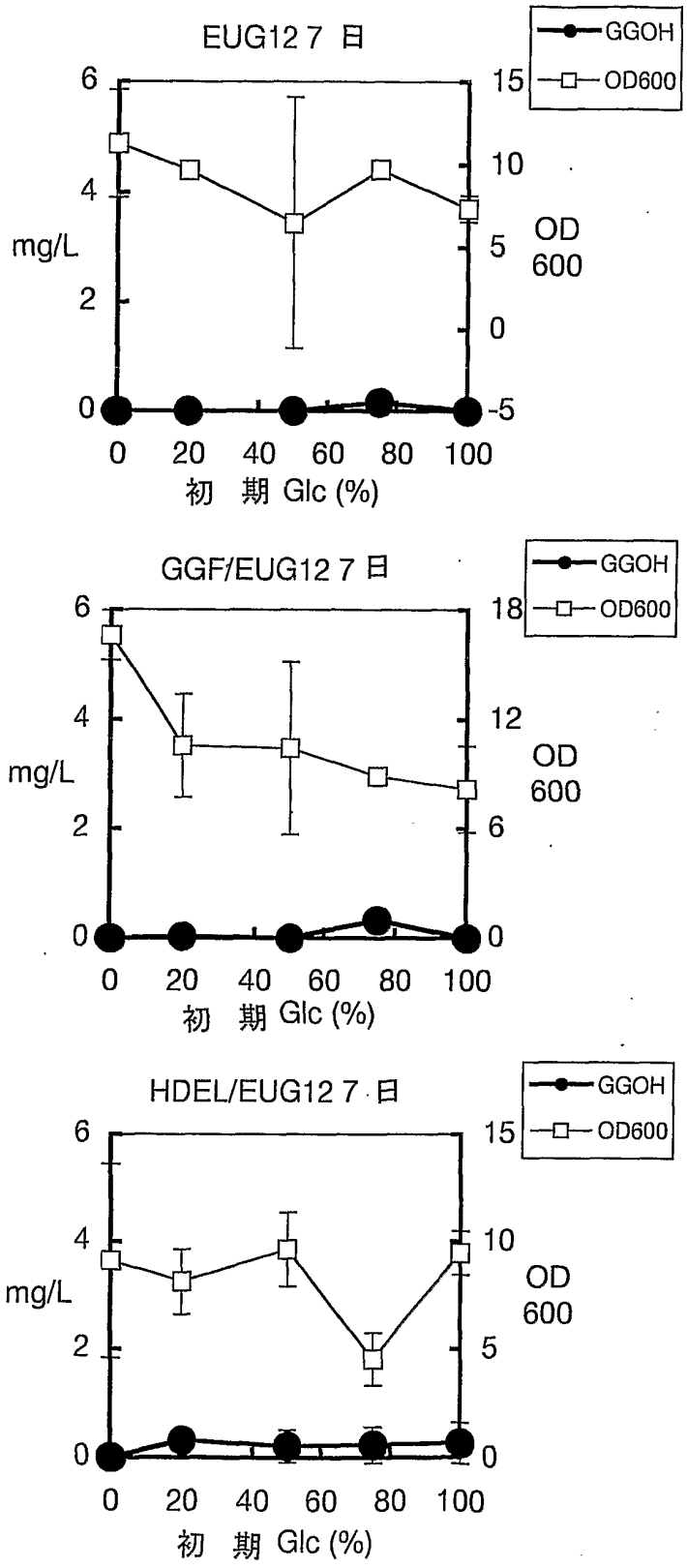

EUG12 7 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
GGF/EUG12 7 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)
HDEL/EUG12 7 日
GGOH
OD600
mg/L
OD 600
初 期 Glc (%)

図37

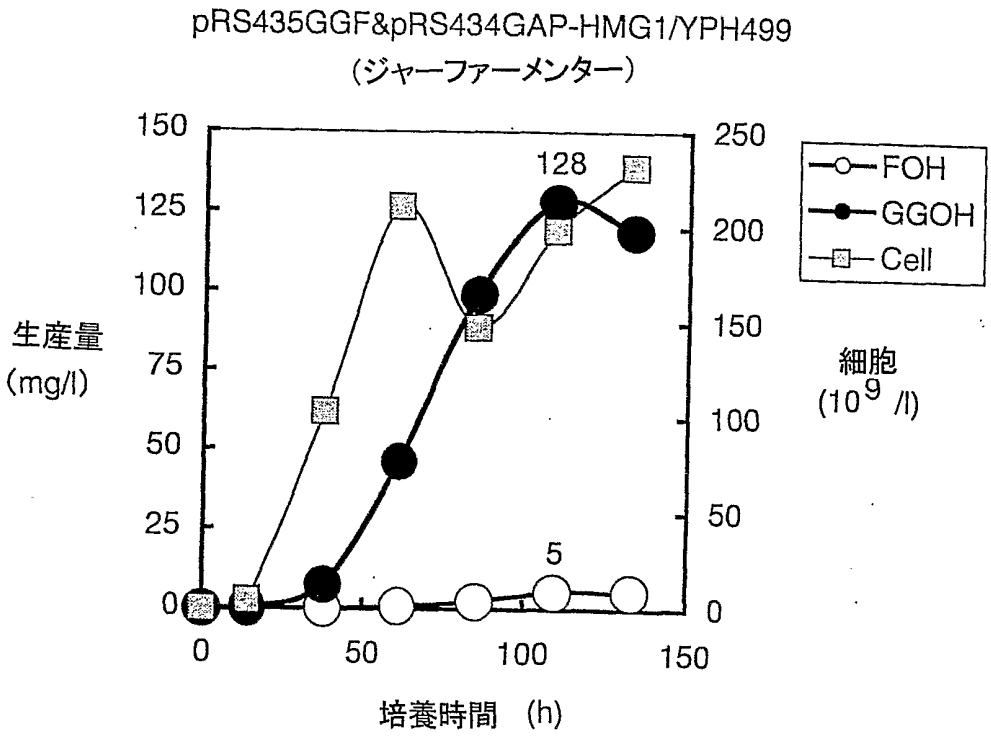

pRS435GGF&pRS434GAP-HMG1/YPH499
(ジャーファーメンター)
生産量
(mg/l)
細胞
(10^9 /l)
FOH
GGOH
Cell
128
5
150
125
100
75
50
25
0
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
培養時間 (h)

図38

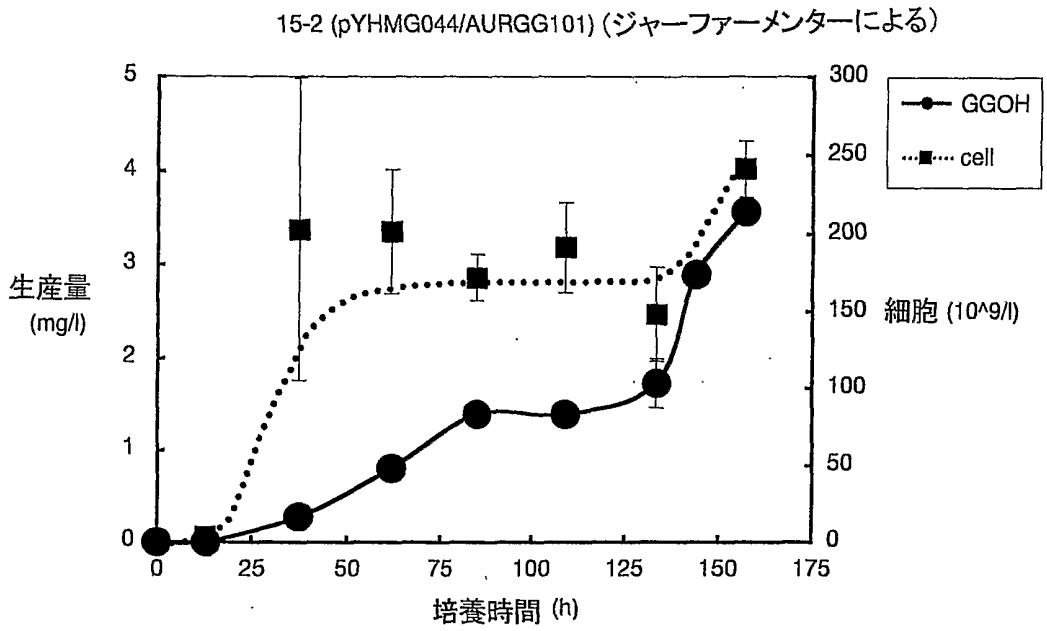

15-2 (pYHMG044/AURGG101) (ジャーファーメンターによる)
生産量
(mg/l)
細胞 (10^9/l)
培養時間 (h)
GGOH
cell
0
1
2
3
4
5
0
50
100
150
200
250
300
0
25
50
75
100
125
150
175

図39

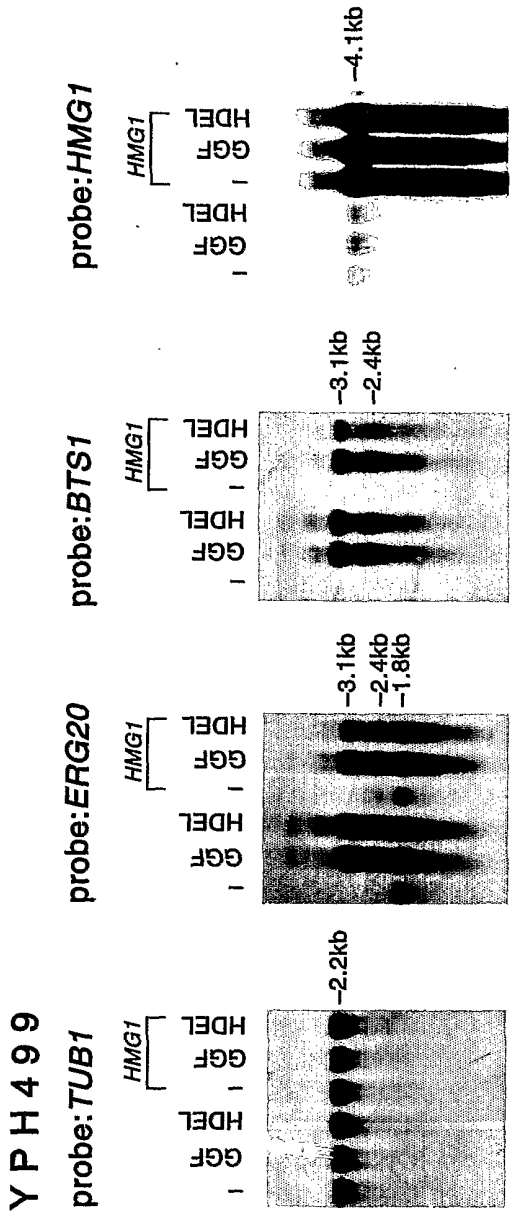

YPH499
probe:TUB1
probe:ERG20
probe:BTS1
probe:HMG1
HMG1
HDEL
GGF
−
−2.2kb
−3.1kb
−2.4kb
−1.8kb
−3.1kb
−2.4kb
−4.1kb

図40

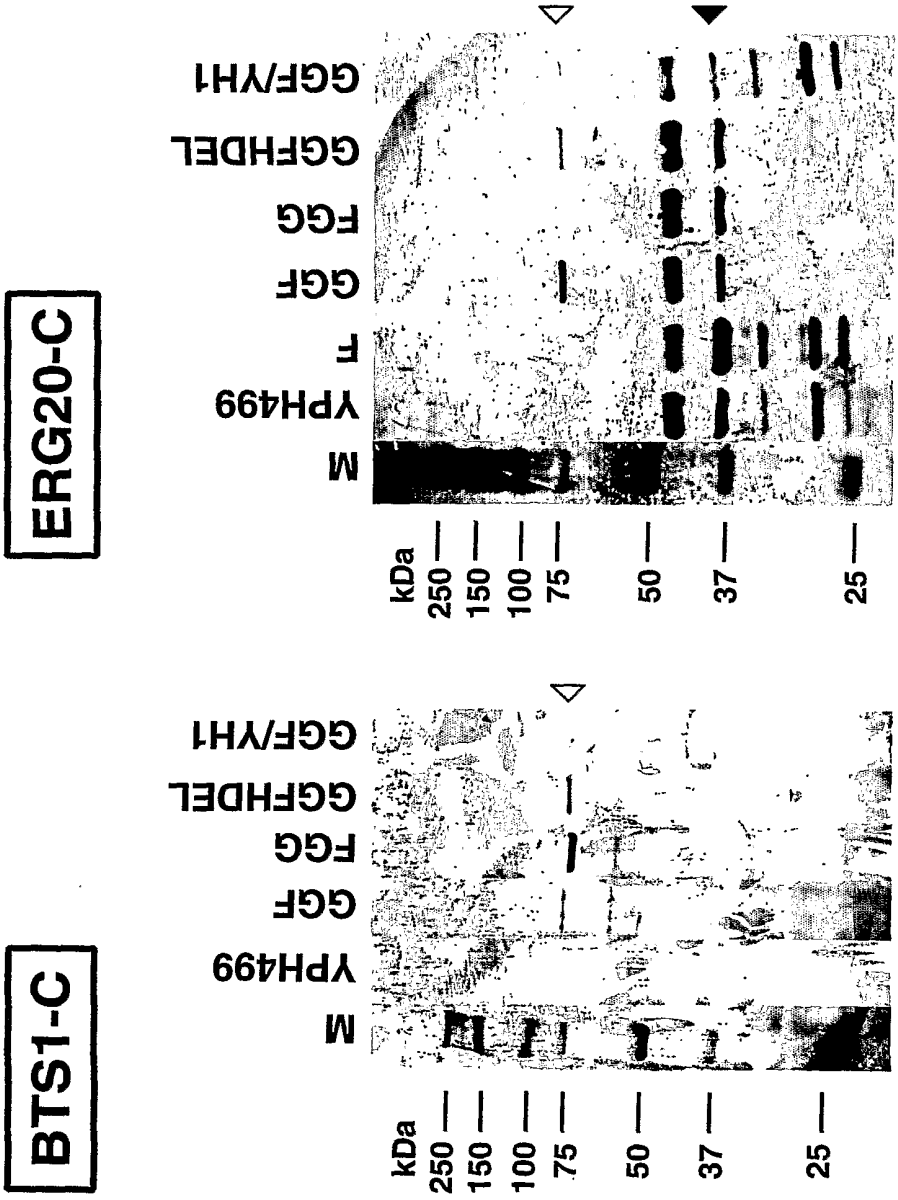

ERG20-C
M
YPH499
F
GGF
FGG
GGFHDEL
GGF/YH1
kDa
250
150
100
75
50
37
25
BTS1-C
M
YPH499
GGF
FGG
GGFHDEL
GGF/YH1
kDa
250
150
100
75
50
37
25

図41A

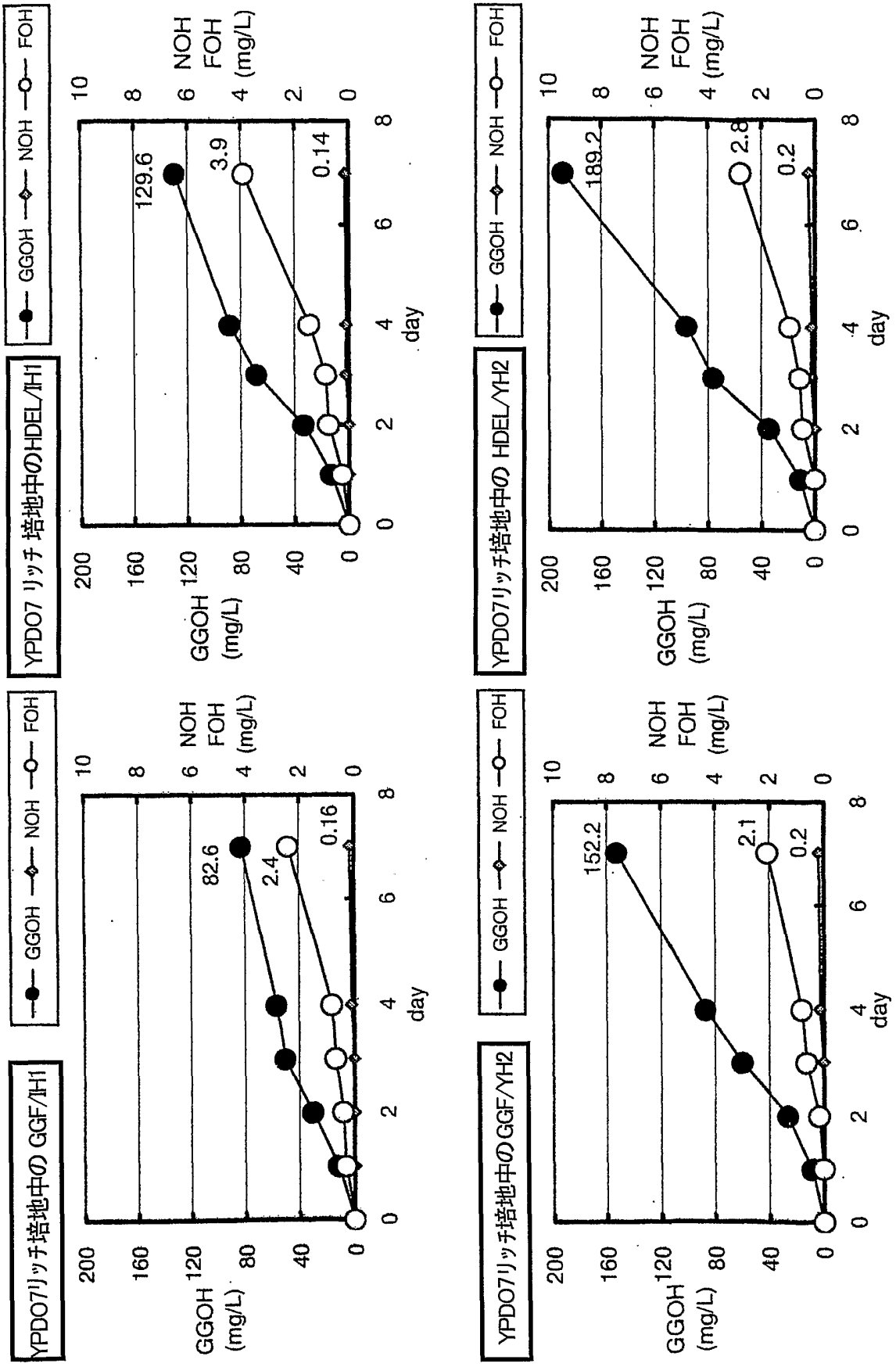

YPDO7リッチ培地中のGGF/1H1
GGOH
NOH
FOH
GGOH (mg/L)
NOH FOH (mg/L)
day
82.6
2.4
0.16
YPDO7 リッチ 培地中のHDEL/1H1
129.6
3.9
0.14
YPDO7リッチ培地中のGGF/YH2
152.2
2.1
0.2
YPDO7リッチ培地中の HDEL/YH2
189.2
2.8
0.2

図41B

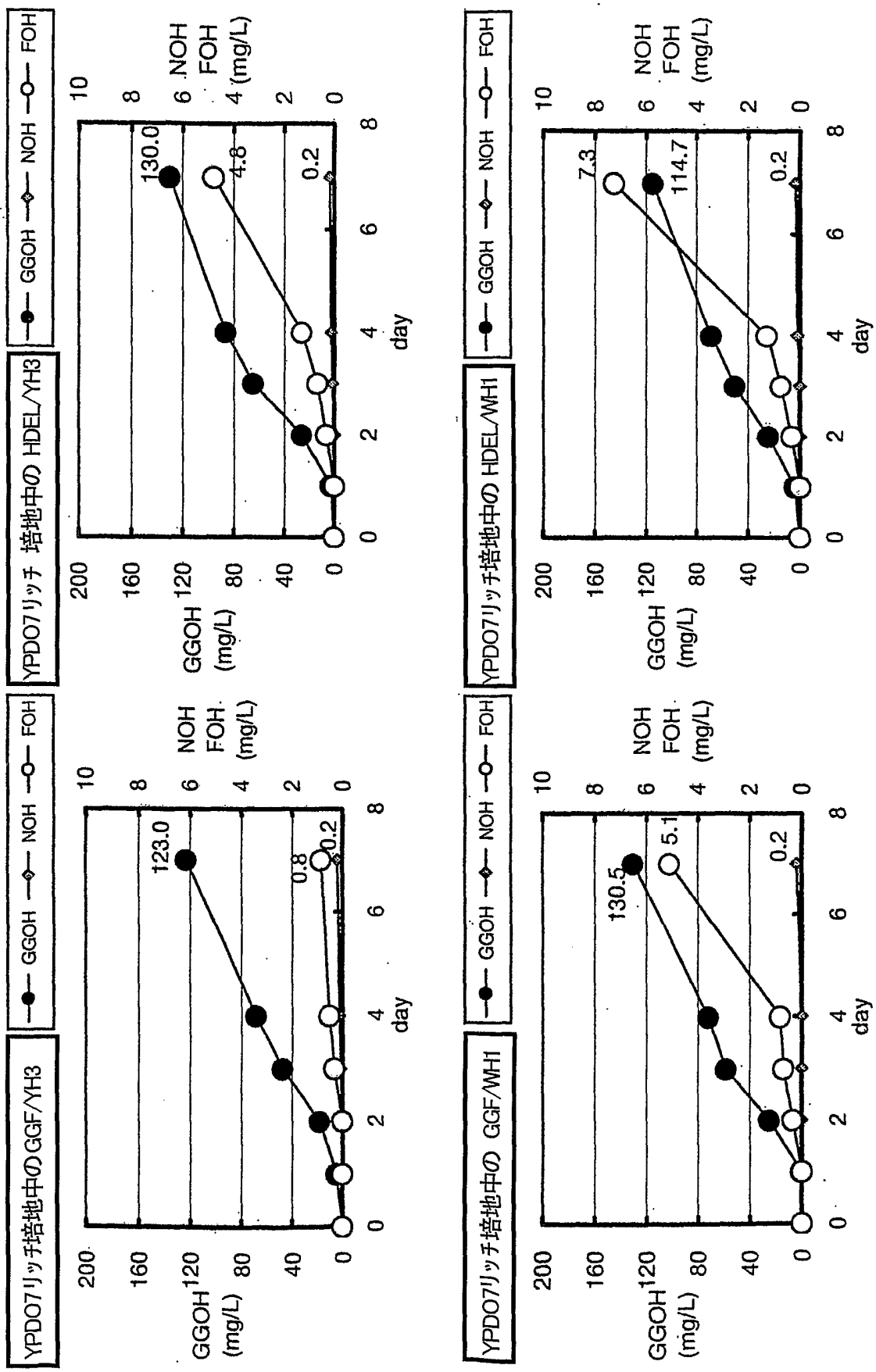

YPDO7リッチ培地中のGGF/YH3
GGOH
NOH
FOH
GGOH (mg/L)
NOH FOH (mg/L)
day
123.0
0.8
0.2
YPDO7リッチ 培地中のHDEL/YH3
130.0
4.8
0.2
YPDO7リッチ培地中のGGF/WH1
130.5
5.1
0.2
YPDO7リッチ培地中のHDEL/WH1
7.3
114.7
0.2

図41C

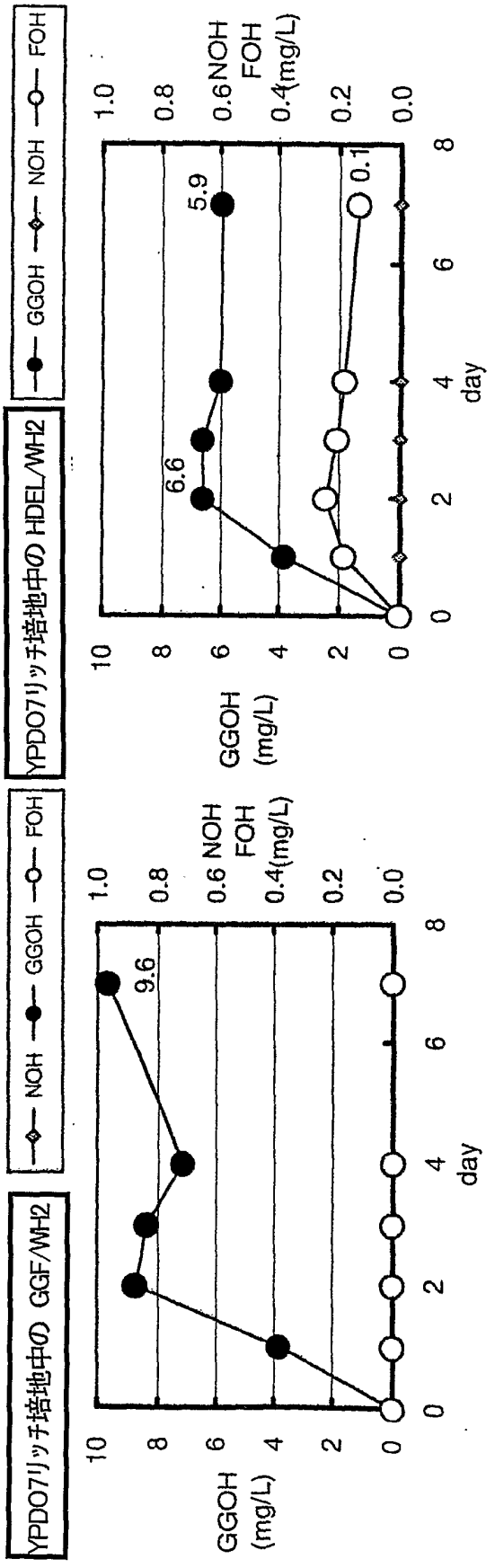
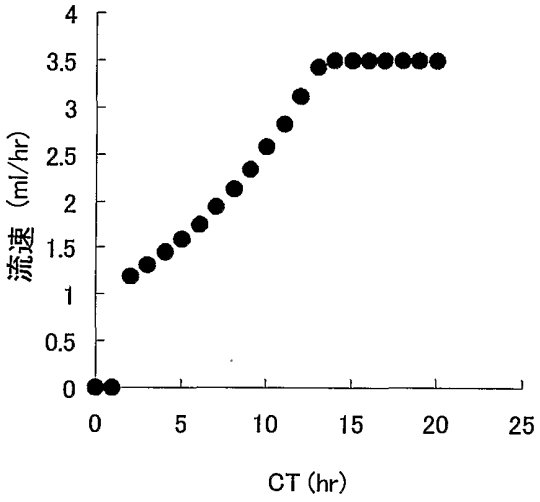

YPD07リッチ培地中の GGF/WH2
NOH
GGOH
FOH
GGOH (mg/L)
NOH FOH 0.4(mg/L)
day
9.6
YPD07リッチ培地中の HDEL/WH2
6.6
5.9
0.1

図４２



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA

<120> A method of producing prenylalcohol

<130> PH-1413-PCT

<150> JP2000-403067
<151> 2000-12-28

<160> 130

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1059
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1056)

<400> 1
atg gct tca gaa aaa gaa att agg aga gag aga ttc ttg aac gtt ttc 48
Met Ala Ser Glu Lys Glu Ile Arg Arg Glu Arg Phe Leu Asn Val Phe
1 5 10 15

cct aaa tta gta gag gaa ttg aac gca tcg ctt ttg gct tac ggt atg 96
Pro Lys Leu Val Glu Glu Leu Asn Ala Ser Leu Leu Ala Tyr Gly Met
20 25 30

cct aag gaa gca tgt gac tgg tat gcc cac tca ttg aac tac aac act 144
Pro Lys Glu Ala Cys Asp Trp Tyr Ala His Ser Leu Asn Tyr Asn Thr
35 40 45

cca ggc ggt aag cta aat aga ggt ttg tcc gtt gtg gac acg tat gct 192
Pro Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val Val Asp Thr Tyr Ala
50 55 60

att ctc tcc aac aag acc gtt gaa caa ttg ggg caa gaa gaa tac gaa 240
Ile Leu Ser Asn Lys Thr Val Glu Gln Leu Gly Gln Glu Glu Tyr Glu
65 70 75 80

aag gtt gcc att cta ggt tgg tgc att gag ttg ttg cag gct tac ttc 288
Lys Val Ala Ile Leu Gly Trp Cys Ile Glu Leu Leu Gln Ala Tyr Phe
85 90 95

ttg gtc gcc gat gat atg atg gac aag tcc att acc aga aga ggc caa 336
Leu Val Ala Asp Asp Met Met Asp Lys Ser Ile Thr Arg Arg Gly Gln
100 105 110

cca tgt tgg tac aag gtt cct gaa gtt ggg gaa att gcc atc aat gac 384
Pro Cys Trp Tyr Lys Val Pro Glu Val Gly Glu Ile Ala Ile Asn Asp
115 120 125

gca ttc atg tta gag gct gct atc tac aag ctt ttg aaa tct cac ttc 432

Ala Phe Met Leu Glu Ala Ala Ile Tyr Lys Leu Leu Lys Ser His Phe
130 135 140

aga aac gaa aaa tac tac ata gat atc acc gaa ttg ttc cat gag gtc 480
Arg Asn Glu Lys Tyr Tyr Ile Asp Ile Thr Glu Leu Phe His Glu Val
145 150 155 160

acc ttc caa acc gaa ttg ggc caa ttg atg gac tta atc act gca cct 528
Thr Phe Gln Thr Glu Leu Gly Gln Leu Met Asp Leu Ile Thr Ala Pro
165 170 175

gaa gac aaa gtc gac ttg agt aag ttc tcc cta aag aag cac tcc ttc 576
Glu Asp Lys Val Asp Leu Ser Lys Phe Ser Leu Lys Lys His Ser Phe
180 185 190

ata gtt act ttc aag act gct tac tat tct ttc tac ttg cct gtc gca 624
Ile Val Thr Phe Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu Pro Val Ala
195 200 205

ttg gcc atg tac gtt gcc ggt atc acg gat gaa aag gat ttg aaa caa 672
Leu Ala Met Tyr Val Ala Gly Ile Thr Asp Glu Lys Asp Leu Lys Gln
210 215 220

gcc aga gat gtc ttg att cca ttg ggt gaa tac ttc caa att caa gat 720
Ala Arg Asp Val Leu Ile Pro Leu Gly Glu Tyr Phe Gln Ile Gln Asp
225 230 235 240

gac tac tta gac tgc ttc ggt acc cca gaa cag atc ggt aag atc ggt 768
Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Gly Thr Pro Glu Gln Ile Gly Lys Ile Gly
245 250 255

aca gat atc caa gat aac aaa tgt tct tgg gta atc aac aag gca ttg 816
Thr Asp Ile Gln Asp Asn Lys Cys Ser Trp Val Ile Asn Lys Ala Leu
260 265 270

gaa ctt gct tcc gca gaa caa aga aag act tta gac gaa aat tac ggt 864
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Gln Arg Lys Thr Leu Asp Glu Asn Tyr Gly
275 280 285

aag aag gac tca gtc gca gaa gcc aaa tgc aaa aag att ttc aat gac 912
Lys Lys Asp Ser Val Ala Glu Ala Lys Cys Lys Lys Ile Phe Asn Asp
290 295 300

ttg aaa att gaa cag cta tac cac gaa tat gaa gag tct att gcc aag 960
Leu Lys Ile Glu Gln Leu Tyr His Glu Tyr Glu Glu Ser Ile Ala Lys
305 310 315 320

gat ttg aag gcc aaa att tct cag gtc gat gag tct cgt ggc ttc aaa 1008
Asp Leu Lys Ala Lys Ile Ser Gln Val Asp Glu Ser Arg Gly Phe Lys
325 330 335

gct gat gtc tta act gcg ttc ttg aac aaa gtt tac aag aga agc aaa 1056
Ala Asp Val Leu Thr Ala Phe Leu Asn Lys Val Tyr Lys Arg Ser Lys
340 345 350

tag 1059

<210> 2
<211> 352

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

```
Met Ala Ser Glu Lys Glu Ile Arg Arg Glu Arg Phe Leu Asn Val Phe
 1               5                  10                  15

Pro Lys Leu Val Glu Glu Leu Asn Ala Ser Leu Leu Ala Tyr Gly Met
            20                  25                  30

Pro Lys Glu Ala Cys Asp Trp Tyr Ala His Ser Leu Asn Tyr Asn Thr
        35                  40                  45

Pro Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val Val Asp Thr Tyr Ala
    50                  55                  60

Ile Leu Ser Asn Lys Thr Val Glu Gln Leu Gly Gln Glu Glu Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Lys Val Ala Ile Leu Gly Trp Cys Ile Glu Leu Leu Gln Ala Tyr Phe
                85                  90                  95

Leu Val Ala Asp Asp Met Met Asp Lys Ser Ile Thr Arg Arg Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Cys Trp Tyr Lys Val Pro Glu Val Gly Glu Ile Ala Ile Asn Asp
        115                 120                 125

Ala Phe Met Leu Glu Ala Ala Ile Tyr Lys Leu Leu Lys Ser His Phe
    130                 135                 140
```

Arg Asn Glu Lys Tyr Tyr Ile Asp Ile Thr Glu Leu Phe His Glu Val
145 150 155 160

Thr Phe Gln Thr Glu Leu Gly Gln Leu Met Asp Leu Ile Thr Ala Pro
165 170 175

Glu Asp Lys Val Asp Leu Ser Lys Phe Ser Leu Lys Lys His Ser Phe
180 185 190

Ile Val Thr Phe Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu Pro Val Ala
195 200 205

Leu Ala Met Tyr Val Ala Gly Ile Thr Asp Glu Lys Asp Leu Lys Gln
210 215 220

Ala Arg Asp Val Leu Ile Pro Leu Gly Glu Tyr Phe Gln Ile Gln Asp
225 230 235 240

Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Gly Thr Pro Glu Gln Ile Gly Lys Ile Gly
245 250 255

Thr Asp Ile Gln Asp Asn Lys Cys Ser Trp Val Ile Asn Lys Ala Leu
260 265 270

Glu Leu Ala Ser Ala Glu Gln Arg Lys Thr Leu Asp Glu Asn Tyr Gly
275 280 285

Lys Lys Asp Ser Val Ala Glu Ala Lys Cys Lys Lys Ile Phe Asn Asp
290 295 300

Leu Lys Ile Glu Gln Leu Tyr His Glu Tyr Glu Glu Ser Ile Ala Lys
305 310 315 320

Asp Leu Lys Ala Lys Ile Ser Gln Val Asp Glu Ser Arg Gly Phe Lys
325 330 335

Ala Asp Val Leu Thr Ala Phe Leu Asn Lys Val Tyr Lys Arg Ser Lys
340 345 350

<210> 3
<211> 900
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (897)

<400> 3
atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96
Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

gtc gaa acc atg cag tat ggc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga 144

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc ggc gtt agc aca aac 192
Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gag tgt atc cac gct tac tca 240
Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser
65 70 75 80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc 288
Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
85 90 95

ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc 336
Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc 384
Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa 432
Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
130 135 140

ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480
Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528
Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576
Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624
Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672
Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720
Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768
Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816
Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa taa 900
Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 4
<211> 299
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 4
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser
65 70 75 80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg

85 90 95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
130 135 140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu

245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 5
<211> 1008
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1005)

<400> 5
atg gag gcc aag ata gat gag ctg atc aat aat gat cct gtt tgg tcc 48
Met Glu Ala Lys Ile Asp Glu Leu Ile Asn Asn Asp Pro Val Trp Ser
1 5 10 15

agc caa aat gaa agc ttg att tca aaa cct tat aat cac atc ctt ttg 96
Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ile Ser Lys Pro Tyr Asn His Ile Leu Leu
20 25 30

aaa cct ggc aag aac ttt aga cta aat tta ata gtt caa att aac aga 144
Lys Pro Gly Lys Asn Phe Arg Leu Asn Leu Ile Val Gln Ile Asn Arg
35 40 45

gtt atg aat ttg ccc aaa gac cag ctg gcc ata gtt tcg caa att gtt 192
Val Met Asn Leu Pro Lys Asp Gln Leu Ala Ile Val Ser Gln Ile Val
50 55 60

gag ctc ttg cat aat tcc agc ctt tta atc gac gat ata gaa gat aat 240
Glu Leu Leu His Asn Ser Ser Leu Leu Ile Asp Asp Ile Glu Asp Asn
65 70 75 80

gct ccc ttg aga agg gga cag acc act tct cac tta atc ttc ggt gta 288
Ala Pro Leu Arg Arg Gly Gln Thr Thr Ser His Leu Ile Phe Gly Val
85 90 95

ccc tcc act ata aac acc gca aat tat atg tat ttc aga gcc atg caa 336
Pro Ser Thr Ile Asn Thr Ala Asn Tyr Met Tyr Phe Arg Ala Met Gln
100 105 110

ctt gta tcg cag cta acc aca aaa gag cct ttg tat cat aat ttg att 384
Leu Val Ser Gln Leu Thr Thr Lys Glu Pro Leu Tyr His Asn Leu Ile
115 120 125

acg att ttc aac gaa gaa ttg atc aat cta cat agg gga caa ggc ttg 432
Thr Ile Phe Asn Glu Glu Leu Ile Asn Leu His Arg Gly Gln Gly Leu
130 135 140

gat ata tac tgg aga gac ttt ctg cct gaa atc ata cct act cag gag 480
Asp Ile Tyr Trp Arg Asp Phe Leu Pro Glu Ile Ile Pro Thr Gln Glu

145 150 155 160

atg tat ttg aat atg gtt atg aat aaa aca ggc ggc ctt ttc aga tta 528
Met Tyr Leu Asn Met Val Met Asn Lys Thr Gly Gly Leu Phe Arg Leu
165 170 175

acg ttg aga ctc atg gaa gcg ctg tct cct tcc tca cac cac ggc cat 576
Thr Leu Arg Leu Met Glu Ala Leu Ser Pro Ser Ser His His Gly His
180 185 190

tcg ttg gtt cct ttc ata aat ctt ctg ggt att att tat cag att aga 624
Ser Leu Val Pro Phe Ile Asn Leu Leu Gly Ile Ile Tyr Gln Ile Arg
195 200 205

gat gat tac ttg aat ttg aaa gat ttc caa atg tcc agc gaa aaa ggc 672
Asp Asp Tyr Leu Asn Leu Lys Asp Phe Gln Met Ser Ser Glu Lys Gly
210 215 220

ttt gct gag gac att aca gag ggg aag tta tct ttt ccc atc gtc cac 720
Phe Ala Glu Asp Ile Thr Glu Gly Lys Leu Ser Phe Pro Ile Val His
225 230 235 240

gcc ctt aac ttc act aaa acg aaa ggt caa act gag caa cac aat gaa 768
Ala Leu Asn Phe Thr Lys Thr Lys Gly Gln Thr Glu Gln His Asn Glu
245 250 255

att cta aga att ctc ctg ttg agg aca agt gat aaa gat ata aaa cta 816
Ile Leu Arg Ile Leu Leu Leu Arg Thr Ser Asp Lys Asp Ile Lys Leu
260 265 270

aag ctg att caa ata ctg gaa ttc gac acc aat tca ttg gcc tac acc 864
Lys Leu Ile Gln Ile Leu Glu Phe Asp Thr Asn Ser Leu Ala Tyr Thr
275 280 285

aaa aat ttt att aat caa tta gtg aat atg ata aaa aat gat aat gaa 912
Lys Asn Phe Ile Asn Gln Leu Val Asn Met Ile Lys Asn Asp Asn Glu
290 295 300

aat aag tat tta cct gat ttg gct tcg cat tcc gac acc gcc acc aat 960
Asn Lys Tyr Leu Pro Asp Leu Ala Ser His Ser Asp Thr Ala Thr Asn
305 310 315 320

tta cat gac gaa ttg tta tat ata ata gac cac tta tcc gaa ttg tga 1008
Leu His Asp Glu Leu Leu Tyr Ile Ile Asp His Leu Ser Glu Leu
325 330 335

<210> 6
<211> 335
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 6
Met Glu Ala Lys Ile Asp Glu Leu Ile Asn Asn Asp Pro Val Trp Ser
1 5 10 15

Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ile Ser Lys Pro Tyr Asn His Ile Leu Leu
20 25 30

Lys Pro Gly Lys Asn Phe Arg Leu Asn Leu Ile Val Gln Ile Asn Arg

35 40 45

Val Met Asn Leu Pro Lys Asp Gln Leu Ala Ile Val Ser Gln Ile Val
50 55 60

Glu Leu Leu His Asn Ser Ser Leu Leu Ile Asp Asp Ile Glu Asp Asn
65 70 75 80

Ala Pro Leu Arg Arg Gly Gln Thr Thr Ser His Leu Ile Phe Gly Val
85 90 95

Pro Ser Thr Ile Asn Thr Ala Asn Tyr Met Tyr Phe Arg Ala Met Gln
100 105 110

Leu Val Ser Gln Leu Thr Thr Lys Glu Pro Leu Tyr His Asn Leu Ile
115 120 125

Thr Ile Phe Asn Glu Glu Leu Ile Asn Leu His Arg Gly Gln Gly Leu
130 135 140

Asp Ile Tyr Trp Arg Asp Phe Leu Pro Glu Ile Ile Pro Thr Gln Glu
145 150 155 160

Met Tyr Leu Asn Met Val Met Asn Lys Thr Gly Gly Leu Phe Arg Leu
165 170 175

Thr Leu Arg Leu Met Glu Ala Leu Ser Pro Ser Ser His His Gly His
180 185 190

Ser Leu Val Pro Phe Ile Asn Leu Leu Gly Ile Ile Tyr Gln Ile Arg

195 200 205

Asp Asp Tyr Leu Asn Leu Lys Asp Phe Gln Met Ser Ser Glu Lys Gly
210 215 220

Phe Ala Glu Asp Ile Thr Glu Gly Lys Leu Ser Phe Pro Ile Val His
225 230 235 240

Ala Leu Asn Phe Thr Lys Thr Lys Gly Gln Thr Glu Gln His Asn Glu
245 250 255

Ile Leu Arg Ile Leu Leu Leu Arg Thr Ser Asp Lys Asp Ile Lys Leu
260 265 270

Lys Leu Ile Gln Ile Leu Glu Phe Asp Thr Asn Ser Leu Ala Tyr Thr
275 280 285

Lys Asn Phe Ile Asn Gln Leu Val Asn Met Ile Lys Asn Asp Asn Glu
290 295 300

Asn Lys Tyr Leu Pro Asp Leu Ala Ser His Ser Asp Thr Ala Thr Asn
305 310 315 320

Leu His Asp Glu Leu Leu Tyr Ile Ile Asp His Leu Ser Glu Leu
325 330 335

<210> 7

<211> 3165

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (3162)

<400> 7

```
atg ccg ccg cta ttc aag gga ctg aaa cag atg gca aag cca att gcc   48
Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
 1               5                  10                  15

tat gtt tca aga ttt tcg gcg aaa cga cca att cat ata ata ctt ttt   96
Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
            20                  25                  30

tct cta atc ata tcc gca ttc gct tat cta tcc gtc att cag tat tac   144
Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
        35                  40                  45

ttc aat ggt tgg caa cta gat tca aat agt gtt ttt gaa act gct cca   192
Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
    50                  55                  60

aat aaa gac tcc aac act cta ttt caa gaa tgt tcc cat tac tac aga   240
Asn Lys Asp Ser Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg
65                  70                  75                  80

gat tcc tct cta gat ggt tgg gta tca atc acc gcg cat gaa gct agt   288
Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser
                85                  90                  95
```

gag tta cca gcc cca cac cat tac tat cta tta aac ctg aac ttc aat 336
Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn
100 105 110

agt cct aat gaa act gac tcc att cca gaa cta gct aac acg gtt ttt 384
Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe
115 120 125

gag aaa gat aat aca aaa tat att ctg caa gaa gat ctc agt gtt tcc 432
Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser
130 135 140

aaa gaa att tct tct act gat gga acg aaa tgg agg tta aga agt gac 480
Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp
145 150 155 160

aga aaa agt ctt ttc gac gta aag acg tta gca tat tct ctc tac gat 528
Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp
165 170 175

gta ttt tca gaa aat gta acc caa gca gac ccg ttt gac gtc ctt att 576
Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile
180 185 190

atg gtt act gcc tac cta atg atg ttc tac acc ata ttc ggc ctc ttc 624
Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe
195 200 205

aat gac atg agg aag acc ggg tca aat ttt tgg ttg agc gcc tct aca 672

Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr
210 215 220

gtg gtc aat tct gca tca tca ctt ttc tta gca ttg tat gtc acc caa 720
Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln
225 230 235 240

tgt att cta ggc aaa gaa gtt tcc gca tta act ctt ttt gaa ggt ttg 768
Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu
245 250 255

cct ttc att gta gtt gtt gtt ggt ttc aag cac aaa atc aag att gcc 816
Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala
260 265 270

cag tat gcc ctg gag aaa ttt gaa aga gtc ggt tta tct aaa agg att 864
Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile
275 280 285

act acc gat gaa atc gtt ttt gaa tcc gtg agc gaa gag ggt ggt cgt 912
Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg
290 295 300

ttg att caa gac cat ttg ctt tgt att ttt gcc ttt atc gga tgc tct 960
Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser
305 310 315 320

atg tat gct cac caa ttg aag act ttg aca aac ttc tgc ata tta tca 1008
Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser
325 330 335

gca ttt atc cta att ttt gaa ttg att tta act cct aca ttt tat tct 1056
Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

gct atc tta gcg ctt aga ctg gaa atg aat gtt atc cac aga tct act 1104
Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr
355 360 365

att atc aag caa aca tta gaa gaa gac ggt gtt gtt cca tct aca gca 1152
Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala
370 375 380

aga atc att tct aaa gca gaa aag aaa tcc gta tct tct ttc tta aat 1200
Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn
385 390 395 400

ctc agt gtg gtt gtc att atc atg aaa ctc tct gtc ata ctg ttg ttt 1248
Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe
405 410 415

gtc ttc atc aac ttt tat aac ttt ggt gca aat tgg gtc aat gat gcc 1296
Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala
420 425 430

ttc aat tca ttg tac ttc gat aag gaa cgt gtt tct cta cca gat ttt 1344
Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe
435 440 445

att acc tcg aat gcc tct gaa aac ttt aaa gag caa gct att gtt agt 1392

```
Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser
    450                 455                 460

gtc acc cca tta tta tat tac aaa ccc att aag tcc tac caa cgc att   1440
Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile
465                 470                 475                 480

gag gat atg gtt ctt cta ttg ctt cgt aat gtc agt gtt gcc att cgt   1488
Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg
                485                 490                 495

gat agg ttc gtc agt aaa tta gtt ctt tcc gcc tta gta tgc agt gct   1536
Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala
            500                 505                 510

gtc atc aat gtg tat tta ttg aat gct gct aga att cat acc agt tat   1584
Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr
        515                 520                 525

act gca gac caa ttg gtg aaa act gaa gtc acc aag aag tct ttt act   1632
Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr
    530                 535                 540

gct cct gta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc   1680
Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val
545                 550                 555                 560

att tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca   1728
Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser
                565                 570                 575
```

tca gga cct tca tca tct agt gag gaa gat gat tcc cgc gat att gaa 1776
Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu
580 585 590

agc ttg gat aag aaa ata cgt cct tta gaa gaa tta gaa gca tta tta 1824
Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu
595 600 605

agt agt gga aat aca aaa caa ttg aag aac aaa gag gtc gct gcc ttg 1872
Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
610 615 620

gtt att cac ggt aag tta cct ttg tac gct ttg gag aaa aaa tta ggt 1920
Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
625 630 635 640

gat act acg aga gcg gtt gcg gta cgt agg aag gct ctt tca att ttg 1968
Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
645 650 655

gca gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat 2016
Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
660 665 670

gac tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac 2064
Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
675 680 685

atg cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca 2112

Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
690 695 700

tct tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct 2160
Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
705 710 715 720

gcc atg cgt ggc tgt aag gca atc aat gct ggc ggt ggt gca aca act 2208
Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
725 730 735

gtt tta act aag gat ggt atg aca aga ggc cca gta gtc cgt ttc cca 2256
Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
740 745 750

act ttg aaa aga tct ggt gcc tgt aag ata tgg tta gac tca gaa gag 2304
Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu
755 760 765

gga caa aac gca att aaa aaa gct ttt aac tct aca tca aga ttt gca 2352
Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
770 775 780

cgt ctg caa cat att caa act tgt cta gca gga gat tta ctc ttc atg 2400
Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
785 790 795 800

aga ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct 2448
Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
805 810 815

aaa ggt gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tgg 2496
Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
820 825 830

gaa gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa 2544
Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
835 840 845

aaa cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt gtc gtc 2592
Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
850 855 860

gca gaa gct act att cct ggt gat gtt gtc aga aaa gtg tta aaa agt 2640
Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865 870 875 880

gat gtt tcc gca ttg gtt gag ttg aac att gct aag aat ttg gtt gga 2688
Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
885 890 895

tct gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cat gca gct aat 2736
Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn
900 905 910

tta gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat 2784
Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn
915 920 925

gtt gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat 2832

Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
930 935 940

ttg aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt 2880
Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945 950 955 960

ggt ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt 2928
Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
965 970 975

gta aga ggc ccg cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta 2976
Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
980 985 990

gca aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt 3024
Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
995 1000 1005

gct gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac 3072
Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
1010 1015 1020

agg aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat 3120
Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
1025 1030 1035 1040

ata aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 3165
Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
1045 1050

<210> 8

<211> 1054

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 8

Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
1 5 10 15

Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
20 25 30

Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
35 40 45

Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
50 55 60

Asn Lys Asp Ser Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser
85 90 95

Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn
100 105 110

Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe

115 120 125

Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser
130 135 140

Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp
145 150 155 160

Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp
165 170 175

Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile
180 185 190

Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe
195 200 205

Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr
210 215 220

Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln
225 230 235 240

Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu
245 250 255

Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala
260 265 270

Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile

275 280 285

Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg
290 295 300

Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser
305 310 315 320

Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser
325 330 335

Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr
355 360 365

Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala
370 375 380

Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn
385 390 395 400

Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe
405 410 415

Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala
420 425 430

Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe

435 440 445

Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser
450 455 460

Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile
465 470 475 480

Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg
485 490 495

Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala
500 505 510

Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr
515 520 525

Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr
530 535 540

Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val
545 550 555 560

Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser
565 570 575

Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu
580 585 590

Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu

595 600 605

Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
610 615 620

Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
625 630 635 640

Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
645 650 655

Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
660 665 670

Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
675 680 685

Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
690 695 700

Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
705 710 715 720

Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
725 730 735

Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
740 745 750

Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu

755 760 765

Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
770 775 780

Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
785 790 795 800

Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
805 810 815

Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
820 825 830

Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
835 840 845

Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
850 855 860

Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865 870 875 880

Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
885 890 895

Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn
900 905 910

Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn

915 920 925

Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
930 935 940

Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945 950 955 960

Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
965 970 975

Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
980 985 990

Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
995 1000 1005

Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
1010 1015 1020

Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
1025 1030 1035 1040

Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
1045 1050

<210> 9
<211> 3165
<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3162)

<400> 9

```
atg ccg ccg cta ttc aag gga ctg aaa cag atg gca aag cca att gcc   48
Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
 1               5                  10                  15

tat gtt tca aga ttt tcg gcg aaa cga cca att cat ata ata ctt ttt   96
Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
            20                  25                  30

tct cta atc ata tcc gca ttc gct tat cta tcc gtc att cag tat tac   144
Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
        35                  40                  45

ttc aat ggt tgg caa cta gat tca aat agt gtt ttt gaa act gct cca   192
Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
    50                  55                  60

aat aaa gac ttc aac act cta ttt caa gaa tgt tcc cat tac tac aga   240
Asn Lys Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg
65                  70                  75                  80

gat tcc tct cta gat ggt tgg gta tca atc acc gcg cat gaa gct agt   288
Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser
                85                  90                  95
```

gag tta cca gcc cca cac cat tac tat cta tta aac ctg aac ttc aat 336
Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn
100 105 110

agt cct aat gaa act gac tcc att cca gaa cta gct aac acg gtt ttt 384
Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe
115 120 125

gag aaa gat aat aca aaa tat att ctg caa gaa gat ctc agc gtt tcc 432
Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser
130 135 140

aaa gaa att tct tct act gat gga acg aaa tgg agg tta aga agt gac 480
Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp
145 150 155 160

aga aaa agt ctt ttc gac gta aag acg tta gca tat tct ctc tac gat 528
Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp
165 170 175

gta ttt tca gaa aat gta acc caa gca gac ccg ttt gac gtc ctt att 576
Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile
180 185 190

atg gtt act gcc tac cta atg atg ttc tac acc ata ttc ggc ctc ttc 624
Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe
195 200 205

aat gac atg agg aag acc ggg tca aat ttt tgg ttg agc gcc tct aca 672

Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr
210 215 220

gtg gtc aat tct gca tca tca ctt ttc tta gca ttg tat gtc acc caa 720
Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln
225 230 235 240

tgt att cta ggc aaa gaa gtt tcc gca tta act ctt ttt gaa ggt ttg 768
Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu
245 250 255

cct ttc att gta gtt gtt gtt ggt ttc aag cac aaa atc aag att gcc 816
Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala
260 265 270

cag tat gcc ctg gag aaa ttt gaa aga gtc ggt tta tct aaa agg att 864
Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile
275 280 285

act acc gat gaa atc gtt ttt gaa tcc gtg agc gaa gag ggt ggt cgt 912
Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg
290 295 300

ttg att caa gac cat ttg ctt tgt att ttt gcc ttt atc gga tgc tct 960
Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser
305 310 315 320

atg tat gct cac caa ttg aag act ttg aca aac ttc tgc ata tta tca 1008
Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser
325 330 335

gca ttt atc cta att ttc gaa ttg att tta act cct aca ttt tat tct 1056
Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

gct atc tta gcg ctt aga ctg gaa atg aat gtt atc cac aga tct act 1104
Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr
355 360 365

att atc aag caa aca tta gaa gaa gac ggt gtt gtt cca tct aca gca 1152
Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala
370 375 380

aga atc att tct aag gca gaa aag aaa tcc gta tct tct ttc tta aat 1200
Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn
385 390 395 400

ctc agt gtg gtt gtc att atc atg aaa ctc tct gtc ata ctg ttg ttc 1248
Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe
405 410 415

gtc ttc atc aac ttt tat aac ttt ggt gca aat tgg gtc aat gat gcc 1296
Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala
420 425 430

ttc aat tca ttg tac ttc gat aag gaa cgt gtt tct cta cca gat ttt 1344
Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe
435 440 445

att acc tcg aat gcc tct gaa aac ttt aaa gag caa gct att gtt agt 1392

```
Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser
    450                 455                 460

gtc acc cca tta tta tat tac aaa ccc att aag tcc tac caa cgc att   1440
Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile
465                 470                 475                 480

gag gat atg gtt ctt cta ttg ctt cgt aat gtc agt gtt gcc att cgt   1488
Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg
                485                 490                 495

gat agg ttc gtc agt aaa tta gtt ctt tcc gcc tta gta tgc agt gct   1536
Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala
            500                 505                 510

gtc atc aat gtg tat tta tta aat gct gct aga att cat acc agt tat   1584
Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr
        515                 520                 525

act gca gac caa ttg gtg aag act gaa gtc acc aag aag tct ttt act   1632
Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr
    530                 535                 540

gct cct gta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc   1680
Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val
545                 550                 555                 560

att tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca   1728
Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser
                565                 570                 575
```

tca gga cct tca tca tct agt gag gaa gat gat tcc cgc gat att gaa 1776
Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu
580 585 590

agc ttg gat aag aaa ata cgt cct tta gaa gaa tta gaa gca tca tta 1824
Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Ser Leu
595 600 605

agt agt gga aat aca aaa caa ttg aag aac aaa gag gtc gct gcc ttg 1872
Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
610 615 620

gtt att cac ggt aag tta cct ttg tac gct ttg gag aaa aaa tta ggt 1920
Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
625 630 635 640

gat act acg aga gcg gtt gcg gta cgt agg aag gct ctt tca att ttg 1968
Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
645 650 655

gca gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat 2016
Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
660 665 670

gac tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac 2064
Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
675 680 685

atg cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca 2112

Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
690 695 700

tct tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct 2160
Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
705 710 715 720

gcc atg cgt ggc tgt aag gca atc aat gct ggc ggt ggt gca aca act 2208
Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
725 730 735

gtt tta act aag gat ggt atg aca aga ggc cca gta gtc cgt ttc cca 2256
Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
740 745 750

act ttg aaa aga tct ggt gcc tgt aag ata tgg tta gac tca gaa gag 2304
Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu
755 760 765

gga caa aac gca att aaa aaa gct ttt aac tct aca tca aga ttt gca 2352
Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
770 775 780

cgt ctg caa cat att caa act tgt cta gca gga gat tta ctc ttc atg 2400
Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
785 790 795 800

aga ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct 2448
Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
805 810 815

aag ggt gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tgg 2496
Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
820 825 830

gaa gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa 2544
Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
835 840 845

aaa cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt gtc gtc 2592
Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
850 855 860

gca gaa gct act att cct ggt gat gtt gtc aga aaa gtg tta aaa agt 2640
Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865 870 875 880

gat gtt tcc gca ttg gtt gag ttg aac att gct aag aat ttg gtt gga 2688
Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
885 890 895

tct gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cgt gca gct aat 2736
Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala Arg Ala Ala Asn
900 905 910

tta gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat 2784
Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn
915 920 925

gtc gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat 2832

Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
930 935 940

ttg aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt 2880
Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945 950 955 960

ggt ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt 2928
Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
965 970 975

gta aga ggc cca cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta 2976
Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
980 985 990

gca aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt 3024
Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
995 1000 1005

gct gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac 3072
Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
1010 1015 1020

agg aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat 3120
Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
1025 1030 1035 1040

ata aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 3165
Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
1045 1050

<210> 10

<211> 1054

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 10

Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
1 5 10 15

Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
20 25 30

Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
35 40 45

Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
50 55 60

Asn Lys Asp Phe Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser
85 90 95

Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn
100 105 110

Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe

115 120 125

Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser
130 135 140

Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp
145 150 155 160

Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp
165 170 175

Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile
180 185 190

Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe
195 200 205

Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr
210 215 220

Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln
225 230 235 240

Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu
245 250 255

Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala
260 265 270

Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile

275 280 285

Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg
290 295 300

Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser
305 310 315 320

Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser
325 330 335

Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr
355 360 365

Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala
370 375 380

Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn
385 390 395 400

Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe
405 410 415

Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala
420 425 430

Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe

435 440 445

Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser
450 455 460

Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile
465 470 475 480

Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg
485 490 495

Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala
500 505 510

Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr
515 520 525

Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr
530 535 540

Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val
545 550 555 560

Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser
565 570 575

Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu
580 585 590

Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Ser Leu

595 600 605

Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
610 615 620

Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
625 630 635 640

Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
645 650 655

Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
660 665 670

Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
675 680 685

Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
690 695 700

Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
705 710 715 720

Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
725 730 735

Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
740 745 750

Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu

755 760 765

Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
770 775 780

Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
785 790 795 800

Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
805 810 815

Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
820 825 830

Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
835 840 845

Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
850 855 860

Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865 870 875 880

Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
885 890 895

Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala Arg Ala Ala Asn
900 905 910

Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn

915 920 925

Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
930 935 940

Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945 950 955 960

Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
965 970 975

Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
980 985 990

Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
995 1000 1005

Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
1010 1015 1020

Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
1025 1030 1035 1040

Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
1045 1050

<210> 11

<211> 3165

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (3162)

<400> 11

```
atg ccg ccg cta ttc aag gga ctg aaa cag atg gca aag cca att gcc   48
Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
 1               5                  10                  15

tat gtt tca aga ttt tcg gcg aaa cga cca att cat ata ata ctt ttt   96
Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
            20                  25                  30

tct cta atc ata tcc gca ttc gct tat cta tcc gtc att cag tat tac   144
Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
        35                  40                  45

ttc aat ggt tgg caa cta gat tca aat agt gtt ttt gaa act gct cca   192
Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
    50                  55                  60

aat aaa gac tcc aac act cta ttt caa gaa tgt tcc cat tac tac aga   240
Asn Lys Asp Ser Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg
65                  70                  75                  80

gat tcc tct cta gat ggt tgg gta tca atc acc gcg cat gaa gct agt   288
Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser
                85                  90                  95
```

gag tta cca gcc cca cac cat tac tat cta tta aac ctg aac ttc aat 336
Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn
100 105 110

agt cct aat gaa act gac tcc att cca gaa cta gct aac acg gtt ttt 384
Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe
115 120 125

gag aaa gat aat aca aaa tat att ctg caa gaa gat ctc agc gtt tcc 432
Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser
130 135 140

aaa gaa att tct tct act gat gga acg aaa tgg agg tta aga agt gac 480
Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp
145 150 155 160

aga aaa agt ctt ttc gac gta aag acg tta gca tat tct ctc tac gat 528
Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp
165 170 175

gta ttt tca gaa aat gta acc caa gca gac ccg ttt gac gtc ctt att 576
Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile
180 185 190

atg gtt act gcc tac cta atg atg ttc tac acc ata ttc ggc ctc ttc 624
Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe
195 200 205

aat gac atg agg aag acc ggg tca aat ttt tgg ttg agc gcc tct aca 672

```
Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr
    210                 215                 220

gtg gtc aat tct gca tca tca ctt ttc tta gca ttg tat gtc acc caa   720
Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln
225                 230                 235                 240

tgt att cta ggc aaa gaa gtt tcc gca tta act ctt ttt gaa ggt ttg   768
Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu
                245                 250                 255

cct ttc att gta gtt gtt gtt ggt ttc aag cac aaa atc aag att gcc   816
Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala
            260                 265                 270

cag tat gcc ctg gag aaa ttt gaa aga gtc ggt tta tct aaa agg att   864
Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile
        275                 280                 285

act acc gat gaa atc gtt ttt gaa tcc gtg agc gaa gag ggt ggt cgt   912
Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg
    290                 295                 300

ttg att caa gac cat ttg ctt tgt att ttt gcc ttt atc gga tgc tct   960
Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser
305                 310                 315                 320

atg tat gct cac caa ttg aag act ttg aca aac ttc tgc ata tta tca   1008
Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser
                325                 330                 335
```

gca ttt atc cta att ttc gaa ttg att tta act cct aca ttt tat tct 1056
Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

gct atc tta gcg ctt aga ctg gaa atg aat gtt atc cac aga tct act 1104
Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr
355 360 365

att atc aag caa aca tta gaa gaa gac ggt gtt gtt cca tct aca gca 1152
Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala
370 375 380

aga atc att tct aag gca gaa aag aaa tcc gta tct tct ttc tta aat 1200
Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn
385 390 395 400

ctc agt gtg gtt gtc att atc atg aaa ctc tct gtc ata ctg ttg ttc 1248
Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe
405 410 415

gtc ttc atc aac ttt tat aac ttt ggt gca aat tgg gtc aat gat gcc 1296
Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala
420 425 430

ttc aat tca ttg tac ttc gat aag gaa cgt gtt tct cta cca gat ttt 1344
Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe
435 440 445

att acc tcg aat gcc tct gaa aac ttt aaa gag caa gct att gtt agt 1392

Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser
450 455 460

gtc acc cca tta tta tat tac aaa ccc att aag tcc tac caa cgc att 1440
Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile
465 470 475 480

gag gat atg gtt ctt cta ttg ctt cgt aat gtc agt gtt gcc att cgt 1488
Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg
485 490 495

gat agg ttc gtc agt aaa tta gtt ctt tcc gcc tta gta tgc agt gct 1536
Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala
500 505 510

gtc atc aat gtg tat tta tta aat gct gct aga att cat acc agt tat 1584
Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr
515 520 525

act gca gac caa ttg gtg aag act gaa gtc acc aag aag tct ttt act 1632
Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr
530 535 540

gct cct gta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc 1680
Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val
545 550 555 560

att tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca 1728
Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser
565 570 575

tca gga cct tca tca tct agt gag gaa gat gat tcc cgc gat att gaa 1776
Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu
580 585 590

agc ttg gat aag aaa ata cgt cct tta gaa gaa tta gaa gca tta tta 1824
Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu
595 600 605

agt agt gga aat aca aaa caa ttg aag aac aaa gag gtc gct gcc ttg 1872
Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
610 615 620

gtt att cac ggt aag tta cct ttg tac gct ttg gag aaa aaa tta ggt 1920
Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
625 630 635 640

gat act acg aga gcg gtt gcg gta cgt agg aag gct ctt tca att ttg 1968
Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
645 650 655

gca gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat 2016
Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
660 665 670

gac tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac 2064
Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
675 680 685

atg cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca 2112

Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
690 695 700

tct tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct 2160
Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
705 710 715 720

gcc atg cgt ggc tgt aag gca atc aat gct ggc ggt ggt gca aca act 2208
Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
725 730 735

gtt tta act aag gat ggt atg aca aga ggc cca gta gtc cgt ttc cca 2256
Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
740 745 750

act ttg aaa aga tct ggt gcc tgt aag ata tgg tta gac tca gaa gag 2304
Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu
755 760 765

gga caa aac gca att aaa aaa gct ttt aac tct aca tca aga ttt gca 2352
Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
770 775 780

cgt ctg caa cat att caa act tgt cta gca gga gat tta ctc ttc atg 2400
Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
785 790 795 800

aga ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct 2448
Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
805 810 815

aag ggt gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tgg 2496
Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
820 825 830

gaa gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa 2544
Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
835 840 845

aaa cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt gtc gtc 2592
Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
850 855 860

gca gaa gct act att cct ggt gat gtt gtc aga aaa gtg tta aaa agt 2640
Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865 870 875 880

gat gtt tcc gca ttg gtt gag ttg aac att gct aag aat ttg gtt gga 2688
Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
885 890 895

tct gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cat gca gct aat 2736
Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn
900 905 910

tta gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat 2784
Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn
915 920 925

gtc gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat 2832

Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
930 935 940

ttg aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt 2880
Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945 950 955 960

ggt ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt 2928
Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
965 970 975

gta aga ggc cca cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta 2976
Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
980 985 990

gca aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt 3024
Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
995 1000 1005

gct gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac 3072
Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
1010 1015 1020

agg aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat 3120
Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
1025 1030 1035 1040

ata aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 3165
Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
1045 1050

<210> 12

<211> 1054

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 12

Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
1 5 10 15

Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
20 25 30

Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
35 40 45

Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
50 55 60

Asn Lys Asp Ser Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser
85 90 95

Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn
100 105 110

Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe

115 120 125

Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser
130 135 140

Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp
145 150 155 160

Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp
165 170 175

Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile
180 185 190

Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe
195 200 205

Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr
210 215 220

Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln
225 230 235 240

Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu
245 250 255

Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala
260 265 270

Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile

275 280 285

Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg
290 295 300

Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser
305 310 315 320

Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser
325 330 335

Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser
340 345 350

Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr
355 360 365

Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala
370 375 380

Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn
385 390 395 400

Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe
405 410 415

Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala
420 425 430

Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe

435 440 445

Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser
450 455 460

Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile
465 470 475 480

Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg
485 490 495

Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala
500 505 510

Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr
515 520 525

Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr
530 535 540

Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val
545 550 555 560

Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser
565 570 575

Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu
580 585 590

Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu

595 600 605

Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
610 615 620

Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
625 630 635 640

Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
645 650 655

Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
660 665 670

Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
675 680 685

Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
690 695 700

Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
705 710 715 720

Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
725 730 735

Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
740 745 750

Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu

755 760 765

Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
770 775 780

Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
785 790 795 800

Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
805 810 815

Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
820 825 830

Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
835 840 845

Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
850 855 860

Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865 870 875 880

Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
885 890 895

Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn
900 905 910

Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn

915 920 925

Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
930 935 940

Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945 950 955 960

Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
965 970 975

Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
980 985 990

Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
995 1000 1005

Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
1010 1015 1020

Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
1025 1030 1035 1040

Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
1045 1050

<210> 13
<211> 2925
<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 13

atgccgccgc tattcaaggg actgaaacag atggcaaagc caattgccta tgtttcaaga 60

ttttcggcga aacgaccaat tcatataata ctttttttctc taatcatatc cgcattcgct 120

tatctatccg tcattcagta ttacttcaat ggttggcaac tagattcaaa tagtgttttt 180

gaaactgctc caaataaaga cttcaacact ctatttcaag aatgttccca ttactacaga 240

gattcctctc tagatggttg ggtatcaatc accgcgcatg aagctagtga gttaccagcc 300

ccacaccatt actatctatt aaacctgaac ttcaatagtc ctaatgaaac tgactccatt 360

ccagaactag ctaacacggt ttttgagaaa gataatacaa aatatattct gcaagaagat 420

ctcagcgttt ccaaagaaat ttcttctact gatggaacga aatggaggtt aagaagtgac 480

agaaaaagtc ttttcgacgt aaagacgtta gcatattctc tctacgatgt attttcagaa 540

aatgtaaccc aagcagacca caaaatcaag attgcccagt atgccctgga gaaatttgaa 600

agagtcggtt tatctaaaag gattactacc gatgaaatcg tttttgaatc cgtgagcgaa 660

gagggtggtc gtttgattca agaccatttg ctttgtattt ttgcctttat cggatgctct 720

atgtatgctc accaattgaa gactttgaca aacttctgca tattatcagc atttatccta 780

attttcgaat tgattttaac tcctacattt tattctgcta tcttagcgct tagactggaa 840

atgaatgtta tccacagatc tactattatc aagcaaacat tagaagaaga cggtgttgtt 900

ccatctacag caagaatcat ttctaaggca gaaaagaaat ccgtatcttc tttcttaaat 960

ctcagtgtgg ttgtcattat catgaaactc tctgtcatac tgttgttcgt cttcatcaac 1020

ttttataact ttggtgcaaa ttgggtcaat gatgccttca attcattgta cttcgataag 1080

gaacgtgttt ctctaccaga ttttattacc tcgaatgcct ctgaaaactt taaagagcaa 1140

gctattgtta gtgtcacccc attattatat tacaaaccca ttaagtccta ccaacgcatt 1200

gaggatatgg ttcttctatt gcttcgtaat gtcagtgttg ccattcgtga taggttcgtc 1260

agtaaattag ttctttccgc cttagtatgc agtgctgtca tcaatgtgta tttattaaat 1320

gctgctagaa ttcataccag ttatactgca gaccaattgg tgaagactga agtcaccaag 1380

aagtctttta ctgctcctgt acaaaaggct tctacaccag ttttaaccaa taaaacagtc 1440

atttctggat cgaaagtcaa aagtttatca tctgcgcaat cgagctcatc aggaccttca 1500

tcatctagtg aggaagatga ttcccgcgat attgaaagct tggataagaa aatacgtcct 1560

ttagaagaat tagaagcatc attaagtagt ggaaatacaa aacaattgaa gaacaaagag 1620

gtcgctgcct tggttattca cggtaagtta cctttgtacg ctttggagaa aaaattaggt 1680

gatactacga gagcggttgc ggtacgtagg aaggctcttt caattttggc agaagctcct 1740

gtattagcat ctgatcgttt accatataaa aattatgact acgaccgcgt atttggcgct 1800

tgttgtgaaa atgttatagg ttacatgcct ttgcccgttg gtgttatagg ccccttggtt 1860

atcgatggta catcttatca tataccaatg gcaactacag agggttgttt ggtagcttct 1920

gccatgcgtg gctgtaaggc aatcaatgct ggcggtggtg caacaactgt tttaactaag 1980

gatggtatga caagaggccc agtagtccgt ttcccaactt tgaaaagatc tggtgcctgt 2040

aagatatggt tagactcaga agagggacaa aacgcaatta aaaaagcttt taactctaca 2100

tcaagatttg cacgtctgca acatattcaa acttgtctag caggagattt actcttcatg 2160

agatttagaa caactactgg tgacgcaatg ggtatgaata tgatttctaa gggtgtcgaa 2220

tactcattaa agcaaatggt agaagagtat ggctgggaag atatggaggt tgtctccgtt 2280

tctggtaact actgtaccga caaaaaacca gctgccatca actggatcga aggtcgtggt 2340

aagagtgtcg tcgcagaagc tactattcct ggtgatgttg tcagaaaagt gttaaaaagt 2400

gatgtttccg cattggttga gttgaacatt gctaagaatt tggttggatc tgcaatggct 2460

gggtctgttg gtggatttaa cgcacgtgca gctaatttag tgacagctgt tttcttggca 2520

ttaggacaag atcctgcaca aaatgtcgaa agttccaact gtataacatt gatgaaagaa 2580

gtggacggtg atttgagaat ttccgtatcc atgccatcca tcgaagtagg taccatcggt 2640

ggtggtactg ttctagaacc acaaggtgcc atgttggact tattaggtgt aagaggccca 2700

catgctaccg ctcctggtac caacgcacgt caattagcaa gaatagttgc ctgtgccgtc 2760

ttggcaggtg aattatcctt atgtgctgcc ctagcagccg gccatttggt tcaaagtcat 2820

atgacccaca acaggaaacc tgctgaacca acaaaaccta acaatttgga cgccactgat 2880

ataaatcgtt tgaaagatgg gtccgtcacc tgcattaaat cctaa 2925

<210> 14
<211> 3090
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 14
atgccgccgc tattcaaggg actgaaacag atggcaaagc caattgccta tgtttcaaga 60

ttttcggcga aacgaccaat tcatataata ctttttttctc taatcatatc cgcattcgct 120

tatctatccg tcattcagta ttacttcaat ggttggcaac tagattcaaa tagtgttttt 180

gaaactgctc caaataaaga cttcaacact ctatttcaag aatgttccca ttactacaga 240

gattcctctc tagatggttg ggtatcaatc accgcgcatg aagctagtga gttaccagcc 300

ccacaccatt actatctatt aaacctgaac ttcaatagtc ctaatgaaac tgactccatt 360

ccagaactag ctaacacggt ttttgagaaa gataatacaa aatatattct gcaagaagat 420

ctcagcgttt ccaaagaaat ttcttctact gatggaacga aatggaggtt aagaagtgac 480

agaaaaagtc ttttcgacgt aaagacgtta gcatattctc tctacgatgt attttcagaa 540

aatgtaaccc aagcagaccc gtttgacgtc cttattatgg ttactgccta cctaatgatg 600

ttctacacca tattcggcct cttcaatgac atgaggaaga ccgggtcaaa tttttggttg 660

agcgcctcta cagtggtcaa ttctgcatca tcacttttct tagcattgta tgtcacccaa 720

tgtattctag gcaaagaagt ttccgcatta actctttttg aaggtttgcc tttcattgta 780

gttgttgttg gtttcaagca caaaatcaag attgcccagt atgccctgga gaaatttgaa 840

agagtcggtt tatctaaaag gattactacc gatgaaatcg tttttgaatc cgtgagcgaa 900

gagggtggtc gtttgattca agaccatttg ctttgtattt ttgcctttat cggatgctct 960

atgtatgctc accaattgaa gactttgaca aacttctgca tattatcagc atttatccta 1020

attttcgaat tgattttaac tcctacattt tattctgcta tcttagcgct tagactggaa 1080

atgaatgtta tccacagatc tactattatc aagcaaacat tagaagaaga cggtgttgtt 1140

ccatctacag caagaatcat ttctaaggca gaaaagaaat ccgtatcttc taactttggt 1200

gcaaattggg tcaatgatgc cttcaattca ttgtacttcg ataaggaacg tgtttctcta 1260

ccagatttta ttacctcgaa tgcctctgaa aactttaaag agcaagctat tgttagtgtc 1320

accccattat tatattacaa acccattaag tcctaccaac gcattgagga tatggttctt 1380

ctattgcttc gtaatgtcag tgttgccatt cgtgataggt tcgtcagtaa attagttctt 1440

tccgccttag tatgcagtgc tgtcatcaat gtgtatttat taaatgctgc tagaattcat 1500

accagttata ctgcagacca attggtgaag actgaagtca ccaagaagtc ttttactgct 1560

cctgtacaaa aggcttctac accagtttta accaataaaa cagtcatttc tggatcgaaa 1620

gtcaaaagtt tatcatctgc gcaatcgagc tcatcaggac cttcatcatc tagtgaggaa 1680

gatgattccc gcgatattga aagcttggat aagaaaatac gtcctttaga agaattagaa 1740

gcatcattaa gtagtggaaa tacaaaacaa ttgaagaaca aagaggtcgc tgccttggtt 1800

attcacggta agttaccttt gtacgctttg gagaaaaaat taggtgatac tacgagagcg 1860

gttgcggtac gtaggaaggc tctttcaatt ttggcagaag ctcctgtatt agcatctgat 1920

cgtttaccat ataaaaatta tgactacgac cgcgtatttg gcgcttgttg tgaaaatgtt 1980

ataggttaca tgcctttgcc cgttggtgtt ataggcccct tggttatcga tggtacatct 2040

tatcatatac caatggcaac tacagagggt tgtttggtag cttctgccat gcgtggctgt 2100

aaggcaatca atgctggcgg tggtgcaaca actgttttaa ctaaggatgg tatgacaaga 2160

ggcccagtag tccgtttccc aactttgaaa agatctggtg cctgtaagat atggttagac 2220

tcagaagagg gacaaaacgc aattaaaaaa gcttttaact ctacatcaag atttgcacgt 2280

ctgcaacata ttcaaacttg tctagcagga gatttactct tcatgagatt tagaacaact 2340

actggtgacg caatgggtat gaatatgatt tctaagggtg tcgaatactc attaaagcaa 2400

atggtagaag agtatggctg ggaagatatg gaggttgtct ccgtttctgg taactactgt 2460

accgacaaaa aaccagctgc catcaactgg atcgaaggtc gtggtaagag tgtcgtcgca 2520

gaagctacta ttcctggtga tgttgtcaga aaagtgttaa aaagtgatgt ttccgcattg 2580

gttgagttga acattgctaa gaatttggtt ggatctgcaa tggctgggtc tgttggtgga 2640

tttaacgcac gtgcagctaa tttagtgaca gctgttttct tggcattagg acaagatcct 2700

gcacaaaatg tcgaaagttc caactgtata acattgatga aagaagtgga cggtgatttg 2760

agaatttccg tatccatgcc atccatcgaa gtaggtacca tcggtggtgg tactgttcta 2820

gaaccacaag gtgccatgtt ggacttatta ggtgtaagag gcccacatgc taccgctcct 2880

ggtaccaacg cacgtcaatt agcaagaata gttgcctgtg ccgtcttggc aggtgaatta 2940

tccttatgtg ctgccctagc agccggccat ttggttcaaa gtcatatgac ccacaacagg 3000

aaacctgctg aaccaacaaa acctaacaat ttggacgcca ctgatataaa tcgtttgaaa 3060

gatgggtccg tcacctgcat taaatcctaa 3090

<210> 15
<211> 2973
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 15
atgccgccgc tattcaaggg actgaaacag atggcaaagc caattgccta tgtttcaaga 60

ttttcggcga aacgaccaat tcatataata ctttttttctc taatcatatc cgcattcgct 120

tatctatccg tcattcagta ttacttcaat ggttggcaac tagattcaaa tagtgttttt 180

gaaactgctc caaataaaga cttcaacact ctatttcaag aatgttccca ttactacaga 240

gattcctctc tagatggttg ggtatcaatc accgcgcatg aagctagtga gttaccagcc 300

ccacaccatt actatctatt aaacctgaac ttcaatagtc ctaatgaaac tgactccatt 360

ccagaactag ctaacacggt ttttgagaaa gataatacaa aatatattct gcaagaagat 420

ctcagcgttt ccaaagaaat ttcttctact gatggaacga aatggaggtt aagaagtgac 480

agaaaaagtc ttttcgacgt aaagacgtta gcatattctc tctacgatgt attttcagaa 540

aatgtaaccc aagcagaccc gtttgacgtc cttattatgg ttactgccta cctaatgatg 600

ttctacacca tattcggcct cttcaatgac atgaggaaga ccgggtcaaa tttttggttg 660

agcgcctcta cagtggtcaa ttctgcatca tcacttttct tagcattgta tgtcacccaa 720

tgtattctag gcaaagaagt ttccgcatta actctttttg aaggtttgcc tttcattgta 780

gttgttgttg gtttcaagca caaaatcaag attgcccagt atgccctgga gaaatttgaa 840

agagtcggtt tatctaaaag gattactacc gatgaaatcg tttttgaatc cgtgagcgaa 900

gagggtggtc gtttgattca agaccatttg ctttgtattt ttgcctttat cggatgctct 960

atgtatgctc accaattgaa gactttgaca aacttctgca tattatcagc atttatccta 1020

attttcgaat tgattttaac tcctacattt tattctgcta tcttagcgct tagactggaa 1080

atgaatgtta tccacagatc tactattatc aagcaaacat tagaagaaga cggtgttgtt 1140

ccatctacag caagaatcat ttctaaggca gaaaagaaat ccgtatcttc tttcttaaat 1200

ctcagtgtgg ttgtcattat catgaaactc tctgtcatac tgttgttcgt cttcatcaac 1260

ttttataact ttggtgcaaa ttgggtcaat gatgccttca attcattgta cttcgataag 1320

gaacgtgttt ctctaccaga ttttattacc tcgaatgcct ctgaaaactt taaagagcaa 1380

cataccagtt atactgcaga ccaattggtg aagactgaag tcaccaagaa gtcttttact 1440

gctcctgtac aaaaggcttc tacaccagtt ttaaccaata aaacagtcat ttctggatcg 1500

aaagtcaaaa gtttatcatc tgcgcaatcg agctcatcag gaccttcatc atctagtgag 1560

gaagatgatt cccgcgatat tgaaagcttg gataagaaaa tacgtccttt agaagaatta 1620

gaagcatcat taagtagtgg aaatacaaaa caattgaaga acaaagaggt cgctgccttg 1680

gttattcacg gtaagttacc tttgtacgct ttggagaaaa aattaggtga tactacgaga 1740

gcggttgcgg tacgtaggaa ggctctttca attttggcag aagctcctgt attagcatct 1800

gatcgtttac catataaaaa ttatgactac gaccgcgtat ttggcgcttg ttgtgaaaat 1860

gttataggtt acatgccttt gcccgttggt gttataggcc ccttggttat cgatggtaca 1920

tcttatcata taccaatggc aactacagag ggttgtttgg tagcttctgc catgcgtggc 1980

tgtaaggcaa tcaatgctgg cggtggtgca acaactgttt taactaagga tggtatgaca 2040

agaggcccag tagtccgttt cccaactttg aaaagatctg gtgcctgtaa gatatggtta 2100

gactcagaag agggacaaaa cgcaattaaa aaagctttta actctacatc aagatttgca 2160

cgtctgcaac atattcaaac ttgtctagca ggagatttac tcttcatgag atttagaaca 2220

actactggtg acgcaatggg tatgaatatg atttctaagg gtgtcgaata ctcattaaag 2280

caaatggtag aagagtatgg ctgggaagat atggaggttg tctccgtttc tggtaactac 2340

tgtaccgaca aaaaaccagc tgccatcaac tggatcgaag gtcgtggtaa gagtgtcgtc 2400

gcagaagcta ctattcctgg tgatgttgtc agaaaagtgt taaaaagtga tgtttccgca 2460

ttggttgagt tgaacattgc taagaatttg gttggatctg caatggctgg gtctgttggt 2520

ggatttaacg cacgtgcagc taatttagtg acagctgttt tcttggcatt aggacaagat 2580

cctgcacaaa atgtcgaaag ttccaactgt ataacattga tgaaagaagt ggacggtgat 2640

ttgagaattt ccgtatccat gccatccatc gaagtaggta ccatcggtgg tggtactgtt 2700

ctagaaccac aaggtgccat gttggactta ttaggtgtaa gaggcccaca tgctaccgct 2760

cctggtacca acgcacgtca attagcaaga atagttgcct gtgccgtctt ggcaggtgaa 2820

ttatccttat gtgctgccct agcagccggc catttggttc aaagtcatat gacccacaac 2880

aggaaacctg ctgaaccaac aaaacctaac aatttggacg ccactgatat aaatcgtttg 2940

aaagatgggt ccgtcacctg cattaaatcc taa 2973

<210> 16
<211> 2457
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 16
atgccgccgc tattcaaggg actgaaacag atggcaaagc caattgccta tgtttcaaga 60

ttttcggcga aacgaccaat tcatataata ctttttctc taatcatatc cgcattcgct 120

tatctatccg tcattcagta ttacttcaat ggttggcaac tagattcaaa tagtgttttt 180

gaaactgctc caaataaaga cttcaacact ctatttcaag aatgttccca ttactacaga 240

gattcctctc tagatggttg ggtatcaatc accgcgcatg aagctagtga gttaccagcc 300

ccacaccatt actatctatt aaacctgaac ttcaatagtc ctaatgaaac tgactccatt 360

ccagaactag ctaacacggt ttttgagaaa gataatacaa aatatattct gcaagaagat 420

ctcagcgttt ccaaagaaat ttcttctact gatggaacga aatggaggtt aagaagtgac 480

agaaaaagtc ttttcgacgt aaagacgtta gcatattctc tctacgatgt attttcagaa 540

aatgtaaccc aagcagacaa ctttggtgca aattgggtca atgatgcctt caattcattg 600

tacttcgata aggaacgtgt ttctctacca gattttatta cctcgaatgc ctctgaaaac 660

tttaaagagc aagctattgt tagtgtcacc ccattattat attacaaacc cattaagtcc 720

taccaacgca ttgaggatat ggttcttcta ttgcttcgta atgtcagtgt tgccattcgt 780

gataggttcg tcagtaaatt agttctttcc gccttagtat gcagtgctgt catcaatgtg 840

tatttattaa atgctgctag aattcatacc agttatactg cagaccaatt ggtgaagact 900

gaagtcacca agaagtcttt tactgctcct gtacaaaagg cttctacacc agttttaacc 960

aataaaacag tcatttctgg atcgaaagtc aaaagtttat catctgcgca atcgagctca 1020

tcaggacctt catcatctag tgaggaagat gattcccgcg atattgaaag cttggataag 1080

aaaatacgtc ctttagaaga attagaagca tcattaagta gtggaaatac aaaacaattg 1140

aagaacaaag aggtcgctgc cttggttatt cacggtaagt tacctttgta cgctttggag 1200

aaaaaattag gtgatactac gagagcggtt gcggtacgta ggaaggctct ttcaattttg 1260

gcagaagctc ctgtattagc atctgatcgt ttaccatata aaaattatga ctacgaccgc 1320

gtatttggcg cttgttgtga aaatgttata ggttacatgc ctttgcccgt tggtgttata 1380

ggccccttgg ttatcgatgg tacatcttat catataccaa tggcaactac agagggttgt 1440

ttggtagctt ctgccatgcg tggctgtaag gcaatcaatg ctggcggtgg tgcaacaact 1500

gttttaacta aggatggtat gacaagaggc ccagtagtcc gtttcccaac tttgaaaaga 1560

tctggtgcct gtaagatatg gttagactca gaagagggac aaaacgcaat taaaaaagct 1620

tttaactcta catcaagatt tgcacgtctg caacatattc aaacttgtct agcaggagat 1680

ttactcttca tgagatttag aacaactact ggtgacgcaa tgggtatgaa tatgatttct 1740

aagggtgtcg aatactcatt aaagcaaatg gtagaagagt atggctggga agatatggag 1800

gttgtctccg tttctggtaa ctactgtacc gacaaaaaac cagctgccat caactggatc 1860

gaaggtcgtg gtaagagtgt cgtcgcagaa gctactattc ctggtgatgt tgtcagaaaa 1920

gtgttaaaaa gtgatgtttc cgcattggtt gagttgaaca ttgctaagaa tttggttgga 1980

tctgcaatgg ctgggtctgt tggtggattt aacgcacgtg cagctaattt agtgacagct 2040

gttttcttgg cattaggaca agatcctgca caaaatgtcg aaagttccaa ctgtataaca 2100

ttgatgaaag aagtggacgg tgatttgaga atttccgtat ccatgccatc catcgaagta 2160

ggtaccatcg gtggtggtac tgttctagaa ccacaaggtg ccatgttgga cttattaggt 2220

gtaagaggcc cacatgctac cgctcctggt accaacgcac gtcaattagc aagaatagtt 2280

gcctgtgccg tcttggcagg tgaattatcc ttatgtgctg ccctagcagc cggccatttg 2340

gttcaaagtc atatgaccca caacaggaaa cctgctgaac caacaaaacc taacaatttg 2400

gacgccactg atataaatcg tttgaaagat gggtccgtca cctgcattaa atcctaa 2457

<210> 17
<211> 2151
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 17
atgccgccgc tattcaaggg actgaaacag atggcaaagc caattgccta tgtttcaaga 60

ttttcggcga aacgaccaat tcatataata ctttttttctc taatcatatc cgcattcgct 120

tatctatccg tcattcagta ttacttcaat ggttggcaac tagattcaaa tagtgttttt 180

gaaactgctc caaataaaga cttcaacact ctatttcaag aatgttccca ttactacaga 240

gattcctctc tagatggttg ggtatcaatc accgcgcatg aagctagtga gttaccagcc 300

ccacaccatt actatctatt aaacctgaac ttcaatagtc ctaatgaaac tgactccatt 360

ccagaactag ctaacacggt ttttgagaaa gataatacaa aatatattct gcaagaagat 420

ctcagcgttt ccaaagaaat ttcttctact gatggaacga aatggaggtt aagaagtgac 480

agaaaaagtc ttttcgacgt aaagacgtta gcatattctc tctacgatgt attttcagaa 540

aatgtaaccc aagcagacca taccagttat actgcagacc aattggtgaa gactgaagtc 600

accaagaagt cttttactgc tcctgtacaa aaggcttcta caccagtttt aaccaataaa 660

acagtcattt ctggatcgaa agtcaaaagt ttatcatctg cgcaatcgag ctcatcagga 720

ccttcatcat ctagtgagga agatgattcc cgcgatattg aaagcttgga taagaaaata 780

cgtcctttag aagaattaga agcatcatta agtagtggaa atacaaaaca attgaagaac 840

aaagaggtcg ctgccttggt tattcacggt aagttacctt tgtacgcttt ggagaaaaaa 900

ttaggtgata ctacgagagc ggttgcggta cgtaggaagg ctctttcaat tttggcagaa 960

gctcctgtat tagcatctga tcgtttacca tataaaaatt atgactacga ccgcgtattt 1020

ggcgcttgtt gtgaaaatgt tataggttac atgcctttgc ccgttggtgt tataggcccc 1080

ttggttatcg atggtacatc ttatcatata ccaatggcaa ctacagaggg ttgtttggta 1140

gcttctgcca tgcgtggctg taaggcaatc aatgctggcg gtggtgcaac aactgtttta 1200

actaaggatg gtatgacaag aggcccagta gtccgtttcc caactttgaa aagatctggt 1260

gcctgtaaga tatggttaga ctcagaagag ggacaaaacg caattaaaaa agcttttaac 1320

tctacatcaa gatttgcacg tctgcaacat attcaaactt gtctagcagg agatttactc 1380

ttcatgagat ttagaacaac tactggtgac gcaatgggta tgaatatgat ttctaagggt 1440

gtcgaatact cattaaagca aatggtagaa gagtatggct gggaagatat ggaggttgtc 1500

tccgtttctg gtaactactg taccgacaaa aaaccagctg ccatcaactg gatcgaaggt 1560

cgtggtaaga gtgtcgtcgc agaagctact attcctggtg atgttgtcag aaaagtgtta 1620

aaaagtgatg tttccgcatt ggttgagttg aacattgcta agaatttggt tggatctgca 1680

atggctgggt ctgttggtgg atttaacgca cgtgcagcta atttagtgac agctgttttc 1740

ttggcattag gacaagatcc tgcacaaaat gtcgaaagtt ccaactgtat aacattgatg 1800

aaagaagtgg acggtgattt gagaatttcc gtatccatgc catccatcga agtaggtacc 1860

atcggtggtg gtactgttct agaaccacaa ggtgccatgt tggacttatt aggtgtaaga 1920

ggcccacatg ctaccgctcc tggtaccaac gcacgtcaat tagcaagaat agttgcctgt 1980

gccgtcttgg caggtgaatt atccttatgt gctgccctag cagccggcca tttggttcaa 2040

agtcatatga cccacaacag gaaacctgct gaaccaacaa aacctaacaa tttggacgcc 2100

actgatataa atcgtttgaa agatgggtcc gtcacctgca ttaaatccta a 2151

<210> 18
<211> 1620
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 18
atgccgccgc tattcaaggg actgaaacat accagttata ctgcagacca attggtgaag 60

actgaagtca ccaagaagtc ttttactgct cctgtacaaa aggcttctac accagtttta 120

accaataaaa cagtcatttc tggatcgaaa gtcaaaagtt tatcatctgc gcaatcgagc 180

tcatcaggac cttcatcatc tagtgaggaa gatgattccc gcgatattga aagcttggat 240

aagaaaatac gtcctttaga agaattagaa gcatcattaa gtagtggaaa tacaaaacaa 300

ttgaagaaca aagaggtcgc tgccttggtt attcacggta agttaccttt gtacgctttg 360

gagaaaaaat taggtgatac tacgagagcg gttgcggtac gtaggaaggc tctttcaatt 420

ttggcagaag ctcctgtatt agcatctgat cgtttaccat ataaaaatta tgactacgac 480

cgcgtatttg gcgcttgttg tgaaaatgtt ataggttaca tgcctttgcc cgttggtgtt 540

ataggcccct tggttatcga tggtacatct tatcatatac caatggcaac tacagagggt 600

tgtttggtag cttctgccat gcgtggctgt aaggcaatca atgctggcgg tggtgcaaca 660

actgttttaa ctaaggatgg tatgacaaga ggcccagtag tccgtttccc aactttgaaa 720

agatctggtg cctgtaagat atggttagac tcagaagagg gacaaaacgc aattaaaaaa 780

gcttttaact ctacatcaag atttgcacgt ctgcaacata ttcaaacttg tctagcagga 840

gatttactct tcatgagatt tagaacaact actggtgacg caatgggtat gaatatgatt 900

tctaagggtg tcgaatactc attaaagcaa atggtagaag agtatggctg ggaagatatg 960

gaggttgtct ccgtttctgg taactactgt accgacaaaa aaccagctgc catcaactgg 1020

atcgaaggtc gtggtaagag tgtcgtcgca gaagctacta ttcctggtga tgttgtcaga 1080

aaagtgttaa aaagtgatgt ttccgcattg gttgagttga acattgctaa gaatttggtt 1140

ggatctgcaa tggctgggtc tgttggtgga tttaacgcac gtgcagctaa tttagtgaca 1200

gctgttttct tggcattagg acaagatcct gcacaaaatg tcgaaagttc caactgtata 1260

acattgatga aagaagtgga cggtgatttg agaatttccg tatccatgcc atccatcgaa 1320

gtaggtacca tcggtggtgg tactgttcta gaaccacaag gtgccatgtt ggacttatta 1380

ggtgtaagag gcccacatgc taccgctcct ggtaccaacg cacgtcaatt agcaagaata 1440

gttgcctgtg ccgtcttggc aggtgaatta tccttatgtg ctgccctagc agccggccat 1500

ttggttcaaa gtcatatgac ccacaacagg aaacctgctg aaccaacaaa acctaacaat 1560

ttggacgcca ctgatataaa tcgtttgaaa gatgggtccg tcacctgcat taaatcctaa 1620

<210> 19
<211> 1377
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 19
atgccgccgc tattcaaggg actgaaagca tcattaagta gtggaaatac aaaacaattg 60

aagaacaaag aggtcgctgc cttggttatt cacggtaagt tacctttgta cgctttggag 120

aaaaaattag gtgatactac gagagcggtt gcggtacgta ggaaggctct ttcaattttg 180

gcagaagctc ctgtattagc atctgatcgt ttaccatata aaaattatga ctacgaccgc 240

gtatttggcg cttgttgtga aaatgttata ggttacatgc ctttgcccgt tggtgttata 300

ggcccccttgg ttatcgatgg tacatcttat catataccaa tggcaactac agagggttgt 360

ttggtagctt ctgccatgcg tggctgtaag gcaatcaatg ctggcggtgg tgcaacaact 420

gttttaacta aggatggtat gacaagaggc ccagtagtcc gtttcccaac tttgaaaaga 480

tctggtgcct gtaagatatg gttagactca gaagagggac aaaacgcaat taaaaaagct 540

tttaactcta catcaagatt tgcacgtctg caacatattc aaacttgtct agcaggagat 600

ttactcttca tgagatttag aacaactact ggtgacgcaa tgggtatgaa tatgatttct 660

aagggtgtcg aatactcatt aaagcaaatg gtagaagagt atggctggga agatatggag 720

gttgtctccg tttctggtaa ctactgtacc gacaaaaaac cagctgccat caactggatc 780

gaaggtcgtg gtaagagtgt cgtcgcagaa gctactattc ctggtgatgt tgtcagaaaa 840

gtgttaaaaa gtgatgtttc cgcattggtt gagttgaaca ttgctaagaa tttggttgga 900

tctgcaatgg ctgggtctgt tggtggattt aacgcacgtg cagctaattt agtgacagct 960

gttttcttgg cattaggaca agatcctgca caaaatgtcg aaagttccaa ctgtataaca 1020

ttgatgaaag aagtggacgg tgatttgaga atttccgtat ccatgccatc catcgaagta 1080

ggtaccatcg gtggtggtac tgttctagaa ccacaaggtg ccatgttgga cttattaggt 1140

gtaagaggcc cacatgctac cgctcctggt accaacgcac gtcaattagc aagaatagtt 1200

gcctgtgccg tcttggcagg tgaattatcc ttatgtgctg ccctagcagc cggccatttg 1260

gttcaaagtc atatgaccca caacaggaaa cctgctgaac caacaaaacc taacaatttg 1320

gacgccactg atataaatcg tttgaaagat gggtccgtca cctgcattaa atcctaa 1377

<210> 20

<211> 1302

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 20

atgccgccgc tattcaaggg actgaaacct ttgtacgctt tggagaaaaa attaggtgat 60

actacgagag cggttgcggt acgtaggaag gctctttcaa ttttggcaga agctcctgta 120

ttagcatctg atcgtttacc atataaaaat tatgactacg accgcgtatt tggcgcttgt 180

tgtgaaaatg ttataggtta catgcctttg cccgttggtg ttataggccc cttggttatc 240

gatggtacat cttatcatat accaatggca actacagagg gttgtttggt agcttctgcc 300

atgcgtggct gtaaggcaat caatgctggc ggtggtgcaa caactgtttt aactaaggat 360

ggtatgacaa gaggcccagt agtccgtttc ccaactttga aaagatctgg tgcctgtaag 420

atatggttag actcagaaga gggacaaaac gcaattaaaa aagcttttaa ctctacatca 480

agatttgcac gtctgcaaca tattcaaact tgtctagcag gagatttact cttcatgaga 540

tttagaacaa ctactggtga cgcaatgggt atgaatatga tttctaaggg tgtcgaatac 600

tcattaaagc aaatggtaga agagtatggc tgggaagata tggaggttgt ctccgtttct 660

ggtaactact gtaccgacaa aaaaccagct gccatcaact ggatcgaagg tcgtggtaag 720

agtgtcgtcg cagaagctac tattcctggt gatgttgtca gaaaagtgtt aaaaagtgat 780

gtttccgcat tggttgagtt gaacattgct aagaatttgg ttggatctgc aatggctggg 840

tctgttggtg gatttaacgc acgtgcagct aatttagtga cagctgtttt cttggcatta 900

ggacaagatc ctgcacaaaa tgtcgaaagt tccaactgta taacattgat gaaagaagtg 960

gacggtgatt tgagaatttc cgtatccatg ccatccatcg aagtaggtac catcggtggt 1020

ggtactgttc tagaaccaca aggtgccatg ttggacttat taggtgtaag aggcccacat 1080

gctaccgctc ctggtaccaa cgcacgtcaa ttagcaagaa tagttgcctg tgccgtcttg 1140

gcaggtgaat tatccttatg tgctgcccta gcagccggcc atttggttca aagtcatatg 1200

acccacaaca ggaaacctgc tgaaccaaca aaacctaaca atttggacgc cactgatata 1260

aatcgtttga aagatgggtc cgtcacctgc attaaatcct aa 1302

<210> 21
<211> 1203
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 21
atgccgccgc tattcaaggg actgaaatct gatcgtttac catataaaaa ttatgactac 60

gaccgcgtat ttggcgcttg ttgtgaaaat gttataggtt acatgccttt gcccgttggt 120

gttataggcc ccttggttat cgatggtaca tcttatcata taccaatggc aactacagag 180

ggttgtttgg tagcttctgc catgcgtggc tgtaaggcaa tcaatgctgg cggtggtgca 240

acaactgttt taactaagga tggtatgaca agaggcccag tagtccgttt cccaactttg 300

aaaagatctg gtgcctgtaa gatatggtta gactcagaag agggacaaaa cgcaattaaa 360

aaagctttta actctacatc aagatttgca cgtctgcaac atattcaaac ttgtctagca 420

ggagatttac tcttcatgag atttagaaca actactggtg acgcaatggg tatgaatatg 480

atttctaagg gtgtcgaata ctcattaaag caaatggtag aagagtatgg ctgggaagat 540

atggaggttg tctccgtttc tggtaactac tgtaccgaca aaaaaccagc tgccatcaac 600

tggatcgaag gtcgtggtaa gagtgtcgtc gcagaagcta ctattcctgg tgatgttgtc 660

agaaaagtgt taaaaagtga tgtttccgca ttggttgagt tgaacattgc taagaatttg 720

gttggatctg caatggctgg gtctgttggt ggatttaacg cacgtgcagc taatttagtg 780

acagctgttt tcttggcatt aggacaagat cctgcacaaa atgtcgaaag ttccaactgt 840

ataacattga tgaaagaagt ggacggtgat ttgagaattt ccgtatccat gccatccatc 900

gaagtaggta ccatcggtgg tggtactgtt ctagaaccac aaggtgccat gttggactta 960

ttaggtgtaa gaggcccaca tgctaccgct cctggtacca acgcacgtca attagcaaga 1020

atagttgcct gtgccgtctt ggcaggtgaa ttatccttat gtgctgccct agcagccggc 1080

catttggttc aaagtcatat gacccacaac aggaaacctg ctgaaccaac aaaacctaac 1140

aatttggacg ccactgatat aaatcgtttg aaagatgggt ccgtcacctg cattaaatcc 1200

taa 1203

<210> 22
<211> 975
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 22
atgccgccgc tattcaaggg actgaaaaag gatggtatga caagaggccc agtagtccgt 60

ttcccaactt tgaaaagatc tggtgcctgt aagatatggt tagactcaga agagggacaa 120

aacgcaatta aaaaagcttt taactctaca tcaagatttg cacgtctgca acatattcaa 180

acttgtctag caggagattt actcttcatg agatttagaa caactactgg tgacgcaatg 240

ggtatgaata tgatttctaa gggtgtcgaa tactcattaa agcaaatggt agaagagtat 300

ggctgggaag atatggaggt tgtctccgtt tctggtaact actgtaccga caaaaaacca 360

gctgccatca actggatcga aggtcgtggt aagagtgtcg tcgcagaagc tactattcct 420

ggtgatgttg tcagaaaagt gttaaaaagt gatgtttccg cattggttga gttgaacatt 480

gctaagaatt tggttggatc tgcaatggct gggtctgttg gtggatttaa cgcacgtgca 540

gctaatttag tgacagctgt tttcttggca ttaggacaag atcctgcaca aaatgtcgaa 600

agttccaact gtataacatt gatgaaagaa gtggacggtg atttgagaat ttccgtatcc 660

atgccatcca tcgaagtagg taccatcggt ggtggtactg ttctagaacc acaaggtgcc 720

atgttggact tattaggtgt aagaggccca catgctaccg ctcctggtac caacgcacgt 780

caattagcaa gaatagttgc ctgtgccgtc ttggcaggtg aattatcctt atgtgctgcc 840

ctagcagccg gccatttggt tcaaagtcat atgacccaca acaggaaacc tgctgaacca 900

acaaaaccta acaatttgga cgccactgat ataaatcgtt tgaaagatgg gtccgtcacc 960

tgcattaaat cctaa 975

<210> 23
<211> 992
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 23
ggatcctcta gctccctaac atgtaggtgg cggaggggag atatacaata gaacagatac 60

cagacaagac ataatgggct aaacaagact acaccaatta cactgcctca ttgatggtgg 120

tacataacga actaatactg tagccctaga cttgatagcc atcatcatat cgaagtttca 180

ctacccttt tccatttgcc atctattgaa gtaataatag gcgcatgcaa cttcttttct 240

tttttttct tttctctctc ccccgttgtt gtctcaccat atccgcaatg acaaaaaaat 300

gatggaagac actaaaggaa aaaattaacg acaaagacag caccaacaga tgtcgttgtt 360

ccagagctga tgaggggtat ctcgaagcac acgaaacttt ttccttcctt cattcacgca 420

cactactctc taatgagcaa cggtatacgg ccttccttcc agttacttga atttgaaata 480

aaaaaagttt gctgtcttgc tatcaagtat aaatagacct gcaattatta atcttttgtt 540

tcctcgtcat tgttctcgtt ccctttcttc cttgtttctt tttctgcaca atatttcaag 600

ctataccaag catacaatca actggtaccc gggtcgactc gagctctaga ggttaactaa 660

gcgaatttct tatgatttat gatttttatt attaaataag ttataaaaaa aataagtgta 720

tacaaatttt aaagtgactc ttaggtttta aaacgaaaat tcttattctt gagtaactct 780

ttcctgtagg tcaggttgct ttctcaggta tagcatgagg tcgctcttat tgaccacatc 840

tctaccggca tgccgagcaa atgcctgcaa atcgctcccc atttcaccca attgtagata 900

tgctaactcc agcaatgagt tgatgaatct cggtgtgtat tttatgtcct cagaggacaa 960

cacctgttgt aatcgttctt ccacacggat cc 992

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 24
His Asp Glu Leu
1

<210> 25
<211> 894
<212> DNA
<213> Bacillus stearothermophilus

<400> 25
gtggcgcagc tttcagttga acagtttctc aacgagcaaa aacaggcggt ggaaacagcg 60

ctctcccgtt atatagagcg cttagaaggg ccggcgaagc tgaaaaaggc gatggcgtac 120

tcattggagg ccggcggcaa acgaatccgt ccgttgctgc ttctgtccac cgttcgggcg 180

ctcggcaaag acccggcggt cggattgccc gtcgcctgcg cgattgaaat gatccatacg 240

tactctttga tccatgatga tttgccgagc atggacaacg atgatttgcg gcgcggcaag 300

ccgacgaacc ataaagtgtt cggcgaggcg atggccatct tggcgggggga cgggttgttg 360

acgtacgcgt ttcaattgat caccgaaatc gacgatgagc gcatccctcc ttccgtccgg 420

cttcggctca tcgaacggct ggcgaaagcg gccggtccgg aagggatggt cgccggtcag 480

gcagccgata tggaaggaga ggggaaaacg ctgacgcttt cggagctcga atacattcat 540

cggcataaaa ccgggaaaat gctgcaatac agcgtgcacg ccggcgcctt gatcggcggc 600

gctgatgccc ggcaaacgcg ggagcttgac gaattcgccg cccatctagg ccttgccttt 660

caaattcgcg atgatattct cgatattgaa ggggcagaag aaaaaatcgg caagccggtc 720

ggcagcgacc aaagcaacaa caaagcgacg tatccagcgt tgctgtcgct tgccggcgcg 780

aaggaaaagt tggcgttcca tatcgaggcg gcgcagcgcc atttacggaa cgccgacgtt 840

gacggcgccg cgctcgccta tatttgcgaa ctggtcgccg cccgcgacca ttaa 894

<210> 26

<211> 1197

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 26

atgtctcaga acgtttacat tgtatcgact gccagaaccc caattggttc attccagggt 60

tctctatcct ccaagacagc agtggaattg ggtgctgttg ctttaaaagg cgccttggct 120

aaggttccag aattggatgc atccaaggat tttgacgaaa ttatttttgg taacgttctt 180

tctgccaatt tgggccaagc tccggccaga caagttgctt tggctgccgg tttgagtaat 240

catatcgttg caagcacagt taacaaggtc tgtgcatccg ctatgaaggc aatcattttg 300

ggtgctcaat ccatcaaatg tggtaatgct gatgttgtcg tagctggtgg ttgtgaatct 360

atgactaacg caccatacta catgccagca gcccgtgcgg gtgccaaatt tggccaaact 420

gttcttgttg atggtgtcga aagagatggg ttgaacgatg cgtacgatgg tctagccatg 480

ggtgtacacg cagaaaagtg tgcccgtgat tgggatatta ctagagaaca acaagacaat 540

tttgccatcg aatcctacca aaaatctcaa aaatctcaaa aggaaggtaa attcgacaat 600

gaaattgtac ctgttaccat taagggattt agaggtaagc ctgatactca agtcacgaag 660

gacgaggaac ctgctagatt acacgttgaa aaattgagat ctgcaaggac tgttttccaa 720

aaagaaaacg gtactgttac tgccgctaac gcttctccaa tcaacgatgg tgctgcagcc 780

gtcatcttgg tttccgaaaa agttttgaag gaaaagaatt tgaagccttt ggctattatc 840

aaaggttggg gtgaggccgc tcatcaacca gctgatttta catgggctcc atctcttgca 900

gttccaaagg ctttgaaaca tgctggcatc gaagacatca attctgttga ttactttgaa 960

ttcaatgaag ccttttcggt tgtcggtttg gtgaacacta agattttgaa gctagaccca 1020

tctaaggtta atgtatatgg tggtgctgtt gctctaggtc acccattggg ttgttctggt 1080

gctagagtgg ttgttacact gctatccatc ttacagcaag aaggaggtaa gatcggtgtt 1140

gccgccattt gtaatggtgg tggtggtgct tcctctattg tcattgaaaa gatatga 1197

<210> 27
<211> 1476
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 27
atgaaactct caactaaact ttgttggtgt ggtattaaag gaagacttag gccgcaaaag 60

caacaacaat tacacaatac aaacttgcaa atgactgaac taaaaaaaca aaagaccgct 120

gaacaaaaaa ccagacctca aaatgtcggt attaaaggta tccaaattta catcccaact 180

caatgtgtca accaatctga gctagagaaa tttgatggcg tttctcaagg taaatacaca 240

attggtctgg gccaaaccaa catgtctttt gtcaatgaca gagaagatat ctactcgatg 300

tccctaactg ttttgtctaa gttgatcaag agttacaaca tcgacaccaa caaaattggt 360

agattagaag tcggtactga aactctgatt gacaagtcca agtctgtcaa gtctgtcttg 420

atgcaattgt ttggtgaaaa cactgacgtc gaaggtattg acacgcttaa tgcctgttac 480

ggtggtacca acgcgttgtt caactctttg aactggattg aatctaacgc atgggatggt 540

agagacgcca ttgtagtttg cggtgatatt gccatctacg ataagggtgc cgcaagacca 600

accggtggtg ccggtactgt tgctatgtgg atcggtcctg atgctccaat tgtatttgac 660

tctgtaagag cttcttacat ggaacacgcc tacgattttt acaagccaga tttcaccagc 720

gaatatcctt acgtcgatgg tcatttttca ttaacttgtt acgtcaaggc tcttgatcaa 780

gtttacaaga gttattccaa gaaggctatt tctaaagggt tggttagcga tcccgctggt 840

tcggatgctt tgaacgtttt gaaatatttc gactacaacg ttttccatgt tccaacctgt 900

aaattggtca caaaatcata cggtagatta ctatataacg atttcagagc caatcctcaa 960

ttgttcccag aagttgacgc cgaattagct actcgcgatt atgacgaatc tttaaccgat 1020

aagaacattg aaaaaacttt tgttaatgtt gctaagccat tccacaaaga gagagttgcc 1080

caatctttga ttgttccaac aaacacaggt aacatgtaca ccgcatctgt ttatgccgcc 1140

tttgcatctc tattaaacta tgttggatct gacgacttac aaggcaagcg tgttggttta 1200

ttttcttacg gttccggttt agctgcatct ctatattctt gcaaaattgt tggtgacgtc 1260

caacatatta tcaaggaatt agatattact aacaaattag ccaagagaat caccgaaact 1320

ccaaaggatt acgaagctgc catcgaattg agagaaaatg cccatttgaa gaagaacttc 1380

aaacctcaag gttccattga gcatttgcaa agtggtgttt actacttgac caacatcgat 1440

gacaaattta gaagatctta cgatgttaaa aaataa 1476

<210> 28
<211> 1332
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 28
atgtcattac cgttcttaac ttctgcaccg ggaaaggtta ttatttttgg tgaacactct 60

gctgtgtaca acaagcctgc cgtcgctgct agtgtgtctg cgttgagaac ctacctgcta 120

ataagcgagt catctgcacc agatactatt gaattggact tcccggacat tagctttaat 180

cataagtggt ccatcaatga tttcaatgcc atcaccgagg atcaagtaaa ctcccaaaaa 240

ttggccaagg ctcaacaagc caccgatggc ttgtctcagg aactcgttag tcttttggat 300

ccgttgttag ctcaactatc cgaatccttc cactaccatg cagcgttttg tttcctgtat 360

atgtttgttt gcctatgccc ccatgccaag aatattaagt tttctttaaa gtctacttta 420

cccatcggtg ctgggttggg ctcaagcgcc tctatttctg tatcactggc cttagctatg 480

gcctacttgg gggggttaat aggatctaat gacttggaaa agctgtcaga aaacgataag 540

catatagtga atcaatgggc cttcataggt gaaaagtgta ttcacggtac cccttcagga 600

atagataacg ctgtggccac ttatggtaat gccctgctat ttgaaaaaga ctcacataat 660

ggaacaataa acacaaacaa ttttaagttc ttagatgatt tcccagccat tccaatgatc 720

ctaacctata ctagaattcc aaggtctaca aaagatcttg ttgctcgcgt tcgtgtgttg 780

gtcaccgaga aatttcctga agttatgaag ccaattctag atgccatggg tgaatgtgcc 840

ctacaaggct tagagatcat gactaagtta agtaaatgta aaggcaccga tgacgaggct 900

gtagaaacta ataatgaact gtatgaacaa ctattggaat tgataagaat aaatcatgga 960

ctgcttgtct caatcggtgt ttctcatcct ggattagaac ttattaaaaa tctgagcgat 1020

gatttgagaa ttggctccac aaaacttacc ggtgctggtg gcggcggttg ctctttgact 1080

ttgttacgaa gagacattac tcaagagcaa attgacagct tcaaaaagaa attgcaagat 1140

gattttagtt acgagacatt tgaaacagac ttgggtggga ctggctgctg tttgttaagc 1200

gcaaaaaatt tgaataaaga tcttaaaatc aaatccctag tattccaatt atttgaaaat 1260

aaaactacca caaagcaaca aattgacgat ctattattgc caggaaacac gaatttacca 1320

tggacttcat aa 1332

<210> 29

<211> 1356

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 29

atgtcagagt tgagagcctt cagtgcccca gggaaagcgt tactagctgg tggatattta 60

gttttagata caaaatatga agcatttgta gtcggattat cggcaagaat gcatgctgta 120

gcccatcctt acggttcatt gcaagggtct gataagtttg aagtgcgtgt gaaaagtaaa 180

caatttaaag atggggagtg gctgtaccat ataagtccta aaagtggctt cattcctgtt 240

tcgataggcg gatctaagaa ccctttcatt gaaaaagtta tcgctaacgt atttagctac 300

tttaaaccta acatggacga ctactgcaat agaaacttgt tcgttattga tattttctct 360

gatgatgcct accattctca ggaggatagc gttaccgaac atcgtggcaa cagaagattg 420

agttttcatt cgcacagaat tgaagaagtt cccaaaacag ggctgggctc ctcggcaggt 480

ttagtcacag ttttaactac agctttggcc tccttttttg tatcggacct ggaaaataat 540

gtagacaaat atagagaagt tattcataat ttagcacaag ttgctcattg tcaagctcag 600

ggtaaaattg gaagcgggtt tgatgtagcg gcggcagcat atggatctat cagatataga 660

agattcccac ccgcattaat ctctaatttg ccagatattg gaagtgctac ttacggcagt 720

aaactggcgc atttggttga tgaagaagac tggaatatta cgattaaaag taaccattta 780

ccttcgggat taactttatg gatgggcgat attaagaatg gttcagaaac agtaaaactg 840

gtccagaagg taaaaaattg gtatgattcg catatgccag aaagcttgaa aatatataca 900

gaactcgatc atgcaaattc tagatttatg gatggactat ctaaactaga tcgcttacac 960

gagactcatg acgattacag cgatcagata tttgagtctc ttgagaggaa tgactgtacc 1020

tgtcaaaagt atcctgaaat cacagaagtt agagatgcag ttgccacaat tagacgttcc 1080

tttagaaaaa taactaaaga atctggtgcc gatatcgaac ctcccgtaca aactagctta 1140

ttggatgatt gccagacctt aaaaggagtt cttacttgct taatacctgg tgctggtggt 1200

tatgacgcca ttgcagtgat tactaagcaa gatgttgatc ttagggctca aaccgctaat 1260

gacaaaagat tttctaaggt tcaatggctg gatgtaactc aggctgactg gggtgttagg 1320

aaagaaaaag atccggaaac ttatcttgat aaataa 1356

<210> 30
<211> 1191
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 30

atgaccgttt acacagcatc cgttaccgca cccgtcaaca tcgcaaccct taagtattgg 60

gggaaaaggg acacgaagtt gaatctgccc accaattcgt ccatatcagt gactttatcg 120

caagatgacc tcagaacgtt gacctctgcg gctactgcac ctgagtttga acgcgacact 180

ttgtggttaa atggagaacc acacagcatc gacaatgaaa gaactcaaaa ttgtctgcgc 240

gacctacgcc aattaagaaa ggaaatggaa tcgaaggacg cctcattgcc cacattatct 300

caatggaaac tccacattgt ctccgaaaat aactttccta cagcagctgg tttagcttcc 360

tccgctgctg gctttgctgc attggtctct gcaattgcta agttatacca attaccacag 420

tcaacttcag aaatatctag aatagcaaga aaggggtctg gttcagcttg tagatcgttg 480

tttggcggat acgtggcctg ggaaatggga aaagctgaag atggtcatga ttccatggca 540

gtacaaatcg cagacagctc tgactggcct cagatgaaag cttgtgtcct agttgtcagc 600

gatattaaaa aggatgtgag ttccactcag ggtatgcaat tgaccgtggc aacctccgaa 660

ctatttaaag aaagaattga acatgtcgta ccaaagagat ttgaagtcat gcgtaaagcc 720

attgttgaaa aagatttcgc cacctttgca aaggaaacaa tgatggattc caactctttc 780

catgccacat gtttggactc tttccctcca atattctaca tgaatgacac ttccaagcgt 840

atcatcagtt ggtgccacac cattaatcag ttttacggag aaacaatcgt tgcatacacg 900

tttgatgcag gtccaaatgc tgtgttgtac tacttagctg aaaatgagtc gaaactcttt 960

gcatttatct ataaattgtt tggctctgtt cctggatggg acaagaaatt tactactgag 1020

cagcttgagg ctttcaacca tcaatttgaa tcatctaact ttactgcacg tgaattggat 1080

cttgagttgc aaaaggatgt tgccagagtg attttaactc aagtcggttc aggcccacaa 1140

gaaacaaacg aatctttgat tgacgcaaag actggtctac caaaggaata a 1191

<210> 31
<211> 867
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 31
atgactgccg acaacaatag tatgccccat ggtgcagtat ctagttacgc caaattagtg 60

caaaaccaaa cacctgaaga cattttggaa gagtttcctg aaattattcc attacaacaa 120

agacctaata cccgatctag tgagacgtca aatgacgaaa gcggagaaac atgtttttct 180

ggtcatgatg aggagcaaat taagttaatg aatgaaaatt gtattgtttt ggattgggac 240

gataatgcta ttggtgccgg taccaagaaa gtttgtcatt taatggaaaa tattgaaaag 300

ggtttactac atcgtgcatt ctccgtcttt attttcaatg aacaaggtga attactttta 360

caacaaagag ccactgaaaa aataactttc cctgatcttt ggactaacac atgctgctct 420

catccactat gtattgatga cgaattaggt ttgaagggta agctagacga taagattaag 480

ggcgctatta ctgcggcggt gagaaaacta gatcatgaat taggtattcc agaagatgaa 540

actaagacaa ggggtaagtt tcacttttta aacagaatcc attacatggc accaagcaat 600

gaaccatggg gtgaacatga aattgattac atcctatttt ataagatcaa cgctaaagaa 660

aacttgactg tcaacccaaa cgtcaatgaa gttagagact tcaaatgggt ttcaccaaat 720

gatttgaaaa ctatgtttgc tgacccaagt tacaagttta cgccttggtt taagattatt 780

tgcgagaatt acttattcaa ctggtgggag caattagatg acctttctga agtggaaaat 840

gacaggcaaa ttcatagaat gctataa 867

<210> 32
<211> 549
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 32
atgcaaacgg aacacgtcat tttattgaat gcacagggag ttcccacggg tacgctggaa 60

aagtatgccg cacacacggc agacacccgc ttacatctcg cgttctccag ttggctgttt 120

aatgccaaag gacaattatt agttacccgc cgcgcactga gcaaaaaagc atggcctggc 180

gtgtggacta actcggtttg tgggcaccca caactgggag aaagcaacga agacgcagtg 240

atccgccgtt gccgttatga gcttggcgtg gaaattacgc ctcctgaatc tatctatcct 300

gactttcgct accgcgccac cgatccgagt ggcattgtgg aaaatgaagt gtgtccggta 360

tttgccgcac gcaccactag tgcgttacag atcaatgatg atgaagtgat ggattatcaa 420

tggtgtgatt tagcagatgt attacacggt attgatgcca cgccgtgggc gttcagtccg 480

tggatggtga tgcaggcgac aaatcgcgaa gccagaaaac gattatctgc atttacccag 540

cttaaataa 549

<210> 33
<211> 900
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 33
atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96

```
Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
            20                  25                  30

gtc gaa acc atg cag tat ggc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga   144
Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
        35                  40                  45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc ggc gtt agc aca aac   192
Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
    50                  55                  60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gaa tgc atc cac gct gac tca   240
Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Asp Ser
65                  70                  75                  80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc   288
Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
                85                  90                  95

ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc   336
Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
            100                 105                 110

gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc   384
Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
        115                 120                 125

gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa   432
Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
    130                 135                 140
```

ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480
Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528
Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576
Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624
Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672
Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720
Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768
Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864
Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa taa 900
Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 34
<211> 299
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 34
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Asp Ser
65 70 75 80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
85 90 95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
130 135 140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 35
<211> 900
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 35
atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96
Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

gtc gaa acc atg cag tat ggc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga 144
Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc ggc gtt agc aca aac 192
Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gaa tgc atc cac gct gaa tca 240
Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Glu Ser
65 70 75 80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc 288
Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
85 90 95

ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc 336
Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc 384
Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa 432
Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu

130 135 140

ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480
Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528
Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576
Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624
Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672
Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720
Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768
Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816
Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864
Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa taa 900
Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 36
<211> 299
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 36
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Glu Ser
65 70 75 80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
85 90 95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
130 135 140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 37
<211> 900
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (897)

<400> 37
atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96
Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

gtc gaa acc atg cag tat ggc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga 144
Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc ggc gtt agc aca aac 192
Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gaa tgc atc cac gct atg tca 240
Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Met Ser
65 70 75 80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc 288
Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
85 90 95

ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc 336
Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc 384
Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa 432

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
130 135 140

ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480
Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528
Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576
Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624
Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672
Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
210 215 220

atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720
Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768
Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816
Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864
Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa taa 900
Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 38
<211> 299
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 38
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Met Ser
65 70 75 80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
85 90 95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
115 120 125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
130 135 140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp

210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 39
<211> 894
<212> DNA
<213> Bacillus stearothermophilus

<400> 39
gtggcgcagc tttcagttga acagtttctc aacgagcaaa aacaggcggt ggaaacagcg 60

ctctcccgtt atatagagcg cttagaaggg ccggcgaagc tgaaaaaggc gatggcgtac 120

tcattggagg ccggcggcaa acgaatccgt ccgttgctgc ttctgtccac cgttcgggcg 180

ctcggcaaag acccggcggt cggattgccc gtcgcctgcg cgattgaaat gatccatacg 240

atgtctttga ttcatgatga tttgccgagc atggacaacg atgatttgcg gcgcggcaag 300

ccgacgaacc ataaagtgtt cggcgaggcg atggccatct tggcggggga cgggttgttg 360

acgtacgcgt ttcaattgat caccgaaatc gacgatgagc gcatccctcc ttccgtccgg 420

cttcggctca tcgaacggct ggcgaaagcg gccggtccgg aagggatggt cgccggtcag 480

gcagccgata tggaaggaga ggggaaaacg ctgacgcttt cggagctcga atacattcat 540

cggcataaaa ccgggaaaat gctgcaatac agcgtgcacg ccggcgcctt gatcggcggc 600

gctgatgccc ggcaaacgcg ggagcttgac gaattcgccg cccatctagg ccttgccttt 660

caaattcgcg atgatattct cgatattgaa ggggcagaag aaaaaatcgg caagccggtc 720

ggcagcgacc aaagcaacaa caaagcgacg tatccagcgt tgctgtcgct tgccggcgcg 780

aaggaaaagt tggcgttcca tatcgaggcg gcgcagcgcc atttacggaa cgccgacgtt 840

gacggcgccg cgctcgccta tatttgcgaa ctggtcgccg cccgcgacca ttaa 894

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 40

tgcatctcga gggccgcatc atgtaattag 30

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 41

cattagggcc cggccgcaaa ttaaagcctt cg 32

<210> 42

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 42

cacggagctc cagttcgagt ttatcattat caa 33

<210> 43
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 43
ctctccgcgg tttgtttgtt tatgtgtgtt tattc 35

<210> 44
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 44
ccgcgagctc ttacccataa ggttgtttgt gacg 34

<210> 45
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 45

ctttccgcgg gtttagttaa ttatagttcg ttgacc 36

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 46

atggcttcag aaaaagaaat tag 23

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 47

ctatttgctt ctcttgtaaa ctt 23

<210> 48
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 48
tgaggcatgc aatttccgca gcaactcg 28

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 49
tcagaattca tcaggggcct attaatac 28

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 50

atggaggcca agatagatga gct 23

<210> 51

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 51

tcacaattcg gataagtggt cta 23

<210> 52

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 52

tccccgcgga tgtctcagaa cgtttacatt gt 32

<210> 53
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 53
tgctctagat catatctttt caatgacaat gga 33

<210> 54
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 54
atgaaactct caactaaact ttgtt 25

<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 55

gttcagcaag atgcaatcga tgggg 25

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 56

atgccgccgc tattcaaggg act 23

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 57

ttaggattta atgcaggtga cgg 23

<210> 58
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 58
ccaaataaag actccaacac tctattt 27

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 59
gaattagaag cattattaag tagtgga 27

<210> 60
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 60

ggatttaacg cacatgcagc taattta 27

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 61

gtctgcttgg gttacatttt ctgaaaa 27

<210> 62

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 62

cataccagtt atactgcaga ccaattg 27

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 63
gaatactcat taaagcaaat ggtagaa 27

<210> 64
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 64
aactgcagat gtcattaccg ttcttaactt c 31

<210> 65
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 65

ccgagctctt atgaagtcca tggtaaattc g 31

<210> 66

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 66

aactgcagat gtcattaccg ttcttaactt c 31

<210> 67

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 67

ccgagctctt atgaagtcca tggtaaattc g 31

<210> 68
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 68
aactgcagat gaccgtttac acagcatccg t 31

<210> 69
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 69
cggaattctt attcctttgg tagaccagtc t 31

<210> 70
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 70

atgactgccg acaacaatag tat 23

<210> 71

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 71

ttatagcatt ctatgaattt gcc 23

<210> 72

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 72

tccccgcgga tgcaaacgga acacgtcatt tt 32

<210> 73
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 73
tgctctagat tatttaagct gggtaaatgc aga 33

<210> 74
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 74
atcatgaatt aatgagtcag cgtggatgca ttcaacggcg gcagc 45

<210> 75
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 75

atcatgaatt aatgattcag cgtggatgca ttcaacggcg gcagc 45

<210> 76

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 76

atcatgaatt aatgacatag cgtggatgca ttcaacggcg gcagc 45

<210> 77

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 77

tttcagtccc ttgaatagcg gcggcat 27

<210> 78
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 78
cacaaaatca agattgccca gtatgcc 27

<210> 79
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 79
agaagatacg gatttctttt ctgcttt 27

<210> 80
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 80

aactttggtg caaattgggt caatgat 27

<210> 81

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 81

ttgctcttta aagttttcag aggcatt 27

<210> 82

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 82

gcattattaa gtagtggaaa tacaaaa 27

<210> 83
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 83
cctttgtacg ctttggagaa aaaatta 27

<210> 84
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 84
tctgatcgtt taccatataa aaattat 27

<210> 85
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 85

aaggatggta tgacaagagg cccagta 27

<210> 86

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 86

tttccgcgga aacatg 16

<210> 87

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 87

aattgacggc cgtc 14

<210> 88
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 88
ggccgcaaat taaagccttc gagcgtc 27

<210> 89
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 89
acggattaga agccgccgag cgggtga 27

<210> 90
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 90

gccgttgaca gagggtccga gctcggtacc aag 33

<210> 91

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 91

catactgacc cattgtcaat gggtaataac tgat 34

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 92

tgtccggtaa atggagac 18

<210> 93
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 93
tgttctcgct gctcgttt 18

<210> 94
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 94
atgggaaagc tattacaat 19

<210> 95
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 95

caaggttgca atggccat 18

<210> 96

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 96

caatgtaggg ctatatatg 19

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 97

aacttgggga atggcaca 18

<210> 98
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 98
tctcgaaaaa gggtttgcca t 21

<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 99
tcactaggtg taaagagggc t 21

<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 100

tgttgaagct tgcatgcctg c 21

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 101

ttgtaaaacg acggccagtg a 21

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 102

atggaggcca agatagatga g 21

<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 103
tcacaattcg gataagtggt c 21

<210> 104
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 104
tcctaatgcc aagaaaacag ctgtcac 27

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 105

atggcaaacc ctttttcgag a 21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 106

agccctcttt acacctagtg a 21

<210> 107

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 107

tccccgcgga tggaggccaa gatagat 27

<210> 108
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 108
caactcgagt cacaattcgg ataagtg 27

<210> 109
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 109
gctctagagt tcgtcgtgtt tgcttctctt gtaaactt 38

<210> 110
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 110

tatctcgagt cacaattcgt catgtaaatt gg 32

<210> 111

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 111

gcagggaccc caattcggat aagtggtc 28

<210> 112

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 112

gtagggtccc tggaggccaa gatagatg 28

<210> 113
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 113
gcagggaccc tttgcttctc ttgtaaact 29

<210> 114
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 114
gtagggtcct cagaaaaaga aattaggag 29

<210> 115
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 115

tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 116

taatacgact cactataggg 20

<210> 117

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 117

gctctagagt tcgtcgtgtt tgcttctctt gtaaactt 38

<210> 118

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 118

tatctcgagt cacaattcgt catgtaaatt gg 32

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 119

acggtaagaa atccaagc 18

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 120

tatgagtcgg cacccact 18

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic peptide

<400> 121

Cys Tyr Ile Ile Asp His Leu Ser Glu Leu
1 5 10

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

peptide

<400> 122

Cys Leu Asn Lys Val Tyr Lys Arg Ser Lys
1 5 10

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 123

ttttaagagc ttggtgagcg c 21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 124

tcgagttcaa gagaaaaaaa a 21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 125

ttcaattcat cattttttt t 21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 126

gggtaataac tgatataatt a 21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
DNA

<400> 127

atggattcta gaacagttgg t 21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
DNA

<400> 128

ttacttgttt tctagataag c 21

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 129

atgactaacg aaaaggtctg g 21

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 130

ttaagctgct gcggagcttc c 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/52, C12P7/04, C12N1/19, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/52, C12P7/04, C12N1/19, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/CA(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Anderson M.S. et al., Farnesyl diphosphate synthetase, J.Biol.Chem., 1989, Vol.264, No.32, pages 19176 to 19184	14-23 1-13,24-47
X A	WO, 00/01650, A1 (DCV, Inc. doing business as Bio-Technical Resouces), 30 January, 2000 (30.01.00), & EP 1095002 A1 & AU 9948630 A	14-47 1-13
A	Plochocka D. et al., The role of ERG20 gene (encoding yeast farnesyl diphosphate synthase) mutation in long dolichol formation. Molecular modeling of FPP synthase, Biochimie, 2000 Aug., Vol.82, No.8, pages 733 to 738	1-47
A	Blanchard L. et al., Characterization of a lysine-to- glutamic acid mutation in a conservative sequence of farnesyl diphosphate synthase from Saccharomyces cerevisiae, Gene, 1993, Vol.125, No.2, pages 185 to 189	1-47

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 April, 2002 (08.04.02)	16 April, 2002 (16.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11214

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chabon C. et al., Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase, Curr.Genet., 1990, Vol.18, pages 41 to 46	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11214

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The matter common to the inventions as set forth in claims 1 and 14 resides in enzymes relating to the synthesis of prenyl diphosphate.

However these enzymes had been already known and thus the above-described common matter cannot be considered as a special technical feature in the meaning as defined in the second sentence of PCT Rule 13.2, i.e., technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The matter common to the inventions as set forth in claims 1 and 24 resides in producing prenyl alcohol by using organisms.

As Curr. Genet., 1990, Vol.18, p.41-46 shows, however, it had been already known to obtain farnesol, which is one of prenyl alcohols, by culturing a squalene synthase gene-deficient strain. Thus the above-described common matter cannot be considered as a special technical feature in the meaning as defined in the second sentence of PCT Rule 13.2, i.e., technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between the inventions as set forth in claims 1, 14 and 24 and thus the requirement of unity of invention is not satisfied.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／１１２１４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7] C12N15/52, C12P7/04, C12N1/19, C12N1/21

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7] C12N15/52, C12P7/04, C12N1/19, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/CA(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X A	Anderson M.S.et al., Farnesyl diphosphate synthetase, J.Biol.Chem., 1989, Vol.264, No.32, p.19176-19184	14-23 1-13,24-47
X A	WO 00/01650 A1 (DCV,INC. doing business as BIO-TECHNICAL RESOUCES) 2000.01.30 & EP 1095002 A1 & AU 9948630 A	14-47 1-13
A	Plochocka D.et al., The role of ERG20 gene (encoding yeast farnesyl diphosphate synthase) mutation in long dolichol formation. Molecular modeling of FPP synthase, Biochimie, 2000 Aug., Vol.82, No.8, p.733-738	1-47

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０８．０４．０２	16.04.02

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	深草　亜子	４Ｂ　９５４８
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８	

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Blanchard L. et al., Characterization of a lysine-to-glutamic acid mutation in a conservative sequence of farnesyl diphosphate synthase from Saccharomyces cerevisiae, Gene, 1993, Vol. 125, No. 2, p. 185-189	1-47
A	Chabon C. et al., Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase, Curr. Genet., 1990, Vol. 18, p. 41-46	1-47

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／１１２１４

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項１、１４に係るそれぞれの発明に共通の事項は、プレニル二リン酸合成に関連する酵素である。
しかし、これらの酵素は既に知られているから、上記共通の事項はＰＣＴ規則１３．２の第２文の意味において、特別な技術的特徴、すなわち各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴でない。

請求項１、２４に係るそれぞれの発明に共通の事項は、生物を用いてプレニルアルコールを製造することである。

（特別ページに続く）

1．☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

しかし、Curr.Genet.,1990, Vol.18, p.41-46にも記載されているように、スクアレン合成酵素遺伝子欠損株を培養して、プレニルアルコールの１つであるファルネソールを得ることが、既に知られているから、上記共通の事項はＰＣＴ規則１３．２の第２文の意味において、特別な技術的特徴、すなわち各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴でない。

したがって、請求項１、１４、２４に係るそれぞれの発明の間にＰＣＴ規則１３．２の意味における技術的な関係はなく、発明の単一性の要件は満たされていない。