【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成16年11月18日(2004.11.18)

【公開番号】特開2000-32988(P2000-32988A)
【公開日】平成12年2月2日(2000.2.2)
【出願番号】特願平10-203200
【国際特許分類第７版】
　Ｃ１２Ｎ　15/09
　Ｃ１２Ｎ　 1/21
　Ｃ１２Ｎ　 9/04
　Ｃ１２Ｐ　17/06
//(Ｃ１２Ｎ　15/09
　Ｃ１２Ｒ　 1:01　)
 (Ｃ１２Ｎ　 1/21
　Ｃ１２Ｒ　 1:19　)
 (Ｃ１２Ｎ　 9/04
　Ｃ１２Ｒ　 1:19　)
 (Ｃ１２Ｐ　17/06
　Ｃ１２Ｒ　 1:19　)
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
　Ｃ１２Ｎ　 1/21
　Ｃ１２Ｎ　 9/04　Ｚ
　Ｃ１２Ｐ　17/06
　Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
　Ｃ１２Ｒ　 1:01
　Ｃ１２Ｎ　 1/21
　Ｃ１２Ｒ　 1:19
　Ｃ１２Ｎ　 9/04
　Ｃ１２Ｒ　 1:19
　Ｃ１２Ｐ　17/06
　Ｃ１２Ｒ　 1:19

【手続補正書】
【提出日】平成15年11月28日(2003.11.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１又は３で示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ。
【請求項２】
配列番号１又は３で示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコ

ードする遺伝子。
【請求項３】
配列番号２又は４で示される塩基配列又は当該塩基配列の１若しくは２以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、又はこれらに相補的な塩基配列を有するものである請求項２記載の遺伝子。
【請求項４】
請求項２又は３記載の遺伝子を含有する組換えベクター。
【請求項５】
請求項２又は３記載の遺伝子を保有する形質転換体細胞。
【請求項６】
請求項５記載の形質転換体細胞を培養し、該培養物からα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする該酵素の製造法。
【請求項７】
α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドの存在下に、請求項５記載の形質転換体細胞を培養することを特徴とする２－ピロン－４，６－ジカルボン酸の製造法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００６】
すなわち、本発明は配列番号１又は３で示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列の１若しくは２以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するα－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒド　デヒドロゲナーゼ、その遺伝子、当該遺伝子を含有する組換えベクター及び当該遺伝子を保有する形質転換体細胞を提供するものである。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１０】
本発明のＤＮＡ供与体としては、α－ヒドロキシ－γ－カルボキシムコン酸－ε－セミアルデヒドを２－ピロン－４，６－ジカルボン酸に変換する能力を有する微生物であれば特に制限されない。例えば、スフィンゴモナス属の微生物等が挙げられるが、特にスフィンゴモナス エスピーCR-0300100株やその変異株であるスフィンゴモナス エスピーCR-0310201株(FERM BP-6748)が好ましい。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３７】
参考例４
（１）前実験で得られたプラスミドｐＰＸ１５２を制限酵素ＸｂａＩで消化し、１％アガロース電気泳動にて分離し、２．３ｋｂｐの断片を切り出した。次に凍結融解法によりＤＮＡを抽出し、十分にフェノール抽出を行いエタノール沈殿により精製した。
（２）スフィンゴモナス エスピー ＣＲ－０３００１００株をＬＢ液体培地（ナリジキシ

ン酸２５mg／Ｌを含む）５００mlで２８℃、２３時間培養し氷中で１５分冷却した。
（３）４℃、１０分、１００００rpm で遠心集菌し、５００mlの０℃蒸留水で穏和に洗浄後再び、遠心集菌した。続いて２５０mlの０℃蒸留水で穏和に洗浄後、遠心集菌した。更に、１２５mlの０℃蒸留水で穏和に洗浄後、遠心集菌した。
（４）上記の菌体を１０％グリセロールを含む蒸留水に懸濁し０℃にて保持した。
（５）（１）のＤＮＡ約０．０５μｇを含む蒸留水４μｌを０．２cmのキュベットに入れ、（４）のコンピテントセル４０μｌを加え、（２５μＦ、２５００Ｖ、１２msec）の条件でエレクトロポレーションにかけた。
（６）上記処理した細胞全量を１０mlのＬＢ液体培地に接種し、３０℃で６時間培養した。培養後、遠心によって菌体を集め２５mg／Ｌのカナマイシンを含むＬＢ平板に展開し、３０℃で４８時間培養した。
（７）上記の条件で非常に強いカナマイシン耐性株、１株を得た。本菌株をスフィンゴモナス エスピー ＣＲ－０３１０２０１株と名付けた。
（８）スフィンゴモナス エスピー ＣＲ－０３１０２０１株及びＣＲ－０３００１００株をＬＢ培地１０mlで２４時間培養し、集菌した。菌体を５０mMのリン酸緩衝液１mlに懸濁し、超音波破砕機を用いて細胞を破砕した。これを５０００ｇで２０分間遠心して得られた上清１００μｌを０．２mMの３，４－ジヒドロキシ安息香酸を含むリン酸緩衝液１mlに添加した。５分間、３０℃でインキュベーションした後に、２Ｍの水酸化ナトリウムを０．１ml添加したところ、ＣＲ－０３００１００株では黄色の発色が見られたが、ＣＲ－０３１０２０１株では黄色の発色が全く見られなかった。ＣＲ－０３１０２０１株は上述の性質及びカナマイシンに耐性及びバリニン酸の資化性が欠損したことを除きＣＲ－０３００１００株と全く同一の菌学的性質を示した。本菌株は、通商産業省工業技術院生命工学工業研究所にＦＥＲＭ ＢＰ－６７４８として寄託した。