



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1806042 B

(45) 授权公告日 2012.07.04

(21) 申请号 200480016384.0

C12N 9/12 (2006.01)

(22) 申请日 2004.06.10

C12N 15/54 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12P 7/02 (2006.01)

03012294.9 2003.06.12 EP

C12P 17/06 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2005.12.12

US 6284506 B1, 2001.09.04, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

WO 02099095 A3, 2002.12.12, 全文.

PCT/CH2004/000353 2004.06.10

HUMBELIN M ET AL..Genetics

(87) PCT申请的公布数据

of isoprenoid biosynthesis in

WO2004/111214 EN 2004.12.23

Paracoccuszeaxanthinifaciens. GENE: AN

INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND

(73) 专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
司

GENOMES297 1-2. 2002, 297(1-2), 129-139.

审查员 于娜

地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 白仁羽楠 马卡斯·哈波林

马丁·莱玛恩

如尔·罗帕斯-乌里巴瑞

马卡斯·维斯

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 4 页

(54) 发明名称

具有反馈抗性的甲羟戊酸激酶

(57) 摘要

本发明涉及经过修饰的甲羟戊酸激酶,其对于反馈抑制具有更小的敏感度,还涉及能编码它们的多核苷酸。本发明还涉及包含这些多核苷酸的载体以及包含这些载体的宿主细胞。本发明提供了一种用于生产经修饰的酶的方法以及用于生产类异戊二烯化合物的方法。

1. 一种经过修饰的甲羟戊酸激酶,其展示出的对反馈抑制的敏感性较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶要低,其中

较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列含有下述突变,所述突变是相应于如 SEQ ID NO:1 所示的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列上的

I17T、G47D、K93E、V94I、R204H、C266S、P132A/P375R、R167W/K169Q 或 I17T/G47D。

2. 如权利要求 1 所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶用于检测生物流体中甲羟戊酸浓度的用途。

3. 如权利要求 1 所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶用于提高类异戊二烯化合物生产的用途。

具有反馈抗性的甲羟戊酸激酶

[0001] 本发明提供了经过修饰的甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase), 其对于反馈抑制具有更小的敏感度。该经过修饰的酶和编码该酶的多核苷酸可被用于生产类异戊二烯 (isoprenoid) 化合物, 用于治疗具有甲羟戊酸激酶活性降低的特征的疾病, 以及用于诊断用途。

[0002] 甲羟戊酸激酶 (MK) 是甲羟戊酸途径中必需的酶, 所述途径导致了大量细胞内类异戊二烯的产生。类异戊二烯途径的产物异戊烯二磷酸 (IPP), 以及同质异构化合物, 二甲基烯丙基二磷酸 (DAMPP) 是所有生物中类异戊二烯的基本构建物质。类异戊二烯包括超过 23000 种天然存在的初级和次级代谢物分子。该类天然产物的化学多样性反映了它们在生物系统中多种多样的生理作用。类异戊二烯包括, 例如细菌中的植烷三萜、泛醌和甲基萘醌, 植物中的类胡萝卜素、质体醌、单 / 一个半 / 双 / 三萜以及叶绿素的含异戊二烯基侧链, 和哺乳动物中的血红素 A、醌、多萜醇、固醇 / 类固醇和类维生素 A。此外, 类异戊二烯还涉及异戊烯 tRNA、蛋白质异戊烯化以及胆固醇修饰, 例如对刺猬类细胞信号蛋白质进行的。

[0003] 人们已在多种生物中于生物化学及分子水平上对 MK 酶进行了分析 (Houten et al., Biochim. Biophys. Acta 1529, 19-32, 2000)。目前, 很多甲羟戊酸激酶的 DNA 和氨基酸序列都是已知的 (例如, Swiss-Prot 编号 / IDs P07277/kime_yeast; Q9R008/kime_mouse; P17256/kime_rat; Q03426/kime_human; P46086/kime_arath; Q09780/kime_schpo; Q9V187/kime_pyra; 059291/kime_pyrho; Q8U0F3/kime_pyrfu; Q50559/kime_metth; 027995/kime_arclu; Q58487/kime_metja; Q9Y946/kime_aerpe), 并且, 每个月还会有一些序列被增加到已知甲羟戊酸激酶序列的列表中。基于其与已知甲羟戊酸激酶序列的相似性, 上述从基因组测序计划中获得的序列已被赋予了假定的甲羟戊酸激酶功能。但是, 对本领域的技术人员而言, 很容易证明这些序列事实上能编码具有甲羟戊酸激酶活性的蛋白质。

[0004] 在调控的方面, 人们普遍认为 HMG-CoA 还原酶是甲羟戊酸途径中的速度决定酶 (例如, Goldstein and Brown, Nature 343, 425-430, 1990; Weinberger, Trends Endocrinol. Metab. 7, 1-6, 1996; Hampton et al., Trends Biochem. Sci. 21, 140-145, 1996; Houten et al., J. Biol. Chem. 278, 5736-5743, 2003)。与该观点一致的是, 向培养基中添加甲羟戊酸已显示出能激活 *Phaffia rhodozyma* (Calo et al., Biotechnol. Lett. 17, 575-578, 1995) 和 *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi et al., J. Ferment. Bioeng. 71, 335-339, 1991) 中的类胡萝卜素生产。但是, 近年来更多的证据显示, 甲羟戊酸激酶会受到反馈抑制, 例如下游产物, 牻牛基二磷酸 (geranyldiphosphate)、法呢基二磷酸 (farnesyldiphosphate)、双牻牛基二磷酸 (geranylgeranyldiphosphate) 所造成的。这种反馈抑制还可在对甲羟戊酸途径的调控和速度限制中发挥作用, 因此, 通常对类异戊二烯的生物合成的调控和速度限制发挥作用。

[0005] 在人类中, 甲羟戊酸激酶的缺乏被鉴定为下述人类遗传疾病的生物化学和分子诱因, 从而显示出其重要性, 所述疾病包括甲羟戊酸尿症、超免疫球蛋白 D 症以及周期性发热综合征 (Houten et al., 2000; Nwokoro et al., Mol. Genet. metab. 74, 105-119, 2001)。上

述疾病的病理尚属未知,但最终将发现其与甲羟戊酸激酶在体内的作用以及与急相反应和发热有关的类异戊二烯生物合成有关。甲羟戊酸激酶缺乏看上去还与(例如)Zellweger综合征和肢近端型点状软骨发育不良(rhizomelic chondrodysplasia punctata)有关,这是过氧化物酶生物合成紊乱的疾病,其中,一组过氧化物酶,包括甲羟戊酸激酶,不能被转运到过氧化物酶体中(Kelley and Herman, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2, 299-341, 2001)。最后,甲羟戊酸激酶被认为在细胞内增殖、细胞周期调控和/或细胞内转化中发挥作用(见Graef et al., *virology* 208, 696-703, 1995; Hinson et al., *J. Biol. Chem.* 272, 26756-26760, 1997)。

[0006] 目前研究的所有甲羟戊酸激酶都会受所述途径下游产物的反馈抑制。目前还没有报道过对反馈抑制具有抗性的甲羟戊酸激酶,例如,法呢基二磷酸或双牻牛基二磷酸造成的反馈抑制。对反馈具有抗性的甲羟戊酸激酶可能具有工业潜力,例如(1)在用生物技术对所有类型的类异戊二烯化合物(例如,类胡萝卜素、辅酶 Q10、维生素 D、固醇等)进行的生产中,(2)作为具有诊断用处的酶,用于,例如,用酶测量生物流体中的甲羟戊酸浓度,或(3)作为治疗用酶,用于降低甲羟戊酸尿症病患的甲羟戊酸浓度。对反馈具有抗性的 MK 特别适于对类异戊二烯进行生物技术途径的生产,因为它们能使得甲羟戊酸途径具有更大的通量,因此使得类异戊二烯产量更高。

[0007] 本文中使用的术语“甲羟戊酸激酶”将表示任何能够催化甲羟戊酸酯(甲羟戊酸)磷酸化反应的酶,所述反应包括甲羟戊酸酯(甲羟戊酸)向 5-磷酸甲羟戊酸酯(5-磷酸甲羟戊酸)的转化,或甲羟戊酸类似物(例如, Wilde and Eggerer, *Eur. J. Biochem.* 221, 463-473, 1994 所述的)向其相应的磷酸化化合物的转化。为提供对甲羟戊酸(或甲羟戊酸类似物)的磷酸化,该酶额外需要合适的磷酸供体。不同的化合物都可作为用于甲羟戊酸激酶的磷酸供体。最优选的磷酸供体是 ATP(5'-三磷酸腺苷)。其它优选的磷酸供体是 TTP、ITP、GTP、UTP 或 CTP(见 Gibson et al., *Enzyme* 41, 47-55, 1989)。“甲羟戊酸激酶”可以是与 SEQ ID NO:1 至 14 所示的氨基酸序列中的一种或多种同源的。“同源的”指与 SEQ ID NO:1 至 14 和 30 所示的氨基酸序列中的一种或多种至少约 60% 相同,优选至少 70% 相同,更优选至少约 80% 相同,进一步更优选至少约 90% 相同,最优选至少约 95% 相同。

[0008] 本领域已知的术语“% 相同”表示多肽或多核苷酸序列间的相关程度,这可以通过对上述序列排列起来达成的匹配程度进行测定得到的。用已知的方法可对“相同性”很容易的进行测定,例如用程序 GAP(GCG Wisconsin Package, version 10.2, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA)来进行,其中使用如下参数:缺口产生罚分 8,缺口延伸罚分 2(缺省参数)。

[0009] “野生型酶”或“野生型甲羟戊酸激酶”将表示与 SEQ ID NO:1-14 和 30 中的任何一种同源的、并且可作为起点来设计根据本发明的对反馈具有(更多)抗性的突变体的任何甲羟戊酸激酶。实际上,该定义暗示,此种“野生型酶”或“野生型甲羟戊酸激酶”对甲羟戊酸途径下游产物(例如 FPP 或 GGPP)的生理上或工业上相关的浓度的抑制敏感。本发明上下文中,“野生型”不是将本发明的范围限制为仅可从自然界获得的甲羟戊酸激酶/甲羟戊酸激酶序列。在此明确声明,如果通过本发明的任何教导,合成的甲羟戊酸激酶的变异体(只要它们与 SEQ ID NO:1 至 14 和 30 中的任何一种同源)也可被加工为具有(更多)反馈抗性的,所述合成的甲羟戊酸激酶的变异体也被称为“野生型”。术语“野生型甲羟戊酸

激酶”和“未经修饰的甲羟戊酸激酶”在本文中可互换使用。

[0010] “突变体”、“突变体酶”或“突变体甲羟戊酸激酶”将表示下述变异体中的任何一种：所述变异体是根据本发明的教导从给定的野生型酶 / 甲羟戊酸激酶（根据上述定义）中获得的，并且，较之分别相应的野生型酶，具有（更多）对反馈的抗性。就本发明的范围而言，怎样获得突变体是没有影响的；上述突变体可以通过下述方法获得，例如，通过定点诱变、饱和诱变、随机诱变 / 直接进化、对整个细胞或生物的化学或 UV 诱变等。这些突变体还可通过下述途径来制备，例如，通过设计合成基因，和 / 或体外（无细胞）翻译（见，例如，Jermutus et al., Curr. Opin. Biotechnol. 9, 534-548, 1998; Betton, Curr. Prot. Pept. Sci. 4, 73-80, 2003; Martin et al., Biotechniques 31, 948-, 2001）。为测定反馈抗性，用本领域技术人员已知的方法来制造突变体（例如，通过定点诱变或设计合成基因）。

[0011] 本专利申请文件上下文中的“类异戊二烯”将包括：通过自然或非自然途径（即，自然界中不发生，但可以通过生物技术方法来进行），优选通过生物化学途径，可从甲羟戊酸获得的任何或全部代谢产物以及异戊烯基大分子。类异戊二烯包括但不限于：细菌中的植烷三萜、泛醌和甲基萘醌，植物中的类胡萝卜素、质体醌、单 / 一个半 / 双 / 三萜以及叶绿素的异戊二烯基侧链，和血红素 A、醌、辅酶 Q10、多萜醇、固醇 / 类固醇、维生素 D、类维生素 A 等。

[0012] 一般而言，本发明的目的是提供已被修饰过的甲羟戊酸激酶，该修饰使得其催化性质较之未经修饰的甲羟戊酸激酶更为有用（即，对反馈抑制的敏感性更低）。

[0013] 本发明涉及经过修饰的甲羟戊酸激酶，其展示出的对反馈抑制的敏感性较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶要低，其中

[0014] (i) 与相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列相比较，经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列含有至少一处突变，并且

[0015] (ii) 所述至少一处突变发生于选自如下氨基酸位置所构成的组中的氨基酸位置中的一处或多处，所述氨基酸位置相应于如 SEQ ID NO:1 所示的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列上的 17、47、93、94、132、167、169、204 和 266 位。

[0016] 本文中使用的“反馈抑制”表示，类异戊二烯生物合成中甲羟戊酸的下游代谢产物对甲羟戊酸激酶的酶活造成的抑制。类异戊二烯生物合成中甲羟戊酸的下游代谢产物包括但不限于：5-磷酸甲羟戊酸、异戊烯二磷酸 (IPP)、3,3-二甲基烯丙基二磷酸 (DAMPP)、牻牛基二磷酸 (GPP)、法呢基二磷酸 (FPP)、双牻牛基二磷酸 (GGPP)、法呢醇、磷酸多萜醇和植基焦磷酸 (Dorsey and Proter, J. Biol. chem. 243, 4667-4670, 1968; Flint, Biochem. J. 120, 145-150, 1970; Gray and Kekwick, Biochim. Biophys. Acta 279, 290-296, 1972; Hinson et al., J. Lipid Res. 38, 2216-2223, 1997)。人们相信对甲羟戊酸激酶的反馈抑制基于对甲羟戊酸激酶进行的变构调节，所述调节通过该酶与类异戊二烯生物合成中甲羟戊酸下游的代谢产物的结合来进行。

[0017] 优选地，所述反馈抑制由法呢基二磷酸 (FPP) 或双牻牛基二磷酸 (GGPP) 造成。

[0018] 根据本发明，经过修饰的甲羟戊酸激酶展示出较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶要低的对反馈抑制的敏感性。优选地，本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶对反馈抑制的敏感性，较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶要低至少 5%（关于对反馈抗性的测量和定

量见下文)。

[0019] 反馈抗性将表示,对“反馈抑制”(如上文定义)的抗性的任何增加。可通过本领域技术人员已知的不同方法对反馈抗性进行分析。在此对一种合适的方法进行简短描述:用与实施例 2 中所述的活性试验类似的方法,测量甲羟戊酸激酶活性,其中在甲羟戊酸(或甲羟戊酸类似物)和 ATP(或另外的磷酸供体)的非饱和浓度下进行,即,甲羟戊酸(或甲羟戊酸类似物)和 ATP(或另外的磷酸供体)的浓度大约是使得反应速率对上述底物浓度的改变敏感的浓度,例如,在对上述底物进行的研究中,浓度大约为酶的分别的 K_m 值。在其它条件相同情况下,存在及不存在相应浓度的反馈抑制剂(即,反馈抑制剂的浓度能提供对野生型甲羟戊酸激酶的显著抑制)的情况下,对野生型甲羟戊酸激酶和该酶的变异体/突变体的活性进行测量。如果反馈抑制剂造成的抑制的程度(例如,%抑制)在突变体中较之野生型的酶有所降低,那么该突变体在本专利申请文件的上下文中就是“对反馈抑制具有抗性的”。鉴定出“对反馈抑制具有抗性的”的变异体/突变体之后,再用与上文所述相同的方法来鉴定进一步改善的突变体,即,就具有更多反馈抗性的突变体。按照如下方法来计算反馈抗性(%):如果 a 和 b 分别是不存在或存在反馈抑制剂(例如 FPP)的情况下测得的野生型酶的甲羟戊酸激酶活性,如果 c 和 d 是分别是不存在或存在相同的反馈抑制剂的情况下测得的突变体酶的甲羟戊酸激酶活性,那么 % 反馈抗性就是:

[0020] $\% \text{抗性} = 100((d/c) - (b/a)) / (1 - (b/a))$

[0021] 优选地,反馈抗性进行于本申请中实施例 2 中所述的实验条件下。大约 3-30mU/ml(相应于大约 1-10 $\mu\text{g/ml}$ *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶),优选为大约 10-20mU/ml 的甲羟戊酸激酶活性,以及可选地,46 μM FPP 存在于试验混合物中,反应在 30°C 下进行。

[0022] 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶展示出的反馈抗性为至少 5%,优选为至少大约 10%,更优选为至少大约 25%,进一步更优选为至少大约 40%,进一步更优选为至少大约 60%,最优选为至少大约 70%。

[0023] 较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列含有至少一种突变。该突变可以是添加、缺失和/或取代。优选地,该突变是氨基酸取代,其中,本发明的经过修饰的氨基酸序列中,未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列中存在的给定氨基酸被另外的氨基酸所取代。较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,经过修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列可以含有至少一处氨基酸取代。在其它实施方式中,较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有至少两处、至少三处、至少四处或至少五处氨基酸取代。在本发明的另外的实施方式中,较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有一至十处、一至七处、一至五处、一至四处、二至十处、二至七处、二至五处、二至四处、三至十处、三至七处、三至五处或三至四处氨基酸取代。

[0024] 一种或多种突变可以发生于选自由如下氨基酸位置所构成的组的氨基酸位置中的一处或多处,所述氨基酸位置相应于如 SEQ ID NO:1 所示的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列上的 17、47、93、94、132、167、169、204 和 266 位。

[0025] 优选地,所述至少一处突变发生于选自由如下氨基酸位置所构成的组氨基

酸位置中的一处或多处,所述氨基酸位置相应于如 SEQ ID NO:1 所示的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列上的 17、47、93、94、132、167 和 266 位。在另一种优选的实施方式中,所述至少一处突变发生于选自如下氨基酸位置所构成的组氨基酸位置中的一处或多处,所述氨基酸位置相应于如 SEQ ID NO:1 所示的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列上的 17、47、93、94、132、167 和 169 位。

[0026] 如果经过修饰的甲羟戊酸激酶较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,仅含有单个氨基酸的取代,那么优选地,该单个氨基酸的取代发生于选自相应于 SEQ ID NO:1 的 17、47、93、94、204 和 266 位氨基酸的位置所构成的组中的位置。更优选地,该取代是 I17T、G47D、K93E、V94I、R204H 或 C266S。

[0027] 在一种特别优选的实施方式中,突变是对相应于 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列的第 17 位氨基酸的氨基酸位置产生影响的取代。存在于未经修饰的甲羟戊酸激酶中的氨基酸优选是异亮氨酸。未经修饰的甲羟戊酸激酶序列中的氨基酸可被转变为苏氨酸或丙氨酸。最优选地,对相应于 SEQ ID NO:1 所示的序列的第 17 位的氨基酸位置进行的取代是苏氨酸对异亮氨酸的取代。

[0028] 如果较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有至少两处突变,那么其中一处突变可发生于相应于 SEQ ID NO:1 的 375 位的氨基酸位置。如果较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有两处突变,那么优选地,氨基酸取代发生于相应于 SEQ ID NO:1 的 132/375 位、167/169 位、17/47 位或 17/93 位的组合。最优选的是 P132A/P375R、R167W/K169Q、I17T/G47D 或 I17T/K93E 的组合。

[0029] 如果较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有三处突变,优选地,氨基酸取代发生于相应于 SEQ ID NO:1 的 17/167/169 位、17/132/375 位、92/132/375 位或 17/47/93 位组合的位置。最优选的是 I17T/R167W/K169Q、I17T/P132A/P375R、K93E/P132A/P375R、I17T/R167W/K169H、I17T/R167T/K169M、I17T/R167T/K169Y、I17T/R167F/K169Q、I17T/R167I/K169N、I17T/R167H/K169Y、I17T/G47D/K93E 或 I17T/G47D/K93Q 的组合。

[0030] 如果较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶,经过修饰的甲羟戊酸激酶含有四处突变,优选地,氨基酸取代发生于相应于 SEQ ID NO:1 的 17/47/93/132 位组合的位置。最优选的是 I17T/G47D/K93E/P132A 或 I17T/G47D/K93E/P132S 的组合。

[0031] 最优选的是表 1、2、3 或 4(见下文)中公开的突变的组合。这些例子中指出的氨基酸位置可转至不同来源的甲羟戊酸激酶中。

[0032] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶可通过将突变引入到相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶中来获得。未经修饰的甲羟戊酸激酶可以是任何展示出对反馈抑制的敏感性的甲羟戊酸激酶。未经修饰的甲羟戊酸激酶包括但不限于可从自然界获得的甲羟戊酸激酶。未经修饰的甲羟戊酸激酶还包括与 SEQ ID NO:1 至 14 和 30 中所示的氨基酸序列中的任何一种同源的甲羟戊酸激酶。

[0033] 优选的未经修饰的甲羟戊酸激酶包括下述激酶,所述激酶具有选自如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、

SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列所构成的组的序列。

[0034] 未经修饰的甲羟戊酸激酶可以是真核的或原核来源的,优选是真菌或细菌来源的,更优选是 *Aspergillus* 或 *Saccharomyces* 或 *Paracoccus* 或 *Phaffia* 来源的,最优选是 *Aspergillus niger* 或 *Saccharomyces cerevisiae* 或 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 或 *Phaffia rhodozyma* 来源的。在一种实施方式中,未经修饰的甲羟戊酸激酶是原核来源的,优选是细菌来源的,更优选是 *Paracoccus* 来源的,最优选是 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 来源的。

[0035] 优选地,按照实施例 2 中所述的试验进行测量时 (0 或 46 μ MFPP),未经修饰的甲羟戊酸激酶受到的 FPP 造成的反馈抑制为至少 10%,更优选为至少 20%,进一步更优选为至少 30%,进一步更优选为至少 40%,最优选为至少 50%。

[0036] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶可以包含外源氨基酸,优选是在其 N- 或 C- 末端处。“外源氨基酸”指在天然 (自然界中存在的) 甲羟戊酸激酶中不存在的氨基酸,优选是天然甲羟戊酸激酶中不存在的至少大约 3 个、至少大约 5 个或至少大约 7 个相邻氨基酸的片断。优选的外源氨基酸的片断包括但不限于能促进重组产生的经过修饰的甲羟戊酸激酶的纯化的“标签”。此类标签的例子包括但不限于“His₆”标签、FLAG 标签、myc 标签等。

[0037] 在另一种实施方式中,较之相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列,经过修饰的甲羟戊酸激酶可以含有一处或多处,例如两处缺失。优选地,所述缺失影响相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的 N- 或 C- 末端的氨基酸,而不会显著减少其功能特性,例如酶的比活性。

[0038] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶通常是自然界不存在的甲羟戊酸激酶。优选地,经过修饰的甲羟戊酸激酶的比活性为相应的未经修饰的甲羟戊酸激酶的比活性的至少 10%,更优选为至少 20%,进一步更优选为至少 35%,进一步更优选为至少 50%,最优选为至少 75%。

[0039] 本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶可以是经过分离的多肽。本文中使用的术语“经过分离的多肽”指充分去除了其它多肽的多肽。优选地,经过分离的多肽超过 80% 纯,优选超过 90% 纯,更优选超过 95% 纯,最优选超过 99% 纯。纯度可按照本领域已知的方法来测定,例如通过 SDS-PAGE 及随后的蛋白质染色来测定。然后通过密度测定对蛋白质条带进行定量。其它用于测定纯度的方法也在普通技术的水平范围内。

[0040] 本发明还涉及包含下述核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码根据本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶。本文中使用的“多核苷酸”指多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未经修饰的 RNA 或 DNA 或经过修饰的 RNA 或 DNA。多核苷酸包括但不限于单链或双链 DNA、作为单链或双链区域混合物的 DNA、单链或双链 RNA、作为单链或双链区域混合物的 RNA、包含 DNA 和 RNA 的杂交分子 (其可以是单链的,或者更为典型地,是双链的或单链或双链区域的混合物)。术语“多核苷酸”包括包含一种或多种不常用碱基 (例如次黄嘌呤核甙) 或一种或多种经过修饰的碱基 (例如经过三苯甲基化的碱基) 的 DNA 或 RNA。

[0041] 本发明的多核苷酸可以通过对编码未经修饰的甲羟戊酸激酶的多核苷酸序列进行修饰得到。此类编码未经修饰的甲羟戊酸激酶的多核苷酸序列的例子如 SEQ ID NO:16 至 29 和 31 所示。将突变 (例如添加、缺失和 / 或取代) 引入到编码未经修饰的甲羟戊酸激酶的核苷酸序列中的方法包括但不限于:定点诱变和基于 PCR 的方法。

[0042] 聚合酶链式反应 (PCR) 方法的原理如 (例如) White et al., Trends Genet. 5, 185-189, 1989 所述, 改进方法在, 例如 Innis et al. [PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. (1990)] 中有所描述。

[0043] 可从本领域已知的编码甲羟戊酸激酶的基因组序列或 cDNA 序列开始, 用体外诱变方法 (见, 例如 Sambrook et al., Molecular Cloning, ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York) 来构建本发明的 DNA 序列【序列信息见, 例如, 相关的序列数据库, 例如 Genbank (Intelligenetics, California, USA)、European Bioinformatics Institute (Hinxton Hall, Cambridge, GB)、NBRF (Georgetown University, Medical Centre, Washington DC, USA) 和 Vecbase (University of Wisconsin, Biotechnology Centre, Madison, Wisconsin, USA) 或附图和序列表中公布的序列信息】。广泛用于此类“定点诱变”的策略最初由 Hutchison 和 Edgell (J. Virol. 8, 181-189, 1971) 所提出, 其包括: 将带有目标核苷酸取代的合成寡核苷酸退火到其中将被引入突变的单链 DNA 序列的目标区域 (参见 Smith, Annu. Rev. Genet. 19, 423-462, 1985 中的综述; 改进方法参见 Stanssen et al., Nucl. Acids Res. 17, 4441-4445, 1989 的第 2-6 篇参考文献)。本发明的应用中另外一种优选的对给定 DNA 进行突变的可能方法是用聚合酶链式反应 (PCR) 进行的诱变。可用本领域已知的方法从不同的菌株 / 生物中分离出作为起始物质的 DNA, 所述方法例如见 Sambrook et al. (Molecular Cloning)。但是, 应当理解, 将按照本发明来构建 / 突变的编码甲羟戊酸激酶的 DNA 也可以在已知 DNA 序列的基础上来制备, 例如, 通过用本领域已知的方法来构建合成基因 (见例如 EP 747 483 和 Lehmann et al., Prot. Eng. 13, 49-57, 2000 所述)。

[0044] 编码根据本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的多核苷酸的非限制性的例子如 SEQ ID NO: 32 和 33 所示。

[0045] 本发明的多核苷酸可以是经过分离的多核苷酸。术语“经过分离的多核苷酸”指与已充分除去了其它核酸的多核苷酸, 其它核酸例如但不限于其它的染色体或染色体外 DNA 和 RNA。本领域技术人员已知的传统核酸纯化方法可用于获得经过分离的多核苷酸。该术语还包括重组的多核苷酸和化学合成的多核苷酸。

[0046] 在另一种实施方式中, 本发明涉及包含根据本发明的多核苷酸的载体或质粒。优选地, 该载体或质粒包含至少一种标记基因。该载体和质粒还包含与本发明的多核苷酸可操作地连接的调控元件。本文中使用的术语“可操作地连接”指核酸序列与单条核酸片段相连, 使得其中一种的功能受另一种影响。例如, 当启动子能影响到编码序列的表达的情况下, 即编码序列受启动子的转录控制的情况下, 该启动子就是与编码序列可操作地连接的。编码序列可与调控序列以正义或反义方向可操作地连接。术语“表达”指 DNA 序列向 mRNA 的转录和 / 或 mRNA 向氨基酸序列的翻译。术语“过量表达”指: 经过修饰的生物 (例如, 通过转化和转染修饰过的) 中基因产物的产量高于相应的未经修饰的生物中的生产水平。

[0047] 获得本发明的 DNA 全序列后, 可通过本领域已知的方法 (例如 Sambrook et al. (s. a.) 所述), 将其整合到载体中, 以在合适的宿主系统中 (过量) 表达被编码的多肽。但是, 本领域技术人员知道, DNA 序列自身也可被用于转化本发明的合适的宿主系统, 以获得被编码的多肽的 (过量) 表达。合适的宿主系统例如是真菌, 例如 Aspergilli, 例如 Aspergillus niger 或 Aspergillus oryzae, 或者例如 Trichoderma, 例

如 *Trichoderma reesei*, 或者酵母, 例如 *Saccharomyces*, 例如 *Saccharomyces cerevisiae* 或 *Pichia*, 例如 *Pichia pastoris*, 或 *Hansenula polymorpha*, 例如 *H. polymorpha* (DSM 5215)。本领域技术人员知道, 上述微生物可从保藏机构获得, 例如 American Type Culture Collection (ATCC)、the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CB S) 或 the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) 或列于 “Industrial Property” (vol. 1, pages 29–40, 1991) 刊物或 European Patent Office 官方刊物 (vol. 4, pages 155/156, 2003) 中的任何其它保藏机构。可以使用的细菌例如是 *Paracoccus*, 例如 *Paracoccus zeaxanthinifaciens*、*E. coli*, *Bacilli*, 例如 *Bacillus subtilis*, 或 *Streptomyces*, 例如 *Streptomyces lividans* (见, 例如 Anné and van Mellaert in FEMS Microbiol. Lett. 114, 121–128, 1993)。可以使用的 *E. coli* 例如是, *E. coli* K12 菌株, 例如 M15 (如 Villarejo et al. in J. Bacteriol. 120, 466–474, 1974 所述的 DZ 291)、HB101 (ATCC No. 33694) 或 *E. coli* SG13009 (Gottesman et al., J. Bacteriol. 148, 265–273, 1981)。

[0048] 可用于在真菌中进行表达的载体是本领域内已知的, 对其描述例如见 EP 420 358, 或者 Cullen et al. (Bio/Technology 5, 369–376, 1987), Ward (in Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi, Marcel Dekker, New York, 1991), Upshall et al. (Bio/Technology 5, 1301–1304, 1987), Gwynne et al. (Bio/Technology 5, 71–79, 1987) 或 Punt et al. (J. Biotechnol. 17, 19–34, 1991), 对酵母而言, 见 Sreekrishna et al. (J. Basic Microbiol. 28, 265–278, 1988; Biochemistry 28, 4117–4125, 1989), Hitzemann et al. (Natur 293, 717–722, 1981) 或 EP 183070, EP 183071, EP 248227, EP 263311。可用于在 *E. coli* 中表达的合适的载体由下述文献提到过, Sambrook et al. [s.a] 或 Fiers et al. in Proc. 8th Int. Biotechnol. Symp. [Soc. Franc. de Microbio., Paris (Durand et al., eds.), pp. 680–697, 1988], Bujard et al. (in Meth. Enzymol., eds. Wu and Grossmann, Academic Press, Inc., vol. 155, 416–433, 1987) 或 Stüber et al. (in Immunological Methods, eds. Iefkovits and Pernis, Academic Press, Inc., Vol. IV, 121–152, 1990)。可用于在 *Bacilli* 中表达的载体是本领域内已知的, 其被描述于, 例如 EP 207459 或 EP 405370, Yansura 和 Henner 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 439–443 (1984) 或 Henner, Le Grice 和 Nagarajan 在 Meth. Enzymol. 185, 199–228, 1990 中。可被用于在 *H. polymorpha* 中表达的载体是本领域内已知的, 其被描述于, 例如 Gellissen et al., Biotechnology 9, 291–295, 1991 中。

[0049] 此类载体可以已经带有调控元件, 例如启动子, 或者, 本发明的 DNA 序列可被改造为含有此类元件。可用的合适的启动子元件是本领域内已知的, 例如是: 用于 *Trichoderma reesei* 的 *cbhl*-(Haarki et al., Biotechnology 7, 596–600, 1989) 或 *pkil*-启动子 (Schindler et al., Gene 130, 271–275, 1993), 用于 *Aspergillus oryzae* 的 *amy*-启动子 [Christensen et al., Abstr. 19th Lunteren lectures on Molecular Genetics F23 (1987); Christensen et al., Biotechnology 6, 1419–1422, 1988; Tada et al., Mol. Gen. Genet. 229, 301–306, 1991], 用于 *Aspergillus niger* 的 *glaA*-(Cullen et al., Bio/Technology 5, 369–376, 1987; Gwynne et al., Bio/Technology 5, 713–719, 1987; Ward 在 Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi,

Marcel Dekker, New York, 83-106, 1991)、alcA-(Gwynne et al., Bio/Technology 5, 718-719, 1987)、suc1-(Boddy et al., Curr. Genet. 24, 60-66, 1993)、aphA-(macRae et al., Gene 71, 339-348, 1988; macRae et al., Gene 132, 193-198, 1993)、tpiA-(McKnight et al., Cell 46, 143-147, 1986; Upshall et al., Bio/Technology 5, 1301-1304, 1987)、gpdA-(Punt et al., Gene 69, 49-57, 1988; Punt et al., J. Biotechnol. 17, 19-37, 1991)和 pkiA- 启动子 (de Graaff et al., Curr. Genet. 22, 21-27, 1992)。可用于在酵母中表达的合适的启动子元件是本领域内已知的, 例如, 用于在 *Saccharomyces cerevisiae* 中表达的 pho5- 启动子 (Vogel et al., Mol. Cell. Biol. 9, 2050-2057, 1989; Rudolf and Hinnen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1340-1344, 1987) 或 gap- 启动子, 以及, 例如, 用于 *Pichia pastoris* 的 aox1- 启动子 (Koutz et al., Yeast 5, 167-177, 1989; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28, 265-278, 1988), 或用于 *H. polymorpha* 的 FMD 启动子 (Hollenberg et al., EPA No. 0299108) 或 MOX 启动子 (Ledeboer et al., Nucleic Acids Res. 13, 3063-3082, 1985)。

[0050] 用于细菌表达的合适的启动子和载体包括, 例如 Giacomini et al. 所述的合成启动子 (Gene 144, 17-24, 1994)。对于通过合适的质粒或通过编码甲羟戊酸激酶的 DNA 序列整合到染色体 DNA 中, 在细菌中表达所要求保护的 (突变体) 甲羟戊酸激酶的合适的教导在很多地方都能发现, 例如, US patent No. 6322995。

[0051] 本发明还涉及包含本发明的载体或质粒的宿主细胞。合适的宿主细胞可以是真核或原核细胞。合适的宿主细胞的例子包括但不限于: 细菌细胞, 例如链球菌、葡萄球菌、肠球菌、*E. coli*、*Streptomyces*、藻菌、*Bacillus subtilis* 和 *Streptococcus pneumoniae* 的细胞; 真菌细胞, 例如酵母 *Kluyveromyces*、*Saccharomyces*、担子菌、*Candida albicans* 和 *Aspergillus* 的细胞; 昆虫细胞, 例如 *Drosophila* S2 和 *Spodoptera* Sf9 的细胞; 动物细胞, 例如 CHO、COS、Hela、3T3、BHK、293、CV-1; 以及植物细胞, 例如裸子植物或被子植物的细胞。

[0052] 因此, 包含本发明的多核苷酸的载体, 优选地, 用于在细菌、真菌、酵母或植物宿主中表达所述多核苷酸的载体, 以及此类经过转化的细菌或真菌、酵母或植物宿主也是本发明的目的。

[0053] 本发明还涉及生产类异戊二烯化合物的方法, 所述方法包括:

[0054] (a) 在合适的培养基中, 允许经过修饰的甲羟戊酸激酶在宿主细胞中表达的条件下, 培养本发明的宿主细胞; 以及

[0055] (b) 可选地, 从培养基中分离出类异戊二烯化合物。

[0056] 上述方法可被用于对任何类型的类异戊二烯化合物或类异戊二烯衍生化合物进行生物技术方式的生产, 所述化合物例如: 类胡萝卜素, 例如但不限于, 八氢番茄红素、番茄红素、 α -/ β -/ γ -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质、 β -隐黄质、金盏花黄质、海胆酮、角黄素、虾青素及其衍生物 (Misawa & Shimada, J. Biotechnol. 59, 169-181, 1998; Miura et al., Appl. environ. Microbiol. 64, 1226-1229, 1998; Hirschberg, Curr. Opin. Biotechnol. 10, 186-191, 1999; Margalith, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 431-438, 1999; Schmidt-Dannert, Curr. Opin. Biotechnol. 11, 255-261, 2000; Sandmann, Arch. Biochem. Biophys. 385, 4-12, 2001; Lee & Schmidt-Dannert, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 1-11, 2002); 醌, 例如但不限于, 泛醌 (= 辅酶 Q)、甲基萘醌、质体醌和蒽醌, 优选地, 辅酶 Q6、辅

酶 Q7、辅酶 Q8、辅酶 Q9、辅酶 Q10 或辅酶 Q11, 最优选地为辅酶 Q10 (Clarke, Protoplasma 213, 134-147, 2000; Han et al., Plant Cell Tissue Organ Culture 67, 201-220, 2001; Kawamukai, J. Biosci. Bioeng. 94, 511-517, 2002); 橡胶和橡胶衍生物, 优选地, 天然橡胶 (= 顺式 1,4- 聚异戊二烯; Mooibroek & Cornish, Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 355-365, 2000); 固醇和固醇衍生物, 例如但不限于, 麦角固醇、胆固醇、氢化可的松 (Ménard Szczebara et al., Nature Biotechnol. 21, 143-149, 2003)、维生素 D、25- 羟基- 维生素 D3、膳食植物固醇 (Ling & Jones, Life Sci. 57, 195-206, 1995) 和天然表面活性剂 (Holmberg, Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 6, 148-159, 2001); 以及大量的其它类异戊二烯, 例如但不限于单萜、一个半萜、双萜和三萜, 例如紫杉醇 (Jennewein & Croteau, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 13-19, 2001) 和赤霉素 (Bruckner & Blechschmidt, Crit. Rev. Biotechnol. 11, 163-192, 1991)。

[0057] 合适的宿主细胞是所有类型的可用于遗传修饰的生物, 其例如但不限于, 细菌、酵母、真菌、藻类、植物或动物细胞。遗传工程和代谢工程的方法是本领域技术人员已知的 (例如 Verpoorte et al., Biotechnol. Lett. 21, 467-479, 1999; Verpoorte et al., Transgenic Res. 9, 323-343, 2000; Barkovich & Liao, Metab. Eng. 3, 27-39, 2001)。类似地, 针对类异戊二烯和类异戊二烯衍生化合物和 / 或分子的 (可能) 合适的纯化方法是精细化学生物合成和生产领域中已知的。

[0058] 应当理解, 用于对根据本发明的类异戊二烯和类异戊二烯衍生化合物和 / 或分子进行生物技术生产的方法不仅限于上述的全细胞发酵方法, 还可以使用透性化 (permeabilized) 宿主细胞、粗制的细胞提取物、通过 (例如) 离心或过滤从细胞残余物中分离的细胞提取物, 或者甚至是重构反应途径, 其中存在经过分离的酶。上述方法的组合也在本发明的范围内。在无细胞生物合成的情况下 (例如重构反应途径), 无论经过分离的酶由宿主细胞制备或分离自宿主细胞, 或体外转录 / 翻译或通过其它方法来制备分离, 都没有影响。

[0059] 本发明还涉及生产本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶的方法, 所述方法包括:

[0060] (a) 在允许本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下, 培养本发明的宿主细胞, 以及

[0061] (b) 从细胞或从培养基中回收经过修饰的甲羟戊酸激酶。

[0062] 可从包含表达系统的经过遗传改造的宿主细胞来制备本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶。

[0063] 为对本发明的多肽进行重组生产, 可对宿主细胞进行遗传改造, 以包含进本发明的多核苷酸或载体或质粒。可用很多种标准实验手册中所述的方法, 来将多核苷酸或载体引入宿主细胞 (例如 Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) 和 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)), 例如磷酸钙转染、DEAE- 葡聚糖介导的转染、微注射、阳离子脂质介导转染、电穿孔、转导、弹道 (ballistic) 引入和感染。

[0064] 多种不同的表达系统可被用于生产本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶。此类载体包括前文所述的等。通常, 任何适合于在宿主中维持、遗传和表达多核苷酸和 / 或表达多肽的系统或载体可被用于本方面的表达。

[0065] 在真核重组表达系统中,为将翻译出的蛋白质分泌到内质网内腔、胞质间间隙或细胞外环境,可将合适的分泌信号包括进被表达的多肽。上述信号可以是与多肽是内源的,或者它们可以是异源信号。

[0066] 通过公知方法,可从重组细胞培养物中对本发明的多肽进行回收及纯化,所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱以及羟基磷灰石色谱。在一种实施方式中,用高效液相色谱来进行纯化。当多肽在分离和/或纯化期间被变性的情况下,用于蛋白质重新折叠的公知技术可被用于重新产生具有活性的构象。蛋白质纯化的方法被描述于,例如 Deutscher, Protein Purification, Academic Press, New York, 1990 和 Scopes, Protein Purification, Springer Verlag, heidelberg, 1994 中。

[0067] 按照例如 Pen et al. in Bio/Technology 11, 811-814, 1994 或 EP 449375 所述的方法,还可将本发明的甲羟戊酸激酶表达于植物中,优选地,表达于种子中,如,例如 EP 449376 所述。启动子和终止子的一些合适的例子包括:来自胭脂氨酸合酶(nos)、章鱼碱合酶(ocs)和烟草花叶病毒(CaMV)基因的那些。一种可以使用的有效的植物启动子是高水平植物启动子。与本发明的遗传序列可操作地连接的此类启动子,应当能够提高本发明基因产物的表达。可用于本发明的高水平的植物启动子包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的小亚基(small subunit, ss),例如来自大豆的(Berry-Lowe et al., J. Mol. Appl. Genet. 1, 483-498, 1982),以及叶绿素 a/b 结合蛋白的启动子。已知上述两种启动子在植物细胞中是轻度诱导型的(见,例如 Genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective, A. Cashmore, Plenum Press, NY(1983), pages 29-38; Coruzzi et al., J. Biol. Chem. 258, 1399-1402, 1983; 和 Dunsmuir et al., J. Mol. Appl. Genet. 2, 285-300, 1983)。

[0068] 当需要对本发明的蛋白质进行商业生产时,可以使用一系列的培养方法。例如,对从重组微生物宿主中过量表达的特定基因产物的大规模生产,可以通过分批或连续的培养方法来进行。分批和补料分批培养方法是本领域内常用并且公知的,在 Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., or Deshpande, Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 227-234, 1992 中可以找到例子。对用于连续培养的方法的营养物和生长因素进行调节的方法,以及用于使得产物形成速率最大化的技术是工业微生物学领域中公知的,前文所述的 Brock 对一系列方法都进行了详细描述。

[0069] 发酵培养基必须含有合适的含碳底物。合适的底物可以包括但不限于,单糖,例如葡萄糖和果糖,寡糖,例如乳糖或蔗糖,多糖,例如淀粉或纤维素,或者它们的混合物,以及来自可更新给料的未经纯化的混合物。用于本发明的碳源可以包含多种不同的含碳底物,其将仅受对微生物的选择的限制。

[0070] 本发明还涉及制备对反馈抑制的敏感性降低的甲羟戊酸激酶的方法,所述方法包括如下步骤:

[0071] (a) 提供一种多核苷酸,所述多核苷酸编码第一种甲羟戊酸激酶,该激酶展示出对反馈抑制的敏感性;

[0072] (b) 将一种或多种突变引入到所述多核苷酸序列中,使得经过突变的多核苷酸序

列编码第二种甲羟戊酸激酶,较之第一种甲羟戊酸激酶,其含有至少一处氨基酸突变,其中,所述至少一处氨基酸突变发生于选自如下氨基酸位置所构成的组中的氨基酸位置中的一处或多处,所述氨基酸位置相应于如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列上的 17、47、93、94、132、167、169、204 和 266 位;

[0073] (c) 可选地,将经过突变的多核苷酸插入到载体或质粒中;

[0074] (d) 将多核苷酸或载体或质粒引入到合适的宿主细胞中;以及

[0075] (e) 在允许经过修饰的甲羟戊酸激酶表达的条件下培养所述宿主细胞。

[0076] 该方法的优选的实施方式与本文中描述的经过修饰的甲羟戊酸激酶、编码它们的多核苷酸、载体和质粒、宿主细胞以及方法的优选实施方式相对应。第一种和第二种甲羟戊酸激酶分别对应于未经修饰的和经过修饰的甲羟戊酸激酶(见上文)。

[0077] 本发明的另一方面是本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶或本发明的多核苷酸在制备用于治疗与甲羟戊酸激酶活性降低相关的疾病的药物中的用途。此类疾病包括但不限于,甲羟戊酸尿症、超免疫球蛋白 D 症以及周期性发热综合征。将本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶作为治疗用酶施用是优选的。施用的模式包括口服、肠道外、腹膜内和/或皮下施用。本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶或其盐可被配制为药物组合物(例如,小粒、酶晶体、药片、药丸、胶囊、注射剂、溶液等),所述组合物包含单独存在的此类酶中的至少一种,或者其与药学上可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂的混合物。药物组合物可按照传统方法来配制。对于任何特定病人的特定剂量水平取决于一系列的因素,包括所用的特定化合物的活性、年龄、体重、健康状况、性别、膳食、施用时间、施用途径、排泄速率、药物组合以及治疗所针对的特定疾病的严重程度。

[0078] 本发明的多核苷酸可被用于基因治疗方案。

[0079] 本发明的另一个方面是本发明的经过修饰的甲羟戊酸激酶或本发明的多核苷酸在测定生物流体中甲羟戊酸浓度中的用途。生物流体的非限制性的例子是血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、泪液、汗液以及其它任何细胞内、细胞间和/或细胞外的流体。

[0080] 本发明的一种目的是提供包含编码上文所述的经过修饰的甲羟戊酸激酶的核酸序列的多核苷酸、包含此类多核苷酸的载体(优选是表达载体)、经过此类多核苷酸或载体转化的宿主细胞、用于制备本发明甲羟戊酸激酶的方法(其中如前文所述的宿主细胞被培养于合适的培养条件下,通过本领域已知的方法将甲羟戊酸激酶从此类宿主细胞或培养基中分离出来)以及用于对类异戊二烯进行生物技术方式的生产的方法,所述方法基于宿主细胞来进行,所述宿主细胞已经过了此类多核苷酸或载体的转化和/或已将此类多核苷酸稳定整合进其染色体中。

[0081] 本发明的另一个目的是提供 (i) 编码甲羟戊酸激酶的 DNA 序列,所述激酶带有本发明的特定突变中的至少一种,所述 DNA 序列能在标准条件下与本发明的经过特定修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列中的任何一种杂交,或 (ii) 编码甲羟戊酸激酶的 DNA 序列,所述激酶带有本发明的特定突变中的至少一种,但是由于遗传密码子的简并性,所述 DNA 序列在标准条件下不能与本发明的经过特定修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列中的任何一种杂交,但其编码的氨基酸序列与能与本发明的经过特定修饰的甲羟戊酸激酶的 DNA 序列中的任何一种杂交的 DNA 序列所编码的完全相同,或 (iii) 上述 DNA 序列的片段,所述片段保留有其来源多肽的活性特征。

[0082] 用于杂交的“标准条件”在上下文中表示：本领域的技术人员通常用来检测特异性杂交信号的条件，其被描述于，例如 Sambrook et al., “Molecular Cloning”, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, New York 中；或者优选地，本领域技术人员所熟悉的所谓严谨杂交条件和非严谨清洗条件，或更优选地，严谨杂交条件和严谨清洗条件，其被描述于 Sambrook et al. (s.a.) 中。严谨杂交条件的一个特别的例子是：在包含 50% 甲酰胺、5 x SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH 7.6)、5 x Denhardt's 溶液、10% 葡聚糖硫酸和 20 μ g/ml 变性剪切鲑鱼精 DNA 的溶液中于 42°C 培养过夜（例如 15 小时），接着是在 0.1 x SSC 中于大约 65°C 对杂交支持物进行清洗。

[0083] 本发明的另一个目的是提供可从所谓的聚合酶链式反应方法 (PCR) 获得的 DNA 序列，其中，PCR 引物是基于本发明特别描述的 DNA 序列来设计的。应当理解，所获得的 DNA 序列编码的甲羟戊酸激酶与作为引物设计基础的、显示出可相比较的活性特征的激酶具有至少相同的突变。

[0084] 本文中描述的本发明的多种实施方式可以交叉组合使用。

[0085] 图 1：用程序 ClustalW 对来自小鼠、大鼠、人、酵母、*Arabidopsis thaliana* (ARATH)、*Schizosaccharomyces pombe* (SCHPO)、*Pyrococcus abyssi* (PYRAB)、*Pyrococcus horikoshii* (PYRHO)、*Pyrococcus furiosus* (PYRFU)、*Methanobacterium thermoautotrophicum* (METTH)、*Archaeoglobus fulgidus* (ARCFU)、*Methanococcus jannaschii* (METJA)、*Aeropyrum pernix* (AERPE) 和 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (PARACOCUS) 的甲羟戊酸激酶序列进行计算，得到的多条序列比对图。编号遵从 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列。

[0086] 图 2：将 K93E 甲羟戊酸激酶突变引入到基于 pBBR-K 的质粒的甲羟戊酸操纵子中，细节见文字部分。

[0087] 下述非限制性的实施例将对本发明进行进一步的阐述。

[0088] 实施例 1 多条序列的比对

[0089] 例如，使用程序“PILEUP” (GCG Wisconsin Package, version 10.2, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA)，可对不同甲羟戊酸激酶的多条氨基酸序列进行计算比对（见图 1），其中使用下述参数：缺口产生罚分 12，缺口延伸罚分 4，以及 blosum62.cmp 矩阵（缺省参数）；或者用程序 ClustalW (Version 1.7, EMBL, Heidelberg, Germany) 来进行，其中使用 BLOSUM 交换矩阵。此类序列比对是本领域技术人员的常规操作（例如，Cho et al., J. Biol. Chem. 276, 12573-12578, 2001）。

[0090] 本发明的上下文中，同源甲羟戊酸激酶可展示出与图 1 所示的任何甲羟戊酸激酶之间的序列相似性。图 1 给出了对来自下述物种的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列进行的多条序列比对的例子，所述物种是小鼠、大鼠、人、酵母、*Arabidopsis thaliana* (ARATH)、*Schizosaccharomyces pombe* (SCHPO)、酵母 (YEAST)、*Pyrococcus abyssi* (PYRAB)、*Pyrococcus horikoshii* (PYRHO)、*Pyrococcus furiosus* (PYRFU)、*Methanobacterium thermoautotrophicum* (METTH)、*Archaeoglobus fulgidus* (ARCFU)、*Methanococcus jannaschii* (METJA)、*Aeropyrum pernix* (AERPE) 和 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (PARACOCUS)，后者的序列还被用作对其它序列（例如前面命名的那些）的位置进行氨基酸编号的参照物。此外，具有 E6V 突变的经过修饰的大鼠甲羟戊酸激酶

表示了这样一种大鼠甲羟戊酸激酶,其中,在按照上文定义的编号方法得到的第6位(实际上是大鼠甲羟戊酸激酶氨基酸序列的第4位)上,天然存在的Glu(“E”是其标准IUPAC单字母氨基酸编码)被Val(“V”)所取代。本发明的所有突变体/变异体都是按照这种方法来命名的。

[0091] 实施例2 对甲羟戊酸激酶活性以及反馈抑制剂造成的抑制的测量

[0092] 用于测量甲羟戊酸激酶活性的酶试验被描述于,例如Popják(Meth. Enzymol. 15, 393-,1969), Gibson et al. (Enzyme 41,47-55,1989), Hinson et al. (J. Lipid Res. 38, 2216-2223,1997), Schulte et al. (Anal. Biochem. 269,245-254,1999) 或 Cho et al. (J. Biol. Chem. 276,12573-12578,2001) 中。为制备作为底物的甲羟戊酸,将130mg DL-甲羟戊酸内酯(FLUKA Chemie AG, Buchs, Switzerland) 溶于5.5ml的0.2M KOH中,并在50℃培养15分钟。然后在室温(RT)下通过加入0.1M HCl将溶液的pH调为7.0。除非另有指明(见实施例3),试验混合物由100mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH7.0)、1mM ATP、2mM $MgCl_2$ 、1mM 甲羟戊酸、0.5mM 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、0.32mM NADH、20U/ml 丙酮酸激酶和27U/ml 乳酸脱氢酶(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 构成。在试验混合物中用作抑制剂的FPP、GGPP、IPP、DMAPP和GPP(浓度为0-100 μ M之间)全部购自Sigma。加入纯化的(His₆-标记过的)甲羟戊酸激酶后,酶反应由NADH的消耗所反映,然后在340nm处进行光度测量。一个单位(1U)的甲羟戊酸激酶活性每分钟能催化1 μ mol 甲羟戊酸的磷酸化。

[0093] 实施例3 对酶试验的质量进行检测

[0094] 最佳的试验应当满足很多要求,例如与酶浓度成线性并与时间成线性。此外,在本发明的上下文中,该试验应当能够对反馈抑制剂造成的对甲羟戊酸激酶的抑制进行定量。在本实施例的实验中,使用下述实验条件:100mM KH_2PO_4 (pH 7.0)、0.125-4mM ATP、1.125-5mM $MgCl_2$ (总是比ATP多1mM)、0.25-3mM 甲羟戊酸、0或46 μ M FPP、0.16mM NADH、0.5mM PEP、20U/ml 丙酮酸激酶、27U/ml 乳酸脱氢酶,30℃。使用不同的量的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶,所述激酶是经过纯化和His₆-标记的。

[0095] 本实施例的实验显示,甲羟戊酸激酶活性试验实际上与时间和酶(甲羟戊酸激酶)浓度成线性,在用于 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 的给定条件下,MgATP和甲羟戊酸浓度每种都为1mM,可能对于对FPP造成的反馈抑制进行可信的测量来说是最佳的。

[0096] 实施例4对 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶进行诱变以获得具有反馈抗性的突变体

[0097] 通过PCR扩增出来自 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* R114的甲羟戊酸激酶的cDNA,其中使用的一种引物编码伴随6xHis序列的EcoRI限制性位点以及甲羟戊酸激酶5'-末端序列的一小部分,不含ATG起始密码子,使用的另一种引物含有甲羟戊酸激酶的3'-末端序列,其中包括终止密码子和BamHI限制性位点。通过琼脂糖凝胶电泳纯化之后,用EcoRI和BamHI对PCR产物进行消化,将其接连到用同样的酶消化过的pQE-80L(Qiagen, Hilden, Germany)中。pQE-80L含有受lac操纵子元件调控的T5启动子,其会受到也由pQE-80L编码的lac遏制子的顺式抑制。然后按照厂商说明书,将该质粒转化进Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)的 *E. coli* DH5 α 中。在 *E. coli* 的指数生长期间,OD_{600nm}为0.6时加入100 μ M IPTG,在250rpm振荡下,于30℃对His₆标记过的甲羟戊酸激酶进行4小时的诱导。用QIAexpress系统/Qiagen的试剂,通过Ni-NTA色谱,对His₆标记过的甲

羟戊酸激酶和 His₆ 标记过的甲羟戊酸激酶突变体进行纯化。

[0098] 通过所谓的“两步 PCR”对 His₆ 标记过的甲羟戊酸激酶进行诱变,其中使用 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 的 Turbo-Pfu DNA 聚合酶。第一次 PCR 用含有被突变的密码子的引物 (引物 M) 和引物 pQE-5' 来进行,后者与 pQE-80L 的多克隆位点 (MCS) 5' - 末端的一小段序列相对应。模板是 pQE-80L-His-Mvk。通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行纯化,将其用作为第二次 PCR 反应的引物,第二次反应中还含有引物 pQE-3', 其包含 MCS 3' - 末端的一小段序列,野生型 pQE-80L-His-Mvk 被用作为模板。通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行纯化,用 EcoRI 和 BamHI 进行消化,用其将 His-Mvk 亚克隆进 pQE-80L。最后,通过琼脂糖凝胶电泳对经过消化的片段进行纯化,并将其连接到用同样的限制性酶线性化过的 pQE-80L 上。

[0099] 实施例 5 Paracoccus zeaxanthinifaciens 甲羟戊酸激酶突变体的反馈抗性

[0100] 按照实施例 2 所述来制备甲羟戊酸。试验混合物由 100mMK₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.0)、1mM ATP、1mM 甲羟戊酸、2mM MgCl₂、0.5mM 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)、0.32mM NADH、20U/ml 丙酮酸激酶和 27U/ml 乳酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 构成。在试验混合物中用作为抑制剂的 FPP、GGPP、IPP、DMAPP 和 GPP 全部购自 Sigma。将 92 μM 的 FPP 或 17.6 μM 的 GGPP 用于对甲羟戊酸激酶突变体进行的抑制试验。为对 FPP、GGPP、IPP、DMAPP 和 GPP 造成的抑制进行比较,加入 138 μM 的上述中间产物 (实施例 9)。加入经过纯化的 (His₆- 标记过的) 甲羟戊酸激酶后,酶反应由 NADH 的消耗所反映,然后在 340 nm 处进行光度测量。

[0101] 按照如下方法来计算反馈抗性 (%) : 如果 a 和 b 分别是不存在或存在反馈抑制剂 (本情况下, FPP) 的情况下测得的野生型酶的甲羟戊酸激酶活性, 如果 c 和 d 是分别是不存在或存在相同的反馈抑制剂的情况下测得的突变体酶的甲羟戊酸激酶活性, 那么 % 反馈抗性就是 :

[0102] $\% \text{ 抗性} = 100((d/c) - (b/a)) / (1 - (b/a))$

[0103] 表 1. 对 Paracoccus zeaxanthinifaciens 甲羟戊酸激酶的诱变对该酶的比活性以及反馈抗性的影响

[0104]

突变体	比活性 (野生型的%)	反馈抗性 (%)
WT	100	0
I17T	95	46
G47D	121	32
K93E	109	33
V94I	96	22
P132A, P375R	158	35
R167W, K169Q	50	43
R204H	83	7
C266S	64	14
I17T, G47D	77	42

[0105]

I17T, K93E	72	51
I17T, R167W, K169Q	37	71
I17T, P132A, P375R	62	56
K93E, P132A, P375R	111	57

[0106] WT 表示具有 SEQ ID No :15(具有 His₆- 标记) 的甲羟戊酸激酶。

[0107] 令人吃惊地, 上述突变对甲羟戊酸激酶的反馈抑制具有影响。现有技术中, 已有研究者提出, 人甲羟戊酸激酶第 133 至 156 位残基的保守疏水片断是类异戊二烯结合的优良候选位点 (Riou et al., Gene 148, 293-297, 1994; Houten et al., Biochim, Biophys. Acta 1529, 19-32, 2000)。但是, 上述突变中的任何一种都不定位于 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的相应片断处 (残基 137-160)。

[0108] 有相当数量的突变被认为会降低或者甚至破坏掉甲羟戊酸激酶的活性, 因此导致人类疾病甲羟戊酸尿症、超免疫球蛋白 D 症以及周期性发热综合征 (例如, K13X、H20P、H20N、L39P、W62X、S135L、A148T、Y149X、S150L、P165L、P167L、G202R、T209A、R215Q、T243I、L264F、L265P、I268T、S272F、R277C、N301T、G309S、V310M、G326R、A334T、V377I 和 R388X, 全部都在人类甲羟戊酸激酶中, Houten et al., Eur. J. Hum. Genet. 9, 253-259, 2001; Cuisset et al., Eur. J. Hum. Genet. 9, 260-266, 2001)。其中, 仅有两种 (即 P165L 和 R215Q) 发生于氨基酸序列比对中相应于显示出反馈抗性有影响的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶残基 (即, 分别为残基 169 和 204) 位置的残基。但是, 以前描述的人类甲羟戊酸激酶中的突变并未显示出对反馈抗性具有影响, 但是暗示会对酶的 (比) 活性造成负面影响。

[0109] 实施例 6 在前文中被鉴定为对酶的反馈抑制抗性有影响的氨基酸残基 / 位置, 对 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶进行饱和和诱变

[0110] 按照上文所述用于诱变的方法来进行饱和和诱变, 不同之处在于合成的诱变引物中, 要经历饱和和诱变的密码子由随机化序列构成。

[0111] 表 2. 对 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶突变体 I17T 的第 167 和 169 位残基进行的饱和和诱变, 以及对酶的比活性和反馈抗性的影响。

[0112]

突变体	比活性 (野生型的%)	反馈抗性 (%)
WT	100	0
I17T, R167W, K169Q	37	71
I17T, R167W, K169H	43	67
I17T, R167T, K169M	54	57
I17T, R167T, K169Y	40	66
I17T, R167F, K169Q	43	77
I17T, R167I, K169N	35	73
I17T, R167H, K169Y	54	64

[0113] WT 表示具有 SEQ ID No :15(具有 His₆- 标记) 的甲羟戊酸激酶。

[0114] 表 3. 对 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶突变体 I17T、G47D 的第

93 位残基进行的饱和诱变

[0115]

突变体	比活性（野生型的%）	反馈抗性（%）
I17T, G47D, K93E	76	78
I17T, G47D, K93Q	83	76

[0116] 表 4. 对 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶突变体 I17T、G47D、K93E 的第 132 位残基进行的饱和诱变

[0117]

突变体	比活性（野生型的%）	反馈抗性（%）
I17T, G47D, K93E	76	78
I17T, G47D, K93E, P132A	90	79
I17T, G47D, K93E, P132S	100	83

[0118] 实施例 7 用对反馈抑制具有抗性的甲羟戊酸激酶，增加对类异戊二烯化合物辅酶 Q10 的生产

[0119] 为检验突变对甲羟戊酸激酶反馈抑制进行影响的体内效果，将 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶突变体 K93E 引入到功能性的甲羟戊酸操纵子中，所述操纵子已被克隆到能在 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 中进行复制的广宿主范围载体上。对 *P. zeaxanthinifaciens* 的两种重组菌株（区别仅在于有或没有 K93E 突变）生产类异戊二烯化合物辅酶 Q10 的情况直接进行比较。

[0120] 质粒构建

[0121] 图 2 中以图的形式对质粒构建进行了阐述。克隆的细节如下所示。在 LB 培养基 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 中，于 37℃ 对 *E. coli* 菌株进行培养。为在重组的 *E. coli* 菌株中维持质粒，向培养基中加入氨苄青霉素 (100 μg/ml) 和 / 或卡纳霉素 (25-50 μg/ml, 取决于实验)。对固体培养基而言，还要加入琼脂 (1.5% 的终浓度)。在 200rpm 的旋转式摇床上对液体培养物进行培养。

[0122] 质粒 pBBR-K-mev-op-wt (图 2) 含有甲羟戊酸操纵子，其中包括插入到质粒 pBBR1MCS-2 的 SacI 和 NsiI 位点之间的来自 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 ATCC 21588 的其启动子区域 (Kovach et al., Gene 166, 175-176, 1995)。被克隆的甲羟戊酸操纵子对应于 GenBank/EMBL 编号为 AJ431696 的序列的第 2469 至 9001 位核苷酸的序列。在 SacI 位点和甲羟戊酸操纵子序列之间有一段短的连接序列，其来自质粒 pCR® 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，对应于从 SacI 位点到 PCR 片段插入位点之间的序列。应当注意到，编号为 AJ431696 的序列是来自 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114 (ATCC PTA-3335) 的，而非来自 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 ATCC 21588。*P. zeaxanthinifaciens* 菌株 ATCC21588 和 R114 的甲羟戊酸操纵子序列的唯一区别在于来自菌株 R114 的 *mvk* 基因中的突变。该突变导致甲羟戊酸激酶的第 265 位氨基酸从丙氨酸变为缬氨酸 (A265V)。因为 pBBR-K-mev-op-wt 中的甲羟戊酸操纵子来自 ATCC 21588，其不含突变，因此 *mvk* 中的密码子 265 是 GCC (而非编号为 AJ431696 的序列的 GTC)。

[0123] 还构建了一种与 pBBR-K-mev-op-wt 类似但具有来自菌株 R114 的 mvk 基因的质粒,其被命名为 pBBR-K-mev-op-R114。将处于 pBBR-K-mev-op-R114 的 *Ecl136* II 和 *SpeI* 位点之间的 *crtE* 启动子区域控制之下的、来自 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 ATCC 21588 的 *ddsA* 基因引入,得到 pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-*ddsA_{wt}* (图 2)。

[0124] 最后一步是制造与 pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-*ddsA_{wt}* 相同但含有 mvk 基因上的 K93E 突变的质粒。通过将 3166bp 的 *XmaI*-*SpeI* 片段亚克隆到经过 *XmaI*-*SpeI* 切割的载体 pBluescript II KS+(Stratagene, La Jolla, CA, USA) 中,构建出质粒 pBlu2SP-mvk-mvd (图 2)。质粒 pBlu2SP-mvk-mvd 具有方便的单限制性内切酶位点 *XmaI* 和 *AscI*,用于将经过突变的 mvk 基因引入到甲羟戊酸操纵子的 3'-末端。用 *XmaI* 和 *AscI* 去切割质粒 pQE-80L-mvk-K93E,并将带有 mvk 中的大部分(包括 K93E 突变)的 1 kb 片段与 *XmaI*-*AscI* 切割过的 pBlu2SP-mvk-mvd 主链相连,得到 pBlu2KSp-mvk-K93E-mvd。为重构在 mvk 上带有 K93E 突变的全长甲羟戊酸操纵子,用 *XmaI* 和 *SpeI* 对 pBlu2KSp-mvk-K93E-mvd 进行切割,并将 3166bp 的片段与来自 pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-*ddsA_{wt}* 的 8.18kb 的 *XmaI*-*SpeI* 片段连接起来,得到 pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-*ddsA_{wt}*。该质粒中 mvk 基因的第 265 位密码子是 GTC,因为 pQE-80L-mvk-K93E 的 mvk 基因来自 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114(ATCC PTA-3335)。

[0125] 概括起来,质粒 pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-*ddsA_{wt}* 和 pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-*ddsA_{wt}* 是相同的,只除了在后一个质粒中存在有 K93E 突变。

[0126] 构建重组的 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株

[0127] *P. zeaxanthinifaciens* 菌株被培养于 28℃。用于 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株的培养基组分如下所示。除非另有指明,生长于瓶中的 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株的全部液体培养物都被震荡培养于 200rpm 的旋转式摇床上。对固体培养基加入琼脂(2%的终浓度)。通过高压灭菌对培养基进行灭菌,在灭菌之后加入葡萄糖(作为浓缩贮液),以获得理想的终浓度。F-培养基含有(每升蒸馏水):蛋白胨,10g;酵母提取物,10g;NaCl,30g;D-葡萄糖·H₂O,10g;MgSO₄·7H₂O,5g。在通过过滤或高压灭菌进行灭菌之前,将 pH 调至 7.0。培养基 362F/2 含有(每升蒸馏水):D-葡萄糖·H₂O,33g;酵母提取物,10g;蛋白胨,10g;NaCl,5g;MgSO₄·7H₂O,2.5g。在通过过滤或高压灭菌进行灭菌之前,将 pH 调至 7.4。灭菌之后,加入微量元素溶液、NKP 溶液和 CaFe 溶液,每种均为 2.5ml。通过过滤对后三种溶液进行灭菌。微量元素溶液含有(每升蒸馏水):(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O,80g;ZnSO₄·7H₂O,6g;MnSO₄·H₂O,2g;NiSO₄·6H₂O,0.2g;EDTA,6g。NKP 溶液含有(每升蒸馏水):K₂HPO₄,250g;(NH₄)₂PO₄,300g。CaFe 溶液含有(每升蒸馏水):CaCl₂·2H₂O,75g;FeCl₃·6H₂O,5g;浓缩的 HCl,3.75ml。

[0128] 按照如下方法来制备 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114 的电感受态细胞,并进行电穿孔:用 1.5ml *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114 的稳定状态培养物对 100ml F 培养基进行接种,在 28℃,200rpm 下培养,直到 660nm 下的光密度达到大约 0.5。通过在 4℃、7000xg 下离心 15 分钟来收获细胞,在 pH 为 7 的 100ml 冰冷的 HEPES 缓冲液中洗两次。最终的沉淀被重新悬浮于 0.1ml 冰冷的 HEPES 缓冲液(pH 7)中,细胞被立即用于电穿孔或者加入终浓度为 15%的甘油,以 50 μl 为一份,将细胞贮藏于 -80℃。向去除了盐的溶液中加入 1 至 5 μl 的质粒 DNA,在冰冷的 1mm 小管中,18kV/cm 和 1290ms 下进行电穿孔。典型地,脉冲长

度在 4 至 5 毫秒之间。加入 1ml 的 F 培养基,在 28℃对细胞进行 1 小时的培养。将稀释液涂布到含有 25-50 μ g/ml 卡纳霉素的 F- 琼脂平板上,在 28℃进行培养。通过 PCR 分析,证实可能的转化子含有想要的质粒。

[0129] 用于评价辅酶 Q10 生产情况的培养条件

[0130] 在对 *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-ddsA_{wt} 和 R114/pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-ddsA_{wt} 进行的补料分批培养中来检测辅酶 Q10 的生产情况。所有培养物最初都来自冷冻的细胞悬浮液(作为 25%甘油贮液贮藏于 -80℃)。在每瓶含有 200ml 362F/2 培养基的 2 升带挡板摇瓶中来制备用于补料分批发酵的预培养物,2 瓶。对每只摇瓶,用 2 毫升解冻的细胞悬浮液作为接种体。预培养物的起始 pH 为 7.2。在 250rpm 震荡下,于 28℃对预培养物进行 28 小时的培养,这段时间后,660nm 处的光密度(OD₆₆₀) 在 14 至 22 个吸收单位之间,具体取决于所用的菌株。主培养物被培养于 Biostat ED 生物反应器(B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) 中,其中含有具有如下组分的培养基(每升蒸馏水):D- 葡萄糖·H₂O, 25g;酵母提取物(Tastone900), 17g;NaCl, 4.0g;MgSO₄·7H₂O, 6.25g;(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, 0.5g;ZnSO₄·7H₂O, 0.038g;MnSO₄·H₂O, 0.013g;NiSO₄·6H₂O, 0.001g;CaCl₂·2H₂O, 0.47g;FeCl₃·6H₂O, 0.062g;烟酸, 0.01g;NH₄Cl, 0.5g;消泡剂, 0.1ml;KP 溶液, 3.5ml。KP 溶液的组分为(每升蒸馏水):K₂HPO₄, 250g;NaH₂PO₄·2H₂O, 200g;(NH₄)₂HPO₄, 100g。向用于携带有质粒的菌株的培养基中加入卡纳霉素(终浓度为 50mg/l)。用于所有方法中的补料溶液具有如下组分(每升蒸馏水):D- 葡萄糖·H₂O, 550g;KP 溶液, 18.25ml。生物反应器中的初始体积(接种之后)为 8.0L。按照需要,用灭菌水对预培养物进行稀释,使得向生物反应器中加入 400ml 能获得 0.5 的初始 OD₆₆₀ 值。发酵条件被自动控制为如下条件:28℃, pH 7.2(通过加入 28%的 NH₄OH 来控制 pH), 溶解氧被控制为最小 40%的相对值(与搅拌级联),搅拌的最小值为 300rpm,通气速率为 1v. vm(相对于终体积而言)。不添加补料溶液的情况下,在上述条件下进行 20 小时的培养(分批阶段)。此段时间后,搅拌速度降低,基础消耗终止,pH 骤然升高,CO₂ 的产生下降,这是最初的葡萄糖被耗尽的标志,开始进行补料。标准补料方式被定义为如下部分(从补料起始点开始):17 小时内,从 50g/h 斜线上升至 80g/h,在 80g/h 保持 7 小时,然后在 11 小时内斜线下降至 55g/h,在发酵的剩余时间内保持在 55g/h(总发酵时间=70 小时)。主培养物的终体积为大约 10 升。

[0131] 分析方法

[0132] 试剂。乙腈、二甲基亚砜(DMSO)、四氢呋喃(THF)、四丁基甲醚(TBME)和丁基化羟基甲苯(BHT)是分析纯或 HPLC 级的,其都获得自 Fluka(瑞士)。辅酶 Q10 购自 Fluka。甲醇(Lichrosolv)购自 Merck, Darmstadt, 德国。类胡萝卜素标准物从 Chemistry Research Department, Roche Vitamins Ltd., Switzerland 获得。

[0133] 样品制备和抽提。将全培养液中的 400 微升转移到一次性的 15ml 聚丙烯离心管中。加入 4 毫升经稳定的抽提溶液(0.5 g/l BHT, 处于 1:1(v/v)DMSO/THF) 中,在实验室摇床(IKA, 德国)中,对样品进行 20 分钟的混合,以促进抽提。最后,对样品进行离心,将上清液转移到琥珀色玻璃管中,以进行高效液相色谱(HPLC)分析。

[0134] HPLC。开发了一种反向 HPLC 方法,用于对泛醌及其相应对苯二酚同时进行测定。该方法能将类胡萝卜素玉米黄质、八氢番茄红素、 β -隐黄质、 β -胡萝卜素和番茄红素与

辅酶 Q10 清楚地分开。用装备有温控自动上样仪和二极阵列检测器的 Agilent 1100 HPLC 系统来进行色谱分析。该方法的参数如下所示：

- [0135] 柱 YMC 类胡萝卜素 C30 柱
 [0136] 3 微米, 钢, 150mm 长 × 3.0mm ID
 [0137] (YMC, Part No. CT99S031503QT)
 [0138] 保护柱 Security Guard C18(ODS, 十八烷)
 [0139] 4mm 长 × 3.0mm I.D.
 [0140] (Phenomenex, Part No. AJ0-4287)
 [0141] 典型柱压 开始时 60bar
 [0142] 流速 0.5ml/min
 [0143] 移动相 乙腈 (A) : 甲醇 (B) : TBME (C) 的混合物
 [0144] 梯度曲线
- | 时间 (min) | % A | % B | % C |
|----------|-----|-----|-----|
| 0 | 60 | 15 | 25 |
| 13 | 60 | 15 | 25 |
| 20 | 0 | 0 | 100 |
| 22 | 60 | 15 | 25 |
| 22 | 60 | 15 | 25 |
- [0150] 时间 (post time) 4 分钟
 [0151] 注射体积 10 μl
 [0152] 柱温 15°C
 [0153] 检测 按照表 5 将三种波长用于检测特定的化合物
 [0154] 表 5. HPLC 保留时间和所用的波长
 [0155]

化合物	波长 (nm)	保留时间 (分钟)
玉米黄质 (Z- 异构体)	450	4.2, 6.4
E- 玉米黄质	450	5.2
八氢番茄红素	280	7.7
β- 隐黄质	450	8.6
泛醌 10	210	11.4
辅酶 Q10	210	12.8
β- 胡萝卜素	450	14.5
番茄红素	450	22.0

[0156] 计算、选择性、线性、检测极限和可重现性。计算是基于峰的面积来进行的。通过向其中注射相关参照化合物的标准溶液对该方法的选择性进行了验证。目标化合物 (辅酶 Q10 和泛醌 10) 完全分开, 没有显示任何的干扰。对辅酶 Q10 在抽提溶液中的一系列稀释物 (见上文) 进行制备和分析。线性范围被发现为 5mg/l 至 50mg/l。相关系数为 0.9999。用该 HPLC 方法检测辅酶 Q10 的极限被测定为 4mg/l。对该方法 (包括抽提步骤) 的可重现性进行了验证。对十份单独的样品制剂进行比较。相对标准差被测定为 4%。

[0157] 关于辅酶 Q10 生产情况的结果

[0158] 在上述补料分批培养条件下, *P. zeaxanthinifaciens* 菌株 R114/pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-ddsA_{wt} 生产的辅酶 Q10 的终浓度比针对菌株 R114/pBBR-K-mev-opR114-PcrtE-ddsA_{wt} 观察到的要高 34%。该差异并不能简单归结于两种菌株的生长差异, 菌株 R114/pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-ddsA_{wt} 较之菌株 R114/pBBR-K-mev-opR114-PcrtE-ddsA_{wt}, 还显示出了要高 12% 的辅酶 Q10 比产量 (单位辅酶 Q10/克细胞干重/小时)。此外, 菌株 R114/pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-ddsA_{wt} 较之菌株 R114/pBBR-K-mev-opR114-PcrtE-ddsA_{wt}, 其培养基中甲羟戊酸的积累还有 31% 的降低。该比较显示, 质粒 pBBR-K-mev-op-(mvk-K93E)-PcrtE-ddsA_{wt} 中的突变 K93E 对辅酶 Q10 的生产增加具有直接作用。

[0159] 实施例 8 I17T 突变对 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶溶解度的影响

[0160] 对人类甲羟戊酸激酶而言, 对 *E. coli* 转化子进行 IPTG 诱导后, 突变体 E19A、E19Q 和 H20A 都显示出了完全不溶的性质 (Potter and Mizioroko, J. Biol. Chem. 272, 25449-25454, 1997)。加上 His₆ 标签的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* R114 甲羟戊酸激酶 (SEQ ID NO:15) 还显示出了明显的聚集/沉淀趋势, 尤其是在具有较高的离子强度的缓冲液 (例如, 50mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300mM NaCl, 250mM 咪唑) 中。令人惊奇地, 加上 His₆ 标签的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* R114 甲羟戊酸激酶突变体 I17T 在同样条件下可完全溶解, 并且稳定, 因此该突变体酶更适于需要可溶甲羟戊酸激酶的应用。

[0161] 实施例 9 途径中不同下游产物对甲羟戊酸激酶的反馈抑制

[0162] 以前有过报道, 多种甲羟戊酸激酶都对甲羟戊酸途径下游产物造成的反馈抑制敏感, 所述下游产物包括: IPP、DMAPP、GPP、FPP、GGPP、植基-PP、法呢醇、磷酸多萜醇。在 138 μM 的 GGPP、FPP、GPP、IPP 或 DMAPP 下, 加上 His₆ 标签的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶活性分别受到 98%、80.1%、18.6%、16.3% 和 14.7% 的抑制。Paracoccus zeaxanthinifaciens 甲羟戊酸激酶 I17T/G47D/K93E/P132S 对 FPP (92 μM) 或 GGPP (17.6 μM) 造成的反馈抑制的抗性分别为 83% 和 92%。

[0163] 实施例 10 对与 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶同源的甲羟戊酸激酶的相应残基的鉴定

[0164] 用序列比对程序 GAP (GCG Wisconsin Package, version 10.2, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA; 缺口产生罚分 8, 缺口延伸罚分 2), 鉴定出了下述相应于 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 特定氨基酸位置的残基:

[0165]

SEQ ID NO:	氨基酸位置								
1	I17	G74	K93	V94	P132	R167	K169	R204	C266
2	I15	S45	K90	V94	(-)	E163	P165	R215	C275
3	I15	S45	P83	T84	P127	P167	K169	R215	C275
4	I15	S45	K93	V94	L129	R171	S173	R215	C275
5	I12	P43	S83	T84	P131	E167	E179	K215	D269
6	I14	S45	Q93	E94	N131	L172	K174	K216	C279
7	I14	N44	V76	Q77	P120	P162	S164	R208	I268
8	I14	G46	E80	V81	(-)	L136	L138	Y173	S238
9	I14	G46	E80	V81	(-)	L136	L138	Y173	S238
10	I12	(-)	K78	A79	(-)	L135	L137	F172	V227
11	I12	T37	(-)	(-)	P80	R115	H117	Y152	I208
12	I10	S35	(-)	(-)	G76	G111	M113	(-)	D197
13	I10	Q40	(-)	(-)	T93	K129	L131	E166	I220
14	I14	(-)	S58	A59	P93	D128	L130	A165	I223
15	I26	G56	K102	V103	P141	R176	K178	R213	C275
30	I13	(-)	S86	I87	P135	R178	T184	K224	C290

[0166] 氨基酸编号根据 SEQ ID NO :1-15 和 30 来进行。

[0167] (-) 表示没检测出同源残基。

[0168] 未经修饰的甲羟戊酸激酶的氨基酸序列的例子包括但不限于下述氨基酸序列 (SEQ ID NO :1-15 和 30)。编码未经修饰的甲羟戊酸激酶 (SEQ ID NO :1-14 和 30) 的核苷酸序列分别展示于 SEQ ID NO :16-29 以及 31 中。

[0169] SEQ ID NO :1 :*Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列。

[0170] SEQ ID NO :2 :人类甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q03426)。

[0171] SEQ ID NO :3 :小鼠甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q9R008)。

[0172] SEQ ID NO :4 :大鼠甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 P17256)。

[0173] SEQ ID NO :5 :*Arabidopsis thaliana* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 P46086)。

[0174] SEQ ID NO :6 :酵母甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 P07277)。

[0175] SEQ ID NO :7 :*Schizosaccharomyces pombe* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q09780)。

[0176] SEQ ID NO :8 :*Pyrococcus abyssi* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q9V187)。

[0177] SEQ ID NO :9 :*Pyrococcus horikoshii* 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q59291)。

[0178] SEQ ID NO:10:Pyrococcus furiosus 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q8U0F3)。

[0179] SEQ ID NO:11:Methanobacterium thermoautotrophicum 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q50559)。

[0180] SEQ ID NO:12:Archaeoglobus fulgidus 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 027995)。

[0181] SEQ ID NO:13:Methanococcus jannaschii 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q58487)。

[0182] SEQ ID NO:13:Methanococcus jannaschii 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q58487)。

[0183] SEQ ID NO:14:Aeropyrum pernix 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列 (Swiss-Prot 编号 Q9Y946)。

[0184] SEQ ID NO:15:加上 His₆ 标签的 Paracoccus zeaxanthinifaciens 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列。

[0185] SEQ ID NO:16:Paracoccus zeaxanthinifaciens 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列。

[0186] SEQ ID NO:17:人类甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 M88468)。

[0187] SEQ ID NO:18:小鼠甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AF137598)。

[0188] SEQ ID NO:19:大鼠甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 M29472)。

[0189] SEQ ID NO:20:Arabidopsis thaliana 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 X77793)。

[0190] SEQ ID NO:21:酵母甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 X06114)。

[0191] SEQ ID NO:22:Schizosaccharomyces pombe 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AB000541)。

[0192] SEQ ID NO:23:Pyrococcus abyssi 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AJ248284)。

[0193] SEQ ID NO:24:Pyrococcus horikoshii 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AB009515;反向)。

[0194] SEQ ID NO:25:Pyrococcus furiosus 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AE010263;反向)。

[0195] SEQ ID NO:26:Methanobacterium thermoautotrophicum 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 U47134)。

[0196] SEQ ID NO:27:Archaeoglobus fulgidus 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AE000946;反向)。

[0197] SEQ ID NO:28:Methanococcus jannaschii 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 U67551)。

[0198] SEQ ID NO:29:Aeropyrum pernix 甲羟戊酸激酶的 DNA 序列 (Genbank 编号 AP000064)。

[0199] SEQ ID NO:30:Phaffia rhodozyma ATCC96594 甲羟戊酸激酶的氨基酸序列。

[0200] SEQ ID NO:31:Phaffia rhodozyma ATCC96594 甲羟戊酸激酶的基因 (DNA) 序列。

该甲羟戊酸激酶由 4 个内含子和 5 个外显子构成。

[0201] 外显子 1 :1021-1124

[0202] 内含子 1 :1125-1630

[0203] 外显子 2 :1630-1956

[0204] 内含子 2 :1957-2051

[0205] 外显子 3 :2052-2366

[0206] 内含子 3 :2367-2446

[0207] 外显子 4 :2447-2651

[0208] 内含子 4 :2652-2732

[0209] 外显子 5 :2733-3188

[0210] PolyA 位点 :3284

[0211] SEQ ID NO :32 :加上 His₆ 标签的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶突变体 I17T 的 DNA 序列。

[0212] SEQ ID NO :33 :加上 His₆ 标签的 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* 甲羟戊酸激酶突变体 I17T/G47D/K93E/P132S 的 DNA 序列。

```

Name: SW_ROD_KIME_MOUSE oo Len: 468 Check: 7988 Weight: 1.00
Name: SW_ROD_KIME_RAT oo Len: 468 Check: 7364 Weight: 1.00
Name: SW_HUM_KIME_HUMAN oo Len: 468 Check: 8275 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_PYRAB oo Len: 468 Check: 8911 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_PYRHO oo Len: 468 Check: 673 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_PYRFU oo Len: 468 Check: 8129 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_ARATH oo Len: 468 Check: 9149 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_METTH oo Len: 468 Check: 6345 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_ARCFU oo Len: 468 Check: 5101 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_AERPE oo Len: 468 Check: 3583 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_SCHPO oo Len: 468 Check: 9129 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_YEAST oo Len: 468 Check: 1853 Weight: 1.00
Name: SW_OTHER_KIME_METJA oo Len: 468 Check: 8449 Weight: 1.00
Name: PARACOCUS oo Len: 468 Check: 7087 Weight: 1.00

//

SW_ROD_KIME_MOUSE ..MLSEALLV SAPGKVLHG EHAVVHGKVA LAAALN.LRT FLLLRP....
SW_ROD_KIME_RAT ..MLSEVLLV SAPGKVLHG EHAVVHGKVA LAVALN.LRT FLVLRP....
SW_HUM_KIME_HUMAN ..MLSEVLLV SAPGKVLHG EHAVVHGKVA LAVSLN.LRT FLRLQP....
SW_OTHER_KIME_PYRAB ...MPRLVLA SAPAKIILFG EHSVYVGKPA TASALD.LRT YVRAEF....
SW_OTHER_KIME_PYRHO ...MVKYVLA SAPAKVILFG EHSVYVGKPA TASALE.LRT YVRAQF....
SW_OTHER_KIME_PYRFU .....MKVIA SAPAKVILFG EHSVYVGKPA TAAALD.LRT FVEAEL....
SW_OTHER_KIME_ARATH .....MEVKA RAPGKIILAG EHAVVHGSTA VAAALD.LYT YVTLRFPLPS
SW_OTHER_KIME_METTH .....MKSSA SAPAKAILFG EHAVVYSGKPA TAAALD.RRV TVTVSE....
SW_OTHER_KIME_ARCFU .....MIA SAPGKIILFG EHAVVYGRHA VVSAIN.LRC RVSVRK....
SW_OTHER_KIME_AERPE ...MRRARA SAPGKVIIVG EHPVVRGSLA IVAAIG.RRL RVTVRS....
SW_OTHER_KIME_SCHPO ...MSKSLIV SSPGKTILFG EHAVVYGATA LAAAVS.LRS YCKLOT....
SW_OTHER_KIME_YEAST ...MSLPFLT SAPGKVILFG EHSVYVYKPA VAAVSALRT YLLISE....
SW_OTHER_KIME_METJA .....MII ETPSKVILFG EHAVVYGYRA ISMAID.LTS TIEKETQ..
PARACOCUS MSTGRPEAGA HAPGKLILSG EHSVLYGAPA LAMAIA.RYT EVNFTP....
Numbering 1 45

SW_ROD_KIME_MOUSE .QSNQKVSVN LPNIGIKQVW DVGML...QR LDTSPLEQGD VSVPTLE.QL
SW_ROD_KIME_RAT .QSNQKVSIN LPNIGIKQVW DVATL...QL LDTGFLEQGD VPAPTLE.QL
SW_HUM_KIME_HUMAN .HSNGKVDLS LPNIGIKRAW DVARL...QS LDTSPLEQGD VITPTSE.QV
SW_OTHER_KIME_PYRAB .NDSGNKIE AHDIKTP... ..G LIVSPSED.. .KIYFET.DY
SW_OTHER_KIME_PYRHO .NDSGNKIE AHDIKTP... ..G LIVSPSED.. .KIYFET.DY
SW_OTHER_KIME_PYRFU .IREKKIRIE AHDIKVP... ..G LTVSPSEN.. .KIYFET.DY
SW_OTHER_KIME_ARATH ARNDRLTLQ LKDISLEFSW SLARIKEAIP YDSSTLCR.. .STPASC.SE
SW_OTHER_KIME_METTH ...SSSTHVT IPSLGIR... ..H SSER.....
SW_OTHER_KIME_ARCFU ...SDRFLI RSSLGES... ..G LDYQ.....
SW_OTHER_KIME_AERPE ..GGKGIVLE SSMGRHS... ..AP LPGQ.....
SW_OTHER_KIME_SCHPO .TANNEIVIV MSDIGTERRW N.....LQS LPWQHVTVEN VQHPASSEN.
SW_OTHER_KIME_YEAST SGAPDTIELD FPDISFPHKW SINDFNAITE DVNSOKLAK AQQATDGLSQ
SW_OTHER_KIME_METJA ...EDEITLN LNDLNKS... ..LG LNLNETKN.. .INPN...NF
PARACOCUS LGIGEGIRTT FANLSGGATY S.....LK LLSGFKSRLD RRFEPQLNGD
Numbering 46 88

SW_ROD_KIME_MOUSE EKLKMGDLP RD.RAGNEGM ALLA...FLY LYLAI CRKQR TLFSLDMVVW
SW_ROD_KIME_RAT EKLKVVAGLF RD.CVNEGL SLLA...FLY LYLAI CRKQR TLFSLDMVVW
SW_HUM_KIME_HUMAN EKLKEVAGLF DD.CAVTERL AVLA...FLY LYLAI CRKQR ALPSLDIVW
SW_OTHER_KIME_PYRAB GKAAEVLSYV R..... ..HA...IEL VLEADKR.. .TGVSVSIT
SW_OTHER_KIME_PYRHO GKAAEVLSYV R..... ..YA...IEL ALAESDKR.. .VGIDVSIT
SW_OTHER_KIME_PYRFU GKAAEVLSYV R..... ..EA...INL VLEADKON.. .VGIEVSIT
SW_OTHER_KIME_ARATH ETLKSIIVLV EEQNLPKKEM WLSS...GIS TFLNLYTRII GFNPATVVIN
SW_OTHER_KIME_METTH F.SGGILDYI G..... ..R.....CLE LYHDAS... ..PLDIRVE
SW_OTHER_KIME_ARCFU R.HPYVVOAV K..... ..EFGELRE... ..IPGAREIE
SW_OTHER_KIME_AERPE GAAAKVEFVL EP..... ..YLA VLESIAARGY SVVPETILVE
SW_OTHER_KIME_SCHPO DLLOGLGELL KNEENGLIHS AMLC...TLY LPTSLSPPS.. .QGCTLTIS
SW_OTHER_KIME_YEAST ELVSLDPLL AQLSESPHYH AAPC...FLY MFVCLCPHA.. .KNIKPSLK
SW_OTHER_KIME_METJA GDFKYCLCAI KN..... ..TL DYLNIIEPK.. .TGFKINIS
PARACOCUS LKVHKVLTTHP DDLAVYALAS LLHDKPPGTA AMPGIGAMEH LPRFELGSR
Numbering 89 138

```

图 1

SW_ROD_KIME_MOUSE	SELPPGAGLG	SSAAYSVCCLA	AALLTACEEV	SNPLKDGVS	SRWPEEDLKS
SW_ROD_KIME_RAT	SELPPGAGLG	SSAAYSVCVA	AALLTACEEV	SNPLKDRGSI	GSWPEEDLKS
SW_HUM_KIME_HUMAN	SELPPGAGLG	SSAAYSVCCLA	AALLTVCEEI	SNPLKDGDCV	NRWTKEDLEL
SW_OTHER_KIME_PYRAB	SQIPVGAGLG	SSAAVAVATI	GAVSKLLDL	LS.....	...KEE....
SW_OTHER_KIME_PYRHO	SQIPVGAGLG	SSAAVAVATI	GAVSRLLGL	LS.....	...KEE....
SW_OTHER_KIME_PYRFU	SQIPVGAGLG	SSAAVAVATI	GAVSKLLGL	LS.....	...KEE....
SW_OTHER_KIME_ARATH	SELPYSGGLG	SSAALCVALT	AALLASSTSE	KTR...GNWG	SSLDSTNLEL
SW_OTHER_KIME_METTH	MEIPAGSGLG	SSAALTVALI	GALDRYHGRD	RG.....	...PGE....
SW_OTHER_KIME_ARCFU	SEIPISGGLG	SSAAVIVATI	AALNAEPDGD	MD.....	...KEA....
SW_OTHER_KIME_AERPE	SGIPFAGLG	SSAASMVAYA	LSYSAMHGDP	LS.....	...AED....
SW_OTHER_KIME_SCHPO	SQVPLGAGLG	SSATISVVVA	TSLLAFPMI	EPF...SSN	SLQNNKALAL
SW_OTHER_KIME_YEAST	STLPIGAGLG	SSASISVSLA	LAMAYLGGIT	LS.....NDL	EKLSENDKHI
SW_OTHER_KIME_METJA	SKIPISGGLG	SSASITIGTI	KAVSGFYNKE	LK.....	...DDE....
PARACOCUS	TELPAGAGMG	SSAAIVAATT	VLFETLLDHP	KT.....	...PEQ....
Numbering	139				173

图1(续)

SW_ROD_KIME_MOUSE	INKWAFEGER	VIHGNPSGVD	NAVSTWGGAL	RFQ....QGT	..MSSLKSLP
SW_ROD_KIME_RAT	INKWAFEGER	VIHGNPSGVD	NSVSTWGGAL	RYQ....QK	..MSSLKRLP
SW_HUM_KIME_HUMAN	INKWAFQGER	MIHGNPSGVD	NAVSTWGGAL	RYH....QK	..TSSLKRSP
SW_OTHER_KIME_PYRAB	IAKMGHKVEL	LVQGASSGID	PTVSAIGGFL	RYK....QGE	..FEHLP.FV
SW_OTHER_KIME_PYRHO	IAKLGHKVEL	LVQGASSGID	PTVSAVGGFL	RYK....QK	..FEPLP.FM
SW_OTHER_KIME_PYRFU	IAKMGHKTEL	LVQGASSGID	PTVSAIGGFI	RYE....KGG	..FEHLP.FM
SW_OTHER_KIME_ARATH	LNKWAPEGEK	IIHGKPSGID	NTVSAYGMI	KFC....SGE	..ITRLQSNM
SW_OTHER_KIME_METTH	TAARAHREVE	DVQGAASPLD	TAISTYGGLV	YLS...QRR	..VROFE.AD
SW_OTHER_KIME_ARCFU	IFQMAKQVEI	DVQGRASGID	PFISTFGGSW	IFP....ERR	..KVEMP...
SW_OTHER_KIME_AERPE	LYSVAMEGEK	IAHGKPSGVD	VTIAVRGGVL	AYR....RGE	NPVDIRPGLT
SW_OTHER_KIME_SCHPO	IEAWSFLGEC	CIHGTPSGID	NAVATNGGLI	AFR....KAT	AHQSAMKEFL
SW_OTHER_KIME_YEAST	VNQWAFIGE	CIHGTPSGID	NAVATYGNAL	LFKDSHNGT	INTNMNPKFLD
SW_OTHER_KIME_METJA	IAKLGVMVEK	EIQKASITD	TSTITYKGIL	EIKNN..KFR	KIKGEFERFL
PARACOCUS	RFRDRVFCER	LKHGKAGPID	AASVVRGGVL	RVGGNG.PGS	ISSFDLPEDH
Numbering	174				222

SW_ROD_KIME_MOUSE	SLQILL	TNTKV.PRST	KALVAAVRSR	L.TKFPPEIVA	PLLTSIDAIS
SW_ROD_KIME_RAT	ALQILL	TNTKV.PRST	KALVAGVRSR	L.IKFPPEIMA	PLLTSIDAIS
SW_HUM_KIME_HUMAN	ALQILL	TNTKV.PRST	RALVAGVRSR	L.LKFPPEIVA	PLLTSIDAIS
SW_OTHER_KIME_PYRAB	ELPIVV	GYTGS.SGST	KELVAMVRRR	Y.ZEMPPELIE	PILESMGKIV
SW_OTHER_KIME_PYRHO	ELPIVV	GYTGS.TGST	KELVAMVRRR	Y.ZEMPPELVE	PILEAMGKIV
SW_OTHER_KIME_PYRFU	ELPIVV	GYTGS.SGPT	KELVAMVRRR	Y.ZEMPPELIV	PILEAMGKIV
SW_OTHER_KIME_ARATH	PLRMIL	TNTRV.GRNT	KALVSGVSR	A.VRHPDANK	SFVNAVDIS
SW_OTHER_KIME_METTH	LGDLVI	AHLDY.SGET	ARMVAGVAER	F.RRFPDIMG	RIMDTVESIT
SW_OTHER_KIME_ARCFU	PKFFV	INFG..SRST	AEMVAKVAEL	R.ERHPEVVD	KIFDAIDAIS
SW_OTHER_KIME_AERPE	GVTLIV	ADTGV.ERRT	RDVVEHVLIS	A.DALGEAST	VIYRAADLIA
SW_OTHER_KIME_SCHPO	KPKDTLSVMI	TDTKQ.PKST	KKLVGQVPEL	K.ERLPTVID	SIIDAIDGIS
SW_OTHER_KIME_YEAST	DFFP.AIFMIL	TYTRI.PRST	KDLVARVRVL	VTEKFPPEVMK	PILDAMGECA
SW_OTHER_KIME_METJA	K...NCKFLI	VYAEKRRKKT	AELVNEVAKI	E.....NGD	EIFKEIDKVI
PARACOCUS	DLVAGRGWYV	VLEGRFVSGT	GECVSAVAAA	H...G...RDA	ALWDAFAVCT
Numbering	223				267

SW_ROD_KIME_MOUSE	LECERVLGEM	VAAP.....	...VPEQYLV	LEELIDMNQH	HINALGVGHN
SW_ROD_KIME_RAT	LECERVLGEM	AAAP.....	...VPEQYLV	LEELMDMNQH	HINALGVGHA
SW_HUM_KIME_HUMAN	LECERVLGEM	GEAP.....	...APEQYLV	LEELIDMNQH	HINALGVGHA
SW_OTHER_KIME_PYRAB	DKAKEVIISK	LDE.....	...EEKFLK	LGELMNINHG	LLDALGVSTK
SW_OTHER_KIME_PYRHO	DKAKLILSK	LDE.....	...EEKLTK	LGELMNINHG	LLDALGVSTK
SW_OTHER_KIME_PYRFU	EKAKDVILSN	VDE.....	...EEKFER	LGVLNMNINHG	LLDALGVSTK
SW_OTHER_KIME_ARATH	KELAAIIQSK	DETS.....	...VTEKRE	IKELMENNQG	LLLSMGVSHS
SW_OTHER_KIME_METTH	NTAYRELLRN	NTEP.....		LGELMNINQG	LLDSMGVSTR
SW_OTHER_KIME_ARCFU	LEASDVG..S	AER.....		LEELIATNQS	LLRAIGVSNP
SW_OTHER_KIME_AERPE	REALHAIE.K	GDA.....	...ER	LGLIMNNAQG	LLSSLGASSL
SW_OTHER_KIME_SCHPO	KSAVLALTSE	SDK.....	...NSSAKK	LGEPFIVLNQK	LLRCLGVSHY
SW_OTHER_KIME_YEAST	LQGLEINTKL	SKCKGTDEKA	VETNNZLYEQ	LLBLIRINHG	LLVSTGVSHP
SW_OTHER_KIME_METJA	DEALKIK..N	KED.....		PGKLMTKNHE	LLKLNISTP
PARACOCUS	RALEAALLSG	GSP.....		..DAAITENQR	LLRIGVVPFA
Numbering	268				299

图1(续)

SW_ROD_KIME_MOUSE	SLDQLCQVTA	ANG.LHSELT	GAG.....GG	GCGITLLKPG	LEQATVEAAK
SW_ROD_KIME_RAT	SLDQLCQVTA	ANG.LHSELT	GAG.....GG	GCGITLLKPG	LERAKVEAAK
SW_HUM_KIME_HUMAN	SLDQLCQVTR	ARG.LHSELT	GAG.....GG	GCGITLLKPG	LEQPEVEATK
SW_OTHER_KIME_PYRAB	KLSELVYAAR	TAGAIGAKLT	GAG.....GG	GC.MYALAPG	KQRE....VA
SW_OTHER_KIME_PYRHO	KLSELVYAAR	TAGAIGAKLT	GAG.....GG	GC.MYALAPG	KQRE....VA
SW_OTHER_KIME_PYRFU	KLSELVYAAR	VAGALGAKIT	GAG.....GG	GC.MYALAPG	KQRE....VA
SW_OTHER_KIME_ARATH	SIEAVILTTV	KHK.LVSKLT	GAG.....GG	GCVLTLPTG	TVVDK...VV
SW_OTHER_KIME_METTH	ELSMVYEAR	NAGAAGSKIT	GAG.....GG	GS.IAHCPG	CVDD....VV
SW_OTHER_KIME_ARCFU	EIDRTIAELE	RMG.LNAKIT	GAG.....GG	GC.IFGLFKG	EKPK.....
SW_OTHER_KIME_AERPE	EIEETLVYRMR	SAGALGAKLT	GAG.....GG	GCVLGLFKG	EVERG...LE
SW_OTHER_KIME_SCHPO	SIDRVLQATK	SIG..WTKLIT	GAG.....GG	GCTITLLTPE	CKEEFKLCK
SW_OTHER_KIME_YEAST	GLELIKNLSD	DLRIGSTKLT	GAG.....GG	GCSLTLRLRD	ITQEQIDSEK
SW_OTHER_KIME_METJA	KLDRIVDIGN	RFG.FGAKLT	GAG.....GG	GCVLILVNEE	KEKE.....
PARACOCUS	ATOALVAQIE	EAG.GAAKIC	GAGSVRGDGH	GAVLVRIDDA	QAMASVMARH
Numbering	300				348

SW_ROD_KIME_MOUSE	QALTSCG.FD	CWETSIGAPG	VSTHSAAAVG	DPVRQAL.GL	
SW_ROD_KIME_RAT	QALTGCG.FD	CWETSIGAPG	VSMHSATSIE	DPVRQAL.GL	
SW_HUM_KIME_HUMAN	QALTSCG.FD	CLETSIGAPG	VSTHSATSLD	SRVQALDGL	
SW_OTHER_KIME_PYRAB	TAIKIAG.GT	PMITRISKEG	LRIEEVR..		
SW_OTHER_KIME_PYRHO	TAIKIAG.GT	PMITRVSREG	LRIEEVR..		
SW_OTHER_KIME_PYRFU	TAIRIAG.GT	PMITEISREG	LKIEEVIK..		
SW_OTHER_KIME_ARATH	EELESSG.FQ	CPTALIGGNG	AQICY....		
SW_OTHER_KIME_METTH	TALNRN..WK	AMRAEFVKG	LI.....		
SW_OTHER_KIME_ARCFU	G	SPIVEPEKEG	VRIEE....		
SW_OTHER_KIME_AERPE	SVVSSSS..Q	AFTASIAEEG	ARLEP....		
SW_OTHER_KIME_SCHPO	ESLLAHK.NS	IYDVQLGGPG	VSVVTDSDSF	FPQYESDFDF	KKLNLLSKFN
SW_OTHER_KIME_YEAST	KQLQDDFSYE	TFETDLGGTG	CCLLSAKNLN	KDLKIKSLVF	QLFENKTTTK
SW_OTHER_KIME_METJA		.LLKELNKED	VRIFNCRMMN		
PARACOCUS	PDLWAPLRN	SRTGAAPGPA	PRAQPLPGQG		
Numbering	349				378

SW_ROD_KIME_MOUSE	
SW_ROD_KIME_RAT	

图 1(续)

SW_HUM_KIME_HUMAN	
SW_OTHER_KIME_PYRAB	
SW_OTHER_KIME_PYRHO	
SW_OTHER_KIME_PYRFU	
SW_OTHER_KIME_ARATH	
SW_OTHER_KIME_METTH	
SW_OTHER_KIME_ARCFU	
SW_OTHER_KIME_AERPE	
SW_OTHER_KIME_SCHPO	KYYI.....
SW_OTHER_KIME_YEAST	QQIDDLPLPG
SW_OTHER_KIME_METJA	NINLPWTS
PARACOCUS	

图 1(续)

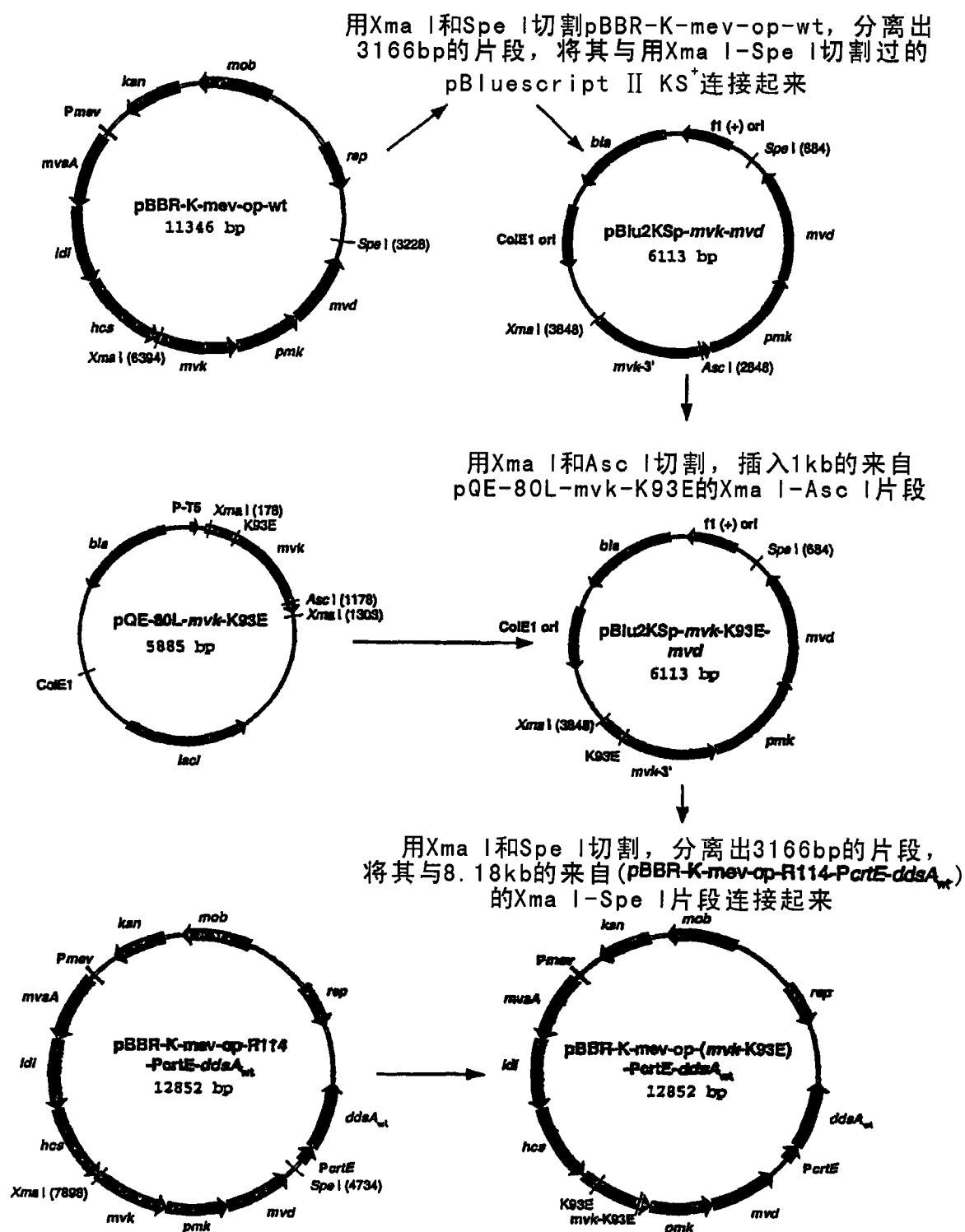


图 2