



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106471120 B

(45)授权公告日 2020.07.03

(21)申请号 201580014607.8

(22)申请日 2015.03.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106471120 A

(43)申请公布日 2017.03.01

(30)优先权数据
2014-058570 2014.03.20 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.09.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2015/058295 2015.03.19

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/141791 JA 2015.09.24

(73)专利权人 国立研究开发法人科学技术振兴
机构
地址 日本崎市

(72)发明人 小西一诚 高谷直树 梶尾俊介

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
代理人 薛琦 钟华

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

C12P 1/04(2006.01)

C12P 7/40(2006.01)

C12P 13/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1509334 A,2004.06.30,

CN 101031652 A,2007.09.05,

CN 1377407 A,2002.10.30,

Ryan A. Mehl et al..Generation of a Bacterium with a 21 Amino Acid Genetic Code.《J. AM. CHEM. SOC.》.2003,第125卷
Veronique blanc et al..Identification and analysis of gene from streptomyces pristinaespiralis encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-1-phenylalanine precursor of pristinamycin I.《Molecular microbiology》.1997,第23卷(第2期),

审查员 郝佳

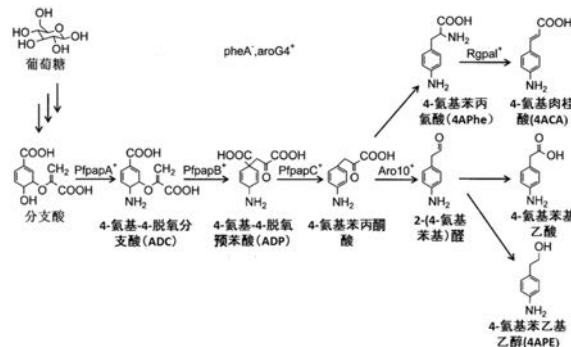
权利要求书1页 说明书13页
序列表39页 附图2页

(54)发明名称

通过发酵法从碳源制备苯胺衍生物的方法

(57)摘要

本发明提供了一种通过发酵法从葡萄糖这样的碳源制备苯胺衍生物的方法。所述苯胺衍生物的制备方法包括以下的工序:在具有从分支酸合成4-氨基苯丙酮酸功能的微生物中,通过导入至少三个外来基因,在规定培养条件下,制作能够生产1.8g/L以上4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的微生物;然后在适于该微生物的繁殖和/或维持的条件下,使该微生物与碳源接触,制备选自由4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物。



CN 106471120 B

1. 一种苯胺衍生物的制备方法,其中,

所述制备方法包括以下的工序:

在具有从分支酸生物合成4-氨基苯丙酮酸功能的微生物中,通过导入至少三个外来基因,在规定培养条件下,制作能够生产1.8g/L以上4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的微生物;然后

在适于该微生物的繁殖和/或维持的条件下,使该微生物与碳源接触,制备选自4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物;其中,

所述至少三个外来基因是分别来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) papA、papB、以及papC;

所述微生物选自大肠杆菌、芽孢杆菌属、棒状杆菌属、假单胞菌属或发酵单胞菌属的细菌、以及酵母(*Saccharomyces*)属或裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)属的酵母组成的组。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,

所述papA、papB、以及papC分别由序列号7、9、5所示的碱基序列构成。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,

在制作所述微生物的工序中,还破坏编码苯丙氨酸合成酶的至少一个基因。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,

所述被破坏了的基因是pheA。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其中,

在制作所述微生物的工序中,还导入选自aroG、aro10以及pa1组成的组中的至少一个外来基因。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述微生物是大肠杆菌。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述碳源选自D-葡萄糖、蔗糖、淀粉、纤维素、米糠、废糖蜜、玉米分解液、以及纤维素分解液组成的组。

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述碳源选自低聚糖和多糖组成的组。

通过发酵法从碳源制备苯胺衍生物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过发酵法从碳源制备苯胺衍生物的方法。更详细而言,本发明涉及利用基因工程的手法,制作被赋予了从分支酸生物合成4-氨基苯丙酮酸的功能的微生物,通过利用了这样的微生物的发酵法,从葡萄糖这样的碳源制备选自4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物的方法。

背景技术

[0002] 近年来,以由来自石油的二氧化碳造成的地球变暖问题为开端,要改变过度依赖石油的社会结构的势头在世界中日益增高。随着这样的潮流,活用生物工艺的“生物精炼”的活动日渐活跃化,在各国正在加速研究,但遗憾的是,实际情况是几乎仍未获得与芳香族化合物的生物合成有关的研究成果,鉴于化学产业的芳香族化合物的重要性,人们正在积极推进芳香族聚合物合成等研究。

[0003] 例如,在以下的专利文献1中,公开了与使用作为天然分子的4-氨基肉桂酸(4ACA)的聚合物合成有关的技术,报告了从4-氨基肉桂酸可以获得高耐热聚合物。

[0004] 此外,如以下的非专利文献1所公开的那样,关于4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的生物合成,经由莽草酸的代谢路径变得清楚(参照本文件第2818页Fig.1),但是并没有公开脱氨酶在生物体内发挥作用、从4-氨基苯丙氨酸向4-氨基肉桂酸转化的内容,也没有这方面的启示。

[0005] 在以下的非专利文献2中记载了以下内容:将酵母粘红酵母JN-1(*Rhodotorula glutinis*)的苯丙氨酸脱氨酶(以下,简称为Rgp1)的基因分离,该酵母以保藏编号M2011490被保藏于CCTCC(China Center For Type Culture Collection、中国典型培养物保藏中心),此外,记载了通过该基因的定点诱变制作最适pH变体。而且,由于以非专利文献2的作者等为发明人的中国专利申请说明书(以下的专利文献2)于2013年4月24日被公开发表,因此这样的Rgp1的序列本身是公知的。然而,并没有公开这样的酶将4-氨基苯丙氨酸作为基质可以生成4-氨基肉桂酸的内容。

[0006] 如此,在作为4-氨基肉桂酸(4ACA)的前体方面,4-氨基苯丙氨酸(4APhe)是重要的物质。

[0007] 此外,在以下的非专利文献3中,如图1所示,公开了分支酸通过PapA(4-氨基-4-脱氧分支酸合成酶)被转化为4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC),ADC通过PapB(4-氨基-4-脱氧分支酸变位酶)被转化为4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP),ADP通过PapC(4-氨基-4-脱氧预苯酸脱氢酶)被转化为4-氨基苯丙酮酸。

[0008] 此外,可以认为4-氨基苯丙酮酸通过微生物的内源性酶的作用被转化为4-氨基苯丙氨酸(4APhe)。

[0009] 此外,在以下的专利文献3中公开了以下内容:至少通过属于氨基脱氧分支酸合成酶的类别的酶的进行催化的、4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)的生物合成获得含有4-氨基-4-

脱氧分支酸(ADC)及4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)的发酵培养液,同时在提高了活性水平的、具有4-氨基-4-脱氧分支酸合成酶的宿主微生物体内,通过发酵来进行,并且这些化合物以一起或单独的任一种方式,从发酵培养液回收。

[0010] 然而,在单纯使用现有已知的pap系基因,即,抗生素生产路径中已知的三种关键酶(例如,委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)的PapA、PapB、PapC)的情况下,发酵法的4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的生产率不超过0.2g/L左右,即使对现有已知的pap系的组合进行各种研究,充其量也只是停留在0.9g/L左右。

[0011] 在通过发酵法从葡萄糖等碳源工业性地大量地制备包含4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)的苯胺衍生物时,这样低的产量就成了阻碍(参照图1)。

[0012] 如上所述,通过发酵法从葡萄糖等碳源通过发酵法能够工业性地大量地获得包含4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)的苯胺衍生物的制备方法尚未确立,并且强烈地希望有这样的开发。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献1:国际公开第2013/073519号

[0016] 专利文献2:CN103060352A说明书

[0017] 专利文献3:日本特表2008-501326号公报

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1:He, et al., *Microbiology* (2001)

[0020] 非专利文献2:Zhou, et al., *Biotechnol Lett* (2013) 35:751-756

[0021] 非专利文献3:*J. AM. CHEM. SOC.* 2003, 125, 935-939

发明内容

[0022] 发明所要解决的问题

[0023] 如上所述,在单纯使用现有已知的pap系基因,即,抗生素生产路径中已知的三种关键酶(例如,委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*) PapA、PapB、PapC)的情况下,发酵法的4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的生产率不超过0.2g/L左右,即使对现有已知的pap系的组合进行各种研究充其量也只是停留在0.9g/L左右。本申请的发明人等将与4-氨基肉桂酸(4ACA)合成有关的酶基因导入使用现有的pap系基因的、生产0.2~0.9g/L的4APhe的转化体,但是并不能合成4ACA。

[0024] 鉴于这样的现有技术的现状,本发明所要解决的问题是提供一种苯胺衍生物的制备方法,该制备方法能够通过发酵法从葡萄糖这样的碳源工业性地大量地获得包括4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)的苯胺衍生物。

[0025] 用于解决问题的方案

[0026] 本申请发明人等为了提高4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的生产率,使用基因数据库探索了编码与委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)的PapA、PapB、PapC具有同源性的

蛋白质的新型pap样基因之后,与大肠杆菌属于相同变形菌门的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescence*) SBW25菌株(De Leij F et al.(1995) *Appl Environ Microbiol* 61:3443-3453) PFLU1770、PFLU1771、PFLU1772分别显示了34% (PapC)、44% (PapA)、28% (PapB)的所述同源性,制作使这些基因表达的重组大肠杆菌并供于4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的发酵,极大地提高了生产率,能够生产1.8g/L的4APhe。即,是在现有技术中不能达成4APhe的克级生产的技术。

[0027] 令人惊奇的,如上所述,即使将与4-氨基肉桂酸(4ACA)合成有关的酶基因导入使用现有的pap系基因的、生产0.2~0.9g/L的4APhe的转化体中,也不能合成4ACA,但是在将该酶基因导入生产1.8g/L的4APhe的转化体的情况下,能够首次合成4ACA。本申请发明人等推测:大肠杆菌中的从分支酸到4-氨基丙酮酸的转化在现有技术中不能高效率地进行,但通过这样的基因改变,变得能够高效率地进行该转化,其结果是,4APhe的产量提高,通过使4APhe的产量超过阈值,能够实现现在不能达成的4ACA的制备。基于这样的发现,本发明的发明人等积极研究并反复进行实验,结果完成了本发明。

[0028] 即,本发明如下所述。

[0029] [1]一种所述苯胺衍生物的制备方法,包括以下的工序:

[0030] 在具有从分支酸生物合成4-氨基苯丙酮酸功能的微生物中,通过导入至少三个外来基因,在规定培养条件下,制作能够生产1.8g/L以上的4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的微生物;然后在适于该微生物的繁殖和/或维持的条件下,使该微生物与碳源接触,制备选自由4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物。

[0031] [2]根据所述[1]中记载的方法,所述至少三个外来基因是papA、papB、以及papC。

[0032] [3]根据所述[2]中记载的方法,所述papA、papB、以及papC分别来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescence*)。

[0033] [4]根据所述[3]中记载的方法,所述papA、papB、以及papC分别由序列号7、9、5所示的序列构成。

[0034] [5]根据所述[1]~[4]中任一项所记载的方法,在制作所述微生物的工序中,还破坏编码苯丙氨酸合成酶的至少一个基因。

[0035] [6]根据所述[5]中记载的方法,所述被破坏的基因是pheA。

[0036] [7]根据所述[1]~[6]中任一项所记载的方法,在制作所述微生物的工序中,还导入选自由aroG、aro10以及pal组成的组中的至少一个外来基因。

[0037] [8]根据所述[1]~[7]中任一项所记载的方法,所述微生物选自由大肠杆菌、芽孢杆菌属、棒状杆菌属、假单胞菌属或发酵单胞菌属的细菌、以及酵母(*Saccharomyces*)属或裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)属的酵母组成的组。

[0038] [9]根据所述[8]中记载的方法,所述微生物是大肠杆菌。

[0039] [10]根据所述[1]~[9]中任一项所记载的方法,所述碳源选自由D-葡萄糖、蔗糖、低聚糖、多糖、淀粉、纤维素、米糠、废糖蜜、玉米分解液、以及纤维素分解液组成的组。

[0040] 发明效果

[0041] 根据本发明的方法,能够通过发酵法从碳源工业性地大量地制备选自由4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯

乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物。

附图说明

[0042] 图1是表示从葡萄糖经由分支酸、4-氨基苯丙酮酸,至4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、4-氨基苯乙基乙醇(4APE)的路径的示意图。

[0043] 图2是表示发酵培养基的组成的表。

[0044] 图3是表示由PFABC Δ Aro菌株进行的4APhe生产的图表。

具体实施方式

[0045] 以下,对本发明的实施方式进行详细的说明。

[0046] 除非另有说明,在本说明书中使用的全部技术或科学用语具有与本公开所属技术领域的技术人员一般理解的意义相同的意义。在公开的方法或组合物的实施中能够使用与本说明书所记载的相同或等价的方法或物质,但在本说明书中记载了示例的方法、装置、物质等。

[0047] 对于用语“微生物”而言,包含来自古细菌领域(domain)、细菌领域、以及真核生物领域的原核微生物种类及真核微生物种类,在后者中,包含酵母、丝状菌、原虫、藻类、或者更加高级的原生生物。

[0048] 在本实施方式中,只要是具有从分支酸生物合成4-氨基苯丙酮酸功能的微生物,任一种都可以,但是优选选自由大肠杆菌、芽孢杆菌属、棒状杆菌属、假单胞菌属或发酵单胞菌属的细菌、以及酵母(Saccharomyces)属或裂殖酵母(Schizosaccharomyces)属的酵母组成的组,从迅速的生育能力、发酵管理的容易度的观点考虑,特别优选大肠杆菌。

[0049] 用语“重组微生物”和“重组宿主细胞”在本说明书中互换地使用,是指以表达或过量表达内源性的多核苷酸、或者表达载体中所包含的物质等异种多核苷酸的方式在遗传性上改变了的微生物,或者具有内源性基因的表达变化的微生物。“变化”是指基因的表达,或者编码一个或多个多肽、多肽亚基的RNA分子或等价的RNA分子的水平,或者表达上调或表达下调一个或多个多肽、多肽亚基的活性,其结果是,表达、水平、或者活性与在没有变化的状态下观察相比较较大或较小。

[0050] 关于基因序列,用语“表达”是指基因的转录、及在适当的情况下,获得的mRNA转录产物的、向蛋白质的翻译。因此,正如由上下文而变清楚那样,蛋白质的表达从开放阅读框(Open Reading Frame)序列的转录以及翻译开始产生。宿主细胞的所需的产物的表达水平能够基于存在、对应于细胞中的mRNA的量,或通过选择的序列编码的所需的产物的量而求得。例如,从选择的序列转录的mRNA能够通过PCR或Northern杂交来定量化(参照Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。通过选择的序列编码的蛋白质能够通过各种方法来定量化,例如,通过使用与蛋白质反应识别、结合的抗体的ELISA、通过检测蛋白质的生物活性、或者通过不依存这样的活性的检测,例如,使用蛋白质印迹法或者放射免疫分析法等来定量化。参照上述Sambrook et al.。一般而言,编码与用于产生所需的代谢产物的代谢路径有关的目标酶。

[0051] 用语“重组微生物”及“重组宿主细胞”不仅是指特定的重组微生物,也可以理解为

是指这样的微生物的后代或潜在后代。由于突变或环境的影响,由于在世代接替中可以引起某种特定的改变,因此这样的后代实际上有时与亲代细胞并不相同,但是在本说明书中使用的情况下,依然包含在该用语的范围内。

[0052] 用语“操作”是指在微生物中产生能够检测的变化的、微生物的任意处理,该处理并不仅限于此,但是包含对于微生物插入异种的多核苷酸和/或多肽、以及使微生物所固有多核苷酸和/或多肽突变。

[0053] 用语“在代谢上进行操作”或“代谢的操作”是指用于所需的代谢产物的产生的,伴随生物合成基因、与操纵子相关的基因、以及这样的多核苷酸的控制要素的合理的路径设计及装配。“在代谢上进行操作”还能够包括:使用包括与到达所需的路径的中间体竞争的竞争代谢路径的降低、破坏或敲除的基因操作以及适当的培养条件的,转录、翻译、由蛋白质的稳定性及蛋白质的功能性的调节以及最优化得到的、代谢通量的最优化。

[0054] 用语“在代谢上进行操作了的微生物”以及“改变了的微生物”在本说明书中能够互换地使用,不仅是指特定的对象细胞,也指这样的细胞的后代或潜在后代。由于突变或环境的影响,由于在世代接替中可以引起某种特定的改变,因此这样的后代实际上有时与亲代细胞并不相同,但是在本说明书中使用的情况下,依然包含在该用语的范围内。

[0055] 用语“生物合成路径”也称为“代谢路径”,是指用于将一种化学物质转化为其他的化学物质的一系列同化或异化的生化反应。在基因产物以并列、或连续的方式在相同的基质上发挥作用,产生相同的产物;或者在相同的基质和代谢产物最终生成物之间的代谢中间体(即,代谢产物)上发挥作用、或产生该代谢中间体的情况下,该基因产物属于相同的“代谢路径”。

[0056] 用语“异种的(外来)”表示分子,特别是在参照酶及多核苷酸在本说明书中使用的情况下,表示在分子来源的生物、或在自然中发现的生物以外的生物中表达的分子,与表达水平无关,该表达水平能够低于、等于、或高于天然微生物的分子表达水平。

[0057] 用语“天然的”或“内源性的”,表示分子,特别是在参照酶以及多核苷酸在本说明书中使用的情况下,表示在分子来源的生物、或自然中发现的生物中表达的分子,与表达水平无关,该表达水平能够低于、等于、或高于天然微生物的分子表达水平。可以理解为天然的酶或多核苷酸的表达能够在重组微生物中改变。

[0058] 用语“供给原料”定义为向微生物或发酵过程供给的原料、或原料的混合物,能够由此制作其他的产物。例如,生物质或来自生物质的碳化合物等碳源是在发酵过程用于产生生物燃料的微生物的供给原料。供给原料能够含有碳源以外的营养成分。

[0059] 用语“碳源”一般是指为了原核生物增值或真核细胞增值,适用用作碳的供给源的物质。作为碳源并不仅限于此,可以举出生物质加水分解物、淀粉、蔗糖、纤维素、半纤维素、木糖、木质素、以及这些基质的单体成分。碳源不限于此,能够包括含有聚合物、糖、酸、醇、醛、酮、氨基酸、多肽等的、各种形态的各种有机化合物。作为这些有机化合物能够举出例如各种单糖,例如葡萄糖、右旋糖(D-葡萄糖)、麦芽糖、低聚糖、多糖、饱和或不饱和脂肪酸、琥珀酸、乳酸、醋酸、乙醇、米糠、废糖蜜、玉米分解液、纤维素分解液、或者它们的混合物。

[0060] 用语“基质”或者“适当的基质”是指通过酶的作用能转化为其他的化合物、或表示能被转化的任意物质或化合物。该用语不仅是一种化合物,也包含化合物的组合,例如,含有至少一种基质或其衍生物的溶液、混合物、其他物质。而且,用语“基质”不仅是提供适于

用作来自任意生物质的糖等起始原料的碳源的化合物,也包括如本说明书所记载那样的、在与在代谢上进行操作的微生物相关的路径中使用的中间体及最终生成物代谢产物。

[0061] 用语“发酵”或“发酵法”定义为微生物在含有供给原料及营养成分等原料的培养基中进行培养的过程,微生物将供给原料等原料转化为产物。

[0062] 用语“规定的培养条件”是指在以下实施例中定义的发酵培养条件。

[0063] 用语“多核苷酸”在本说明书中与用语“核酸”互换地使用,是指由包括核苷酸、核甙、或者它们的类似物的两个以上的单体形成的有机聚合物,它们不限于此,但是在任意长度的单链或双链的、正义或反义脱氧核糖核酸(DNA)、以及适当的情况下,包含含有siRNA的、任意长度的单链或双链的、正义或反义核糖核酸(RNA)。用语“核苷酸”是指由结合于嘌呤或嘧啶碱基以及磷酸基的核糖或脱氧核糖形成的、是核酸的碱基结构单位的、任意的、几个化合物。用语“核甙”是指由与脱氧核糖或核糖结合的嘌呤或嘧啶碱基形成的、特别在核酸中发现的化合物(鸟苷或腺苷)。用语“核苷酸类似物”或“核甙类似物”分别是指一个或多个各种原子被不同的原子或不同的官能团取代了的核苷酸或核甙。因此,用语多核苷酸包括任意长度的核酸、DNA、RNA、它们的类似物以及片段。三个以上核苷酸的多核苷酸也称为核苷酸低聚物或者寡核苷酸。

[0064] 可以理解为在本说明书所记载的多核苷酸中包括“基因”,在本说明书所记载的核酸分子中包括“载体”或“质粒”。因此,用语“基因”也称为“结构基因”,是指编码构成一个或多个蛋白质、或酶的全部或一部分的氨基酸的特定的序列的多核苷酸,能够包括启动子序列等控制(不转录)DNA序列,该序列例如决定基因表达的条件。基因的转录区域能够包含内含子、5' -非翻译区域(UTR)、以及3' -UTR、和包含编码序列的非翻译区。

[0065] 用语“载体”是能够在生物、细胞或细胞成分间搬运和/或移动核酸的任意手段。作为载体,能够举出病毒、噬菌体、前病毒、质粒、噬菌粒、转座子、以及例如YAC(酵母人工染色体)、BAC(细菌性人工染色体)、以及PLAC(植物人工染色体)等的人工染色体,它是“附加体”,即,能够自发地复制,与宿主细胞的染色体组合。载体可以是裸RNA多核苷酸、裸DNA多核苷酸、在相同链内由DNA及RNA的双方构成的多核苷酸、聚赖氨酸结合DNA或RNA、肽结合DNA或RNA、脂质体结合DNA等,它本质上不是附加体,或者载体能够设为包含所述多核苷酸结构中的一个或多个的生物,例如,农杆菌或细菌等。

[0066] 用语“转化(transformation)”是指将载体导入宿主细胞中的过程。转化(或转导、或转染)能够通过包括化学物质转化(例如,醋酸锂转化)、电穿孔、显微注射、微粒子銃(或者粒子轰击介导递送)、或者农杆菌介导转化的几个方法中的任一个来实现。

[0067] 用语“酶”在本说明书中使用的情况下,是指催化或促进一个或多个化学或生物化学反应的任意的物质,其通常包括完全或部分由多肽构成的酶,但也能够包括由含有多核苷酸的不同分子构成的酶。

[0068] 用语“蛋白质”或者“多肽”在本说明书中使用的情况下,表示由两个以上的氨基酸单体和/或其类似物构成的有机聚合物。在本说明书中使用情况下,用语“氨基酸”或“氨基酸单体”是指包括甘氨酸及D或L的两种光学异构体的任意的天然和/或合成氨基酸。用语“氨基酸类似物”是指一个或多个的各个原子被不同的原子,或不同的官能团取代了的氨基酸。因此,用语多肽包括全长的蛋白质及肽、以及包含它们的类似物及片段的、任意长度的氨基酸聚合物。三个以上氨基酸的多肽也称为蛋白质低聚物或寡肽。

[0069] 如上所述,本发明的第一方式是一种苯胺衍生物的制备方法,包括以下工序:

[0070] 在具有从分支酸生物合成4-氨基苯丙酮酸的功能的微生物中,通过导入至少三个外来基因,在规定培养条件下,制作能够生产1.8g/L以上的4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的微生物;然后

[0071] 在适于该微生物的繁殖和/或维持的条件下,使该微生物与碳源接触,制备选自由4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物。

[0072] 所述至少三个外来基因优选为papA、papB、以及papC,更优选为分别来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescence*)的该papA、papB、以及papC,进一步优选地为分别由序列号7、9、5所示的核苷酸序列构成的该papA、papB、以及papC。

[0073] 但是,在本发明中,所述至少三个外来基因编码的氨基酸序列包含分别由具有与序列号8、10、6所示的氨基酸序列相比至少90%的序列一致性的氨基酸序列构成的、并且具有PapA、PapB、以及PapC酶活性的蛋白质,这样的序列一致性能够是至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%以及99%。

[0074] 此处,“序列一致性”意味着在多肽序列(或者氨基酸序列)或者多核苷酸序列(或者碱基序列)的两个链之间,在构成该链的各氨基酸残基之间或各碱基之间的相互的适合关系中能够决定为一致的量(数),意味着两个多肽序列或者两个多核苷酸序列之间的序列相关性的程度。一致性能够很容易地算出。测定两个多核苷酸序列或者两个多肽序列之间的一致性的方法有许多是已知的,“序列一致性”的用语对于本领域技术人员来说是众所周知的。

[0075] 而且,在本发明中,在所述至少三个外来基因编码的氨基酸序列中包含:由在序列号8、10、6所示的氨基酸序列中,缺少、置换、插入、或者增加一个或数个氨基酸的氨基酸序列构成的、并且具有PapA、PapB、以及PapC酶活性的蛋白质。此处,“数个”能够是至多10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个或者2个。

[0076] 变异DNA能够通过例如化学合成、基因工程的手法、诱发突变等本领域技术人员已知的任意方法进行制造。具体而言,对由编码序列号8、10、6所示的氨基酸序列的核苷酸序列构成的DNA,使用与作为诱变剂的药物接触作用的方法、照射紫外线的方法、基因工程的手法等,通过向这些DNA导入变异,能够取得变异DNA。此处,作为基因工程的手法中的一种的定点诱变法由于是能够在特定的位置导入特定的变异的手法,因此有用,能够按照 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989等所记载的方法来进行。通过使用适当的表达系统使该变异DNA表达,能够获得由缺失、置换、插入、或增加一个或数个氨基酸的氨基酸序列形成的蛋白质。

[0077] 而且此外,在本发明中,所述至少三个外来基因包含序列号7、9、5所示的核苷酸序列与由互补的碱基序列形成的核酸在高严格条件下进行杂交,并且编码具有PapA、PapB、以及PapC酶活性的蛋白质的核苷酸序列形成的核酸。

[0078] 在本说明书中,“严格(stringent)条件”是指使能够选择且检测多核苷酸和DNA基因组的特异组合成为可能的条件。严格条件通过盐浓度、有机溶剂(例如,甲酰胺)、温度、其他的公知条件的适当组合来定义。即,通过是否降低盐浓度、是否增加有机溶剂浓度、是否

使杂交温度上升来增加严格性。而且,杂交后的清洗条件也影响严格性。此外,该清洗条件也通过盐浓度和温度定义,通过盐浓度的减少和温度的上升来增加清洗的严格性。因此,“严格条件”意味着仅在各碱基序列间的一致性的程度是例如,整体平均约为90%以上那样的、具有高一致性的碱基序列间,特异地形成有杂交的条件。具体而言,“严格条件”是指在约45℃下以 $6.0 \times \text{SSC}$ 进行杂交后,在50℃下以 $2.0 \times \text{SSC}$ 进行清洗。由于严格的选择,清洗工程中的盐浓度能够选择例如从作为低严格的约 $2.0 \times \text{SSC}$ 、50℃到作为高严格的约 $0.1 \times \text{SSC}$ 、50℃。而且,还能够使清洗工程的温度从低严格条件的室温、约22℃增大到高严格条件的约65℃。杂交能够按照本领域公知的方法、以公知的方法为标准的方法进行。此外,在使用市售的基因库的情况下,能够按照随附的使用说明书所记载的方法进行。

[0079] 在本实施方式中,在制作所述微生物的工序中,还优选破坏编码苯丙氨酸合成酶的至少一个基因,例如,pheA。此外,还优选导入选自自由aroG、aro10以及pal组成的组中的至少一个外来基因。

[0080] 以下,对与发明的代谢路径有关的酶进行说明。

[0081] 从分支酸到4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)的生物合成根据K.S.Anderson et al., JACS 113 (1991) 3198-3200是公知的。在Parsons et al., Biochem 42 (2003) 5684-5693的第5690页,对此记载了ADC在明显不满足的基质的吩嗪生物合成PhzD蛋白质的影响下ADC仅能勉强地进行加水分解。此外,由于ADC合成在自然界是从分支酸到叶酸(folate)合成中的第1工序,因此,氨基脱氧分支酸合成酶在自然界能够大量地获得。可以推测它们存在于所有的叶酸营养型有机体中,例如,细菌、酵母、植物、以及低级真核生物。已知氨基脱氧分支酸合成酶也与p-氨基苯甲酸的合成有关。

[0082] 在本发明中,使用了尚未确认从分支酸向4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)的转化活性的papA样基因(PfpapA)。

[0083] 由于从4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)向4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)的生物合成路径根据例如Teng et al., J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 5008-5009是公知的,但是可以认为ADP的生物合成及回收正如其对于ADC是公知那样,恐怕生成物ADP是不稳定,因此没有被记载过。该文献与Blanc et al., Mol. Mic. 23 (1997) 191-202的公开相同,示出了4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)和4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)的、各自能够向4-氨基苯丙氨酸(4APhe)生物合成的路径,但是完全没有启示生成物ADC及ADP的、各自向4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的发酵路径及回收。如上所述,在专利文献3中,公开了至少通过属于氨基脱氧分支酸合成酶类别的酶进行催化的、4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)的生物合成通过获得含有4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)及4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)的发酵培养液,同时在提高了的活性水平下在具有4-氨基-4-脱氧分支酸合成酶的宿主微生物体内进行发酵来进行,并且,这些化合物一起或单独地从发酵培养液回收。

[0084] 在本发明中,使用了尚未确认从4-氨基-4-脱氧分支酸(ADC)向4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)的转化活性的papB样基因(PfpapB)。

[0085] 在从4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)向4-氨基苯丙酮酸的生物合成路径中,涉及4-氨基-4-脱氧预苯酸脱氢酶。4-氨基-4-脱氧预苯酸脱氢酶是进行ADP的氧化脱碳酸的酶,是使ADP的1位羧基脱离,生成具有芳香环的4-氨基苯丙酮酸的酶。在本发明中,使用了尚未确认从4-氨基-4-脱氧预苯酸(ADP)向4-氨基苯丙酮酸的转化活性的papC样基因(PfpapC)。

[0086] 在从4-氨基苯丙酮酸向4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的生物合成路径中,涉及氨基转移酶。氨基转移酶是将氨基酸的氨基向 α -酮酸转移的酶,并已知酪氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶等与芳香族氨基酸的生物合成有关。此时,利用谷氨酸作为氨基供体。在本发明中,在从4-氨基苯丙酮酸向4-氨基苯丙氨酸(4APhe)的转化中,使用了宿主微生物的内源性酶。

[0087] 在从4-氨基苯丙氨酸(4APhe)向4-氨基肉桂酸(4ACA)的生物合成路径中,涉及脱氨酶。脱氨酶是指使苯丙氨酸脱氨酶、酪氨酸脱氨酶、组氨酸脱氨酶等芳香族氨基酸的 α -氨基脱离生成 α - β 不饱和羧酸和氨的酶,最好是来自NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)保藏号NP_187645.1、NCBI保藏号DQ013364.1、NCBI保藏号EGU13302.1、以及NCBI保藏号KF770992.1等植物、微生物的脱氨酶。

[0088] 苯丙氨酸脱氨酶(Pal)是具有将苯丙氨酸转化为肉桂酸的活性的酶,到目前为止,成功地使用使来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的Pal4基因(野生型、及变异型的F126E、F126D)或者粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)的PAL基因(RgPal)表达的大肠杆菌进行休止菌体反应,将4APhe转化为4ACA。

[0089] 在本发明中,在从4-氨基苯丙氨酸(4APhe)向4-氨基肉桂酸(4ACA)的转化中使用了RgPal。

[0090] 在从4-氨基苯丙酮酸向2-(4-氨基苯基)醛的生物合成路径中,涉及脱羧酶。脱羧酶是指使丙酮酸衍生物的羧基脱离生成醛衍生物和二氧化碳的酶,特别是,使用能够将以苯丙酮酸为首的芳香族丙酮酸衍生物作为基质来利用的脱羧酶。为了该目的,使用来自酵母的苯丙酮酸脱羧酶(NCBI保藏号NM_001180688.3),也能够利用NCBI保藏号XP_002498188、NCBI保藏号XP_444902.1等类似的酶。

[0091] 在本发明中,在从4-氨基苯丙酮酸向2-(4-氨基苯基)醛的转化中,使用已知将苯丙酮酸转化为苯乙醛的苯丙酮酸脱羧酶的酵母Aro10。

[0092] 在从2-(4-氨基苯基)醛向4-氨基苯基乙酸的生物合成路径中,涉及醛脱氢酶。醛脱氢酶是以 NAD^+ 或 NADP^+ 作为辅酶、将醛氧化获得羧酸的酶,可以使用来自原核生物、真核生物的醛脱氢酶。特别是,可以使用能够将以苯乙醛为首的芳香族醛作为基质来利用的醛脱氢酶。特别是,为了该目的,可以使用作为来自酵母的苯乙酰胺醛脱氢酶的NCBI保藏号NP_013893.1、NCBI保藏号NP_013892.1、与他们类似的酶。

[0093] 在从2-(4-氨基苯基)醛向4-氨基苯乙醇(4APE)的生物合成路径中,涉及醇脱氢酶。醇脱氢酶是以 NADH 或 NADPH 作为辅酶还原醛获得醇的酶,可以使用来自原核生物、真核生物的醇脱氢酶。特别是,可以使用能够将以苯乙醛为首的芳香族醛作为基质来利用的醇脱氢酶。特别是,为了该目的,能够使用作为来自酵母的醇脱氢酶的NCBI保藏号NP_014555.1、NCBI保藏号NP_014032.1、NCBI保藏号NP_013800.1、NCBI保藏号NP_011258.1、NCBI保藏号NP_009703.1、以及与他们类似的酶。也能够利用苯胺衍生物的生产宿主表达的、来自生产宿主的酶。

[0094] 在本发明中,在从2-(4-氨基苯基)醛向4-氨基苯乙醇(4APE)的转化中,使用了宿主微生物的内源性酶。

[0095] 此外,大肠杆菌的AroG及AroF是在芳香族氨基酸的生物合成路径中催化初步反应的酶的一种,并在3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸7-磷酸的合成中使用。已知AroG的酶活性被苯

丙氨酸抑制。对反馈抑制表现耐性的变异型AroG,在使用大肠杆菌的芳香族氨基酸及其类似物的高生产率中利用,但是AroG4是该变异型AroG的一种。此处,在以下的实施例中,导入了AroG4。

[0096] 此外,大肠杆菌的PheA为苯丙氨酸合成系的酶,具有将分支酸(chorismate)转化苯丙酮酸(phenylpyruvate)的活性。由于分支酸也是PapA的基质,因此可以预见通过破坏pheA基因,作为PapA基质的分支酸的宿主细胞内浓度上升。此处,在以下的实施例中,破坏了pheA基因。

[0097] 实施例

[0098] 通过以下的实施例等对本发明进行具体的说明。

[0099] 发酵培养基的组成

[0100] 在图2中表示发酵培养基的组成。在发酵中,使用以下培养条件,并将此设为本说明书的“规定培养条件”。

[0101] 规定的培养条件

[0102] (前培养)

[0103] 向试管中加入4ml的液体的以下LB培养基,向其中添加100 μ l大肠杆菌的甘油保存液,在37 $^{\circ}$ C、120rpm下培养6小时。

[0104] (培养基组成(/L))

[0105] 在以下的表1中表示LB培养基组成。使用了用高压灭菌器进行121 $^{\circ}$ C、15分钟灭菌了的培养基。

[0106] 表1

[0107]	LB培养基pH7.0	
	Tryprone	10g/L
	Yeast extract	5g/L
	NaCl	10g/L

[0108] (本培养)

[0109] 在50ml的试管中加入5ml的所述发酵培养基,向其中添加500 μ l前培养液并在37 $^{\circ}$ C、120rpm下培养12小时。随后,添加IPTG以使最终浓度成为0.1mM,再培养12小时。使用了烧瓶的培养如下所述:在500ml的带翼烧瓶中,加入以最终浓度为10g/l的方式添加了葡萄糖的100ml的所述发酵培养基,向其中添加500 μ l前培养液并在30 $^{\circ}$ C下进行培养。需要说明的是,在使用大肠杆菌NST37(DE3)(ATCC 31882,美国专利第4,681,852号,基因型aroG, aroF, pheA, tyrR, tyrA, trpE)或其衍生物作为表达用宿主时,在培养基中添加酪氨酸和色氨酸以使酪氨酸和色氨酸成为0.05g/l。在IPTG的表达诱导后,在每培养12小时,添加葡萄糖以使葡萄糖成为5g/l。在培养36小时后,调查作为评价对象化合物的4APhe的产量。

[0110] 菌株的制作

[0111] (pheA基因破坏菌株的制作)

[0112] 按照Baba, T. et al. Mol. Syst. Biol. 2, 2006.0008 (2006) 所报告的顺序,使用含有与pheA基因的ORF外侧50bp相同的序列及FRT序列的引物(Primer set)(序列号4:5'-gtgaaacagtacgggtactgtactaaagtcacttaaggaacaacatggaagttcctattctctagaaagtata ggaacttctggacagcaagcgaaccggaattgc-3';以及序列号3:5'-gatgattcacatcatccggcacctttt

catcaggttgatcaacaggcagcgaagttcctatactttctagagagaat aggaacttctcagaagaactcgtca agaaggcg-3'),以pZE21MCS (Lutz and Bujard, Nucl. Acids Res. (1997) 25 (6) :1203-1210) 为模板扩增了卡那霉素耐性基因。将获得的基因片段作为破坏用基因盒。通过将NST37菌株 (ATCC 31882、美国专利第4,681,852号、基因型aroG, aroF, pheA, tyrR, tyrA, trpE) 的基因组上的含有pheA基因区域利用Red (注册商标) /ET (注册商标) Recombination置换为破坏用基因盒,获得pheA基因破坏菌株。基因破坏菌株的基因组上的卡那霉素耐性基因利用FLP-FRT recombination system去除。将获得的pheA基因破坏菌株命名为NST37 (DE3) / Δ pheA菌株。此外,该菌株在不含有苯丙氨酸的M9培养基中不能繁殖。

[0113] (aroG4、aroF表达用质粒的构筑)

[0114] 利用GeneScript公司的人工基因合成服务,合成在末端包含具有EcoRI和HindIII裂解位点的aroG4基因的DNA片段(序列号1、APPL. ENVIRON. MICROBIOL、63,761-762 (1997))。用T4DNAPolymerase将其平滑化之后,连接于具有预先用EcoRV切割了的氯霉素耐性基因的pACYC184 (日本基因公司)。将获得的质粒作为pACYC-aroG4。将其导入NST37 (DE3) / Δ pheA,制作NST37 (DE3) / Δ pheA/pACYC-aroG4菌株。

[0115] (PFLU1770、PFLU1771、PFLU1772表达用质粒的构筑)

[0116] 使用基因数据库搜索编码与委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) 的PapABC显示同源性的蛋白质的基因之后,属于和大肠杆菌相同变形菌门的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*) SBW25菌株 (De Leij F et al. (1995) Appl Environ Microbiol 61:3443-3453) 的PFLU1770、PFLU1771、PFLU1772分别显示了34% (PapC)、44% (PapA)、28% (PapB) 的同源性。此处,制作使这些基因表达的重组大肠杆菌,调查4APhe的产量。

[0117] 利用GeneScript公司的人工基因合成服务,合成了属于和大肠杆菌相同变形菌门的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*) SBW25菌株的PFLU1770基因(序列号5、PfPapC基因)、PFLU1771基因(序列号7、PfPapA基因)、以及PFLU1772基因(序列号9、PfPapB基因)。此时,将各基因的碱基序列的密码子在大肠杆菌的表达用最优化。通过将连接于pUC57 (Genescript公司) 的各基因,用各种限制酶切割,并连接于pETduet-1 (Novagen公司)、pRSFduet-1 (Novagen公司) 或pCDFduet-1 (Novagen公司),来构筑pET-PFLU1771、pRSF-PFLU1771、pCDF-PFLU1771、pET-PFLU1770_1772、pRSF-PFLU1770_1772、以及pCDF-PFLU1770_1772。即,人工基因合成PFLU1771 (Pf papA),导入pETduet-1来制作pET-PFLU1771。此外,人工基因合成PFLU1770 (Pf papC) 和PFLU1772 (Pf papB),插入pCDFduet-1来制作pCDF-PFLU1770_1772。

[0118] (SvpapABC、SppapBC表达质粒的构筑)

[0119] 制作以下的三种质粒。此时,作为PCR的模板,使用委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) (ATCC保藏号10712) 以及始旋链霉菌 (*Streptomyces pristinaespiralis*) (ATCC保藏号25486) 的全部DNA。

[0120] pET-svpapA:使用以下的引物对(序列号11:5' -gacacatatgcgccagcgttctgatcgac-3' 和序列号12:5' -gacgatatcatcgggcccggccacggc-3') 通过PCR扩增包含svPapA基因 (He et al., Microbiol, 147:2817-2829 (2001)) 的DNA片段。使用限制酶NdeI和EcoRV使其消化,并连接于使用相同的酶处理了的pETduet-1,获得了pET-svpapA。

[0121] pRSF-svpapBC: 使用以下的引物对(序列号13:5'-gagccatgggcaccgagcagaacgagctg-3'和序列号14:5'-cagaagcttcaccgccggtcctcgccgctc-3')通过PCR扩增包含svPapB基因(He et al., Microbiol, 147:2817-2829 (2001))的DNA片段。使用限制酶NcoI和HindIII将其消化,并连接于使用相同酶处理了的pRSFduet-1,获得质粒。将使用以下引物对(序列号15:5'-cagagacatatgagcggcttccccgcag-3'和序列号16:5'-gactcgagtcacgcgtccttctcgcttcg-3')通过PCR扩增而获得的包含svPapC基因(He et al., Microbiol, 147:2817-2829 (2001))的DNA片段连接于所获得的质粒的NdeI-XhoI部位,从而获得pRSF-svpapBC。

[0122] pRSF-sppapBC: 使用以下引物对(序列号17:5'-cagccatgggcacccccgccgcatcccc-3'和序列号18:5'-cagaagcttcacgacacggccccccgag-3')通过PCR扩增包含spPapB基因(Blanc et al., Mol. Microbiol. 23:191-202 (1997))的DNA片段。使用限制酶NcoI和HindIII将其消化,并连接于使用相同酶处理了的pRSFduet-1,获得质粒。将使用以下引物对(序列号19:5'-cagagacatatgaggggtggttcggttcg-3'和序列号20:5'-cagatatcagtcagggcggtgaacatc-3')通过PCR扩增而获得的包含spPapC基因(Blanc et al., Mol. Microbiol. 23:191-202 (1997))的DNA片段连接于所获得的质粒的NdeI-EcoRV部位,从而获得pRSF-sppapBC。

[0123] (Aro10表达用质粒的构筑)

[0124] 以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C(ATCC 204508)的基因组作为模板,使用以下引物对(序列号21:5'-gagccatggcacctgttacaattga-3'和序列号22:5'-gacggatcctatTTTTTatttcttttaaagtgc-3')通过PCR扩增Aro10基因(序列号23)。使用限制酶NcoI和BamHI将其消化,并连接于使用相同酶处理了的pRSF-duet1,从而获得pRSF-aro10。

[0125] (pET-PFLU1771_Rgpal的制作)

[0126] 使用以下引物对(序列号25:5'-gacggatccgatggccccctccgtcgactc-3'和序列号26:5'-gctgaattcttatgccatcatcttgacgag-3')通过使用PCR扩增包含来自酵母粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)的PAL基因(序列号27)(RgPAL基因)的DNA片段。使用限制酶BamHI和EcoRI将其消化,并连接于使用相同酶处理了的pET-PFLU1771,从而获得pET-PFLU1771_Rgpal。

[0127] (pRSF-Rgpal的制作)

[0128] 使用以下引物对(序列号25和序列号26)通过PCR扩增包含RgPAL基因的DNA片段。使用限制酶BamHI和EcoRI将其消化,并连接于使用相同酶处理了的pRSFduet-1,从而获得pRSF-Rgpal。

[0129] 使用发酵罐的培养

[0130] 向包含500ml的4APhe生产用培养基的、1.0L容积发酵罐(BMJ-1:Biotta)中,接种1/10量的在LB培养基培养了的前培养液。以0.6L/min通入空气,并将搅拌速度设定为500r.p.m.在O.D.达到0.4-0.5时添加IPTG以使最终浓度是0.1mM。使用进给控制系统BF510(ABLE Biott公司)进行在葡萄糖统计的培养。此时,设定BF510,以使在每1小时测定葡萄糖浓度,当测定值低于1.5g/l时,向培养槽添加1g葡萄糖、0.2g氯化铵。

[0131] 样品的各种分析法

[0132] 细胞浓度使用分光光度计(UVmini-1240)在600nm下进行测量。葡萄糖浓度的测量

使用葡萄糖检测试剂盒(Wako),通过比色定量来进行。培养基中的4APhe的浓度测量使用HPLC(1200infinity series:Hewlett Packerd),测量210、254以及280nm的波长的吸光度作为指标。

[0133] 实施例1

[0134] 将所述pET-PFLU1771和所述pCDF-PFLU1770_1772导入大肠杆菌NST37(DE3) / Δ pheA/pACYC-aroG4获得PFABC Δ Aro菌株。将IPTG浓度设为0.1mM将各菌株在所述的“规定的培养条件”下进行培养,调查培养36小时后的4APhe的产量。其结果是,PFABC Δ Aro菌株生产了1.8g/L的4APhe。

[0135] 比较例1

[0136] 在利用和实施例1相同的手法,使用始旋链霉菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)的papABC(pET-spPapA和pRSF-spPapBC)的情况下,获得0.2g/L的4APhe。此外,在使用委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)的papA(pET-svpapA)和始旋链霉菌的papBC(pRSF-sppapBC)的情况下,能够获得0.9g/L的4APhe,但是不如实施例1的结果理想。

[0137] 实施例2:PFABC Δ Aro菌株在发酵罐的培养

[0138] 使用所述的“使用发酵罐的培养”所示的方法,在使用PFABC Δ Aro菌株进行培养之后,如图3所示,成功地生产了最大4.0g/L的4APhe(对糖收率:15%)。在产量不产生变化的培养44小时的对糖收率为13%。

[0139] 实施例3:4-氨基肉桂酸(4ACA)的生产

[0140] 将所述pET-PFLU1771_Rgpal、所述pCDF-PFLU1770_1772、所述pRSF-Rgpal的三种质粒导入大肠杆菌NST37(DE3) / Δ pheA/pACYC-aroG4。将获得的菌株使用发酵罐进行培养之后,生产了3mg/L的4ACA。

[0141] 比较例2

[0142] 与此相反,在和实施例3相同培养条件下,在使用现有的pap系基因的情况下,不能生产4ACA。

[0143] 实施例4:4-氨基苯乙基乙醇(4APE)的生产

[0144] 使用酵母的Aro104尝试发酵生产APE。培养将pRSF-aro10导入PFABC Δ Aro而获得菌株。此时,在IPTG浓度0.1mM或0.3mM的任一种中,培养24小时后,确认4APE的积累。

[0145] 产业上的可利用性

[0146] 通过本发明所涉及的方法,能够通过发酵法从碳源工业性地大量地制备选自4-氨基苯丙氨酸(4APhe)、4-氨基肉桂酸(4ACA)、2-(4-氨基苯基)醛、4-氨基苯基乙酸、以及4-氨基苯乙基乙醇(4APE)组成的组中的至少一种苯胺衍生物。

<110> 国立研究开发法人科学技术振兴机构

<120> 通过发酵法从碳源制备苯胺衍生物的方法

<130> P1610647WP

<150> JP 2014-058570

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2099

<212> DNA

<213> aroG4 cDNA

<220>

<221> CDS

<222> (508).. (1560)

[0001]

<400> 1

aagcttgcat gcctgcaggt cgacgttatt tggcgcgaca ttttcacggg cgtcaggggc 60

tacctggccc gcatcagctg cggcgtttgc tggccgttat tagtttgcgc tccgcatcgg 120

cagccagtgc ggcaccgegg caaggcttag agtggcagtc agaaataatg tggccagttt 180

tgtcattttc ataggatgct cctgttatgg tcgttatgtc ggataacctc ttccaacagt 240

gcatttgcag gtgaatataa ggcatttggt taagatttca gccaggttat gaaacgcagc 300

agagaatctt gaaataatta acaaacaaag gagttacagt tagaaattgt aggagagatc 360

tcgtttttcg cgacaatctg gcgtttttct tgctaattct aggattaatc cgttcatagt 420

gtaaaacccc gtttacacat tctgacggaa gatatagatt ggaagtattg cattcactaa 480

gataagtatg gcaacactgg aacagac atg aat tat cag aac gac gat tta cgc 534

Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg

1

5

atc aaa gaa atc aaa gag tta ctt cct cct gtc gca ttg ctg gaa aaa 582

Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys

10	15	20	25	
ttc ccc gct act gaa aat gcc gcg aat acg gtt gcc cat gcc cga aaa				630
Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys				
	30	35	40	
gcg atc cat aag atc ctg aaa ggt aat gat gat cgc ctg ttg gtt gtg				678
Ala Ile His Lys Ile Leu Lys Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val				
	45	50	55	
att ggc cca tgc tca att cat gat cct gtc gcg gca aaa gag tat gcc				726
Ile Gly Pro Cys Ser Ile His Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala				
	60	65	70	
act cgc ttg ctg gcg ctg cgt gaa gag ctg aaa gat gag ctg gaa atc				774
Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile				
	75	80	85	
gta atg cgc gtc tat ttt gaa aag ccg cgt acc acg gtg ggc tgg aaa				822
Val Met Arg Val Tyr Phe Glu Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys				
	90	95	100	105
[0002] ggg ctg att aac gat ccg cat atg gat aat agc ttc cag atc aac gac				870
Gly Leu Ile Asn Asp Pro His Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp				
	110	115	120	
ggt ctg cgt ata gcc cgt aaa ttg ctg ctt gat att aac gac agc ggt				918
Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly				
	125	130	135	
ctg cca gcg gca ggt gag ttt ctc gat atg atc acc cta caa tat ctc				966
Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe Leu Asp Met Ile Thr Leu Gln Tyr Leu				
	140	145	150	
gct gac ctg atg agc tgg ggc gca att ggc gca cgt acc acc gaa tgc				1014
Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser				
	155	160	165	
cag gtg cac cgc gaa ctg gca tca ggg ctt tet tgt ccg gtc ggc ttc				1062
Gln Val His Arg Glu Leu Ala Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe				
	170	175	180	185
aaa aat ggc acc gac ggt acg att aaa gtg gct atc gat gcc att aat				1110
Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn				
	190	195	200	

	gcc gcc ggt gcg ccg cac tgc ttc ctg tcc gta acg aaa tgg ggg cat	1158
	Ala Ala Gly Ala Pro His Cys Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His	
	205 210 215	
	tgc gcg att gtg aat acc agc ggt aac ggc gat tgc cat atc att ctg	1206
	Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu	
	220 225 230	
	cgc ggc ggt aaa gag cct aac tac agc gcg aag cac gtt gct gaa gtg	1254
	Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val	
	235 240 245	
	aaa gaa ggg ctg aac aaa gca ggc ctg cca gca cag gtg atg atc gat	1302
	Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp	
	250 255 260 265	
	ttc agc cat gct aac tgc tcc aaa caa ttc aaa aag cag atg gat gtt	1350
	Phe Ser His Ala Asn Ser Ser Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val	
	270 275 280	
	tgt gct gac gtt tgc cag cag att gcc ggt ggc gaa aag gcc att att	1398
[0003]	Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile	
	285 290 295	
	ggc gtg atg gtg gaa agc cat ctg gtg gaa ggc aat cag agc ctc gag	1446
	Gly Val Met Val Glu Ser His Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu	
	300 305 310	
	agc ggg gag ccg ctg gcc tac ggt aag agc atc acc gat gcc tgc atc	1494
	Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile	
	315 320 325	
	ggc tgg gaa gat acc gat gct ctg tta cgt caa ctg gcg aat gca gta	1542
	Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val	
	330 335 340 345	
	aaa gcg cgt cgc ggg taa ggtttaattg tcggatgcgc cgtcagagtg	1590
	Lys Ala Arg Arg Gly	
	350	
	gcgtatccga tgaatcacca caggcctgat aagtcgcgca gcgtcgcac aggcaatgtg	1650
	ctccattggt agcaacaaaa aagccgactc acttgcagtc ggctttctca ttttaaacga	1710

atgacgttta cttegttta ccttggttg caaccgcegc tgcttctgct gcgatctegt 1770
cagcattacc cagataatag cgtttcagcg gtttgaatt ctcgtcgaac tcatacacca 1830
gcggcagccc agtcgggata ttaagetcaa gaatctcttc ttcgctcatg ttatcaagat 1890
atrtcaccag cgcacgtaaa gagttaccgt gtgcagcgat gatcacgcgc tcaccgctct 1950
tcatacgcgg cagaatagtt tcattcctgg taaggatca cgcggtcaat ggtcagcgcc 2010
aggctttccg tcagcggcag ttctttctcg ctcagtttcg cgtaacgcgg atcgtgacce 2070
ggatagcgct gggtagcgag ctccaattc 2099

<210> 2

<211> 350

<212> PRT

<213> aroG4 cDNA

<400> 2

[0004]

Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
20 25 30

Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
50 55 60

Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
 100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
 115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
 130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
 145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
 165 170 175

[0005] Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
 180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
 195 200 205

Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
 210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
 225 230 235 240

Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
 245 250 255

Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
 260 265 270

Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
 275 280 285

Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
 290 295 300

Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
 305 310 315 320

Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
 325 330 335

Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
 340 345 350

- [0006] <210> 3
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> pheA reverse primer
- <400> 3
 gatgattcac atcatcggc accttttcat caggttgat caacaggcac gaagttccta 60
 tactttctag agagaatagg aacttctcag aagaactcgt caagaaggcg 110
- <210> 4
 <211> 109
 <212> DNA
 <213> pheA forward primer
- <400> 4
 gtgaaaacag tacgggtact gtactaaagt cacttaagga aacaaacatg gaagttccta 60
 ttctctagaa agtataggaa cttctggaca gcaagcgaac cggaattgc 109
- <210> 5
 <211> 882
 <212> DNA

	<213> PFLU1770 cDNA	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (4)..(876)	
	<400> 5	
	cat atg aac acg aac acg gtg gtg gtg ctg ggc ggc gct ggt ctg att	48
	Met Asn Thr Asn Thr Val Val Val Leu Gly Gly Ala Gly Leu Ile	
	1 5 10 15	
	ggc tcc atg atc tct cgc atc ctg aaa cag tac ggc tac ttt gtg cgt	96
	Gly Ser Met Ile Ser Arg Ile Leu Lys Gln Tyr Gly Tyr Phe Val Arg	
	20 25 30	
	gtg gtt gat cgt cgc ccg gcc gaa ttc gaa tgc gaa tat cat gaa atg	144
	Val Val Asp Arg Arg Pro Ala Glu Phe Glu Cys Glu Tyr His Glu Met	
	35 40 45	
	gat gtc acc aaa ccg ttt aac gac acc ggt gcc gtg ttc cgt aat gct	192
	Asp Val Thr Lys Pro Phe Asn Asp Thr Gly Ala Val Phe Arg Asn Ala	
[0007]	50 55 60	
	acc gcc gtc gtg ttt gca ctg ccg gaa agc gtg gcc gtt tct gca att	240
	Thr Ala Val Val Phe Ala Leu Pro Glu Ser Val Ala Val Ser Ala Ile	
	65 70 75	
	ccg tgg gtt acc acg ttc ctg agc tct gaa gtt gtc ctg atc ccg acg	288
	Pro Trp Val Thr Thr Phe Leu Ser Ser Glu Val Val Leu Ile Pro Thr	
	80 85 90 95	
	tgt tca gtg cag ggt ccg ttt tac aaa gct ctg aaa gcc gcg gca ccg	336
	Cys Ser Val Gln Gly Pro Phe Tyr Lys Ala Leu Lys Ala Ala Ala Pro	
	100 105 110	
	cgt caa ccg ttt gtc ggt gtg aac ccg atg ttc agt ccg aaa ctg tcc	384
	Arg Gln Pro Phe Val Gly Val Asn Pro Met Phe Ser Pro Lys Leu Ser	
	115 120 125	
	gtt cag ggt cgt tca gtt gcg gtc tgc gtg gaa gat acc cag gct gcg	432
	Val Gln Gly Arg Ser Val Ala Val Cys Val Glu Asp Thr Gln Ala Ala	
	130 135 140	
	cag acc ttt att gaa cgc cat ctg atg gaa gct ggc atg aaa atc cgt	480

Gln Thr Phe Ile Glu Arg His Leu Met Glu Ala Gly Met Lys Ile Arg 145	150	155	
cgc atg acc ccg tcg gcg cat gac gaa ctg atg gct ctg tgc cag gcg Arg Met Thr Pro Ser Ala His Asp Glu Leu Met Ala Leu Cys Gln Ala 160	165	170	528
ctg ccg cat gca gca att ctg ggc ttt ggt atg gcc ctg gca aaa agt Leu Pro His Ala Ala Ile Leu Gly Phe Gly Met Ala Leu Ala Lys Ser 180	185	190	576
tcc gtg gat atg gac atc gtt gcc gaa gtc atg ccg ccg cca atg cgt Ser Val Asp Met Asp Ile Val Ala Glu Val Met Pro Pro Pro Met Arg 195	200	205	624
acc atg atg gca ctg ctg agc cgc att ctg gtg aac ccg ccg gaa gtt Thr Met Met Ala Leu Leu Ser Arg Ile Leu Val Asn Pro Pro Glu Val 210	215	220	672
tat tgg gat atc cag ctg gaa aat gac cag gct acg gcg caa cgt gat Tyr Trp Asp Ile Gln Leu Glu Asn Asp Gln Ala Thr Ala Gln Arg Asp 225	230	235	720
[0008]			
gcc ctg gtt cac ggt ctg gaa cgc ctg cag gaa aat att gtc gaa caa Ala Leu Val His Gly Leu Glu Arg Leu Gln Glu Asn Ile Val Glu Gln 240	245	250	768
gat tac gaa cgc ttt aaa tct gac ctg caa tca gtg tcg acc gca ctg Asp Tyr Glu Arg Phe Lys Ser Asp Leu Gln Ser Val Ser Thr Ala Leu 260	265	270	816
ggt aaa cgc ctg aac gct ggt gcc gtg gat tgt caa cac ctg ttt tcc Gly Lys Arg Leu Asn Ala Gly Ala Val Asp Cys Gln His Leu Phe Ser 275	280	285	864
ctg ctg aac taa ctcgag Leu Leu Asn 290			882
<210> 6			
<211> 290			
<212> PRT			
<213> PFLU1770 cDNA			

<400> 6

Met Asn Thr Asn Thr Val Val Val Leu Gly Gly Ala Gly Leu Ile Gly
1 5 10 15

Ser Met Ile Ser Arg Ile Leu Lys Gln Tyr Gly Tyr Phe Val Arg Val
20 25 30

Val Asp Arg Arg Pro Ala Glu Phe Glu Cys Glu Tyr His Glu Met Asp
35 40 45

Val Thr Lys Pro Phe Asn Asp Thr Gly Ala Val Phe Arg Asn Ala Thr
50 55 60

Ala Val Val Phe Ala Leu Pro Glu Ser Val Ala Val Ser Ala Ile Pro
65 70 75 80

[0009]

Trp Val Thr Thr Phe Leu Ser Ser Glu Val Val Leu Ile Pro Thr Cys
85 90 95

Ser Val Gln Gly Pro Phe Tyr Lys Ala Leu Lys Ala Ala Ala Pro Arg
100 105 110

Gln Pro Phe Val Gly Val Asn Pro Met Phe Ser Pro Lys Leu Ser Val
115 120 125

Gln Gly Arg Ser Val Ala Val Cys Val Glu Asp Thr Gln Ala Ala Gln
130 135 140

Thr Phe Ile Glu Arg His Leu Met Glu Ala Gly Met Lys Ile Arg Arg
145 150 155 160

Met Thr Pro Ser Ala His Asp Glu Leu Met Ala Leu Cys Gln Ala Leu
165 170 175

Pro His Ala Ala Ile Leu Gly Phe Gly Met Ala Leu Ala Lys Ser Ser
 180 185 190

Val Asp Met Asp Ile Val Ala Glu Val Met Pro Pro Pro Met Arg Thr
 195 200 205

Met Met Ala Leu Leu Ser Arg Ile Leu Val Asn Pro Pro Glu Val Tyr
 210 215 220

Trp Asp Ile Gln Leu Glu Asn Asp Gln Ala Thr Ala Gln Arg Asp Ala
 225 230 235 240

Leu Val His Gly Leu Glu Arg Leu Gln Glu Asn Ile Val Glu Gln Asp
 245 250 255

Tyr Glu Arg Phe Lys Ser Asp Leu Gln Ser Val Ser Thr Ala Leu Gly
 260 265 270

[0010]

Lys Arg Leu Asn Ala Gly Ala Val Asp Cys Gln His Leu Phe Ser Leu
 275 280 285

Leu Asn
 290

<210> 7
 <211> 2079
 <212> DNA
 <213> PFLU1771 cDNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(2073)

<400> 7
 cat atg aaa att ctg ctg att gac aac ttt gat tcc ttt acc caa aac

48

	180	185	190	
	aac ggt aat cac cgt acg agc gcg acc cag aac ccg gat gca tca gct			624
	Asn Gly Asn His Arg Thr Ser Ala Thr Gln Asn Pro Asp Ala Ser Ala			
	195	200	205	
	tcg gcg aat gaa cat tat cgt gct gtg ggc ggt ctg ctg aat atg cag			672
	Ser Ala Asn Glu His Tyr Arg Ala Val Gly Gly Leu Leu Asn Met Gln			
	210	215	220	
	ctg gcg tat cgc acc tat ccg ggt ccg ttt gac ccg ctg gcc ctg ttc			720
	Leu Ala Tyr Arg Thr Tyr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Leu Ala Leu Phe			
	225	230	235	
	acc caa cgc tac gcc cag gat cat cac gca ttt tgg ctg gac tcc gaa			768
	Thr Gln Arg Tyr Ala Gln Asp His His Ala Phe Trp Leu Asp Ser Glu			
	240	245	250	255
	aaa tca gaa cgt ccg aac gcc cgc tat tcg att atg ggc agc ggt cag			816
	Lys Ser Glu Arg Pro Asn Ala Arg Tyr Ser Ile Met Gly Ser Gly Gln			
	260	265	270	
[0012]	gca caa ggc tct atc cgt ctg acg tac gat gtg aat agc gaa tct ctg			864
	Ala Gln Gly Ser Ile Arg Leu Thr Tyr Asp Val Asn Ser Glu Ser Leu			
	275	280	285	
	acc ctg gcg ggc ccg aaa ggt agt cgc att gtc acg ggt gac ttt ttc			912
	Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Thr Gly Asp Phe Phe			
	290	295	300	
	acc ctg ttt tcc caa atc gtg gaa tca gtg aac gtg gcc gtc ccg cag			960
	Thr Leu Phe Ser Gln Ile Val Glu Ser Val Asn Val Ala Val Pro Gln			
	305	310	315	
	tat ctg ccg ttt gaa ttc aaa ggc ggt ttc gtt ggc tat atg ggt tac			1008
	Tyr Leu Pro Phe Glu Phe Lys Gly Gly Phe Val Gly Tyr Met Gly Tyr			
	320	325	330	335
	gaa ctg aaa gca ctg acc ggc ggt aat aaa gtg tat cgt agc ggc cag			1056
	Glu Leu Lys Ala Leu Thr Gly Gly Asn Lys Val Tyr Arg Ser Gly Gln			
	340	345	350	
	ccg gat gct ggt ttt atg ttc gcg ccg cat ttc ttt gtt ttt gat cat			1104
	Pro Asp Ala Gly Phe Met Phe Ala Pro His Phe Phe Val Phe Asp His			
	355	360	365	

	cac gac cag acg gtt tac gaa tgc atg att tcg gca acc ggt cag agc His Asp Gln Thr Val Tyr Glu Cys Met Ile Ser Ala Thr Gly Gln Ser 370 375 380	1152
	ccg caa tgg ccg cag ctg ctg acc agc atg acc acg ctg aac aat gct Pro Gln Trp Pro Gln Leu Leu Thr Ser Met Thr Thr Leu Asn Asn Ala 385 390 395	1200
	acc gat cgt cgt ccg ttt gtg ccg ggt gcc gtc gat gaa ctg gaa ctg Thr Asp Arg Arg Pro Phe Val Pro Gly Ala Val Asp Glu Leu Glu Leu 400 405 410 415	1248
	agt ctg gaa gac ggt ccg gat gac tac atc cgt aaa gtt aaa caa tcc Ser Leu Glu Asp Gly Pro Asp Asp Tyr Ile Arg Lys Val Lys Gln Ser 420 425 430	1296
	ctg cag tat att acg gat ggc gaa tca tac gaa atc tgc ctg acc aat Leu Gln Tyr Ile Thr Asp Gly Glu Ser Tyr Glu Ile Cys Leu Thr Asn 435 440 445	1344
[0013]	cgt gcg cgc atg agt tat tcc ggt gaa ccg ctg gcc gca tac cgt cgc Arg Ala Arg Met Ser Tyr Ser Gly Glu Pro Leu Ala Ala Tyr Arg Arg 450 455 460	1392
	atg cgt gaa gct agc ccg gtt ccg tat ggc gcg tac ctg tgc ttt gat Met Arg Glu Ala Ser Pro Val Pro Tyr Gly Ala Tyr Leu Cys Phe Asp 465 470 475	1440
	tca ttc tcg gtc ctg agc gcg tct ccg gaa acc ttt ctg cgt att gac Ser Phe Ser Val Leu Ser Ala Ser Pro Glu Thr Phe Leu Arg Ile Asp 480 485 490 495	1488
	gaa ggc ggt ctg att gaa tct cgc ccg atc aaa ggt acc cgt gcg cgc Glu Gly Gly Leu Ile Glu Ser Arg Pro Ile Lys Gly Thr Arg Ala Arg 500 505 510	1536
	tct aaa gat ccg agt gaa gac caa cgt ctg cgc tct gat ctg cag gcc Ser Lys Asp Pro Ser Glu Asp Gln Arg Leu Arg Ser Asp Leu Gln Ala 515 520 525	1584
	agt acc aaa gac cgc gca gaa aac ctg atg att gtc gat ctg gtg cgt Ser Thr Lys Asp Arg Ala Glu Asn Leu Met Ile Val Asp Leu Val Arg 530 535 540	1632

	cat gac ctg aat cag gtg tgc cgc agt ggt tcc gtg cat gtt ccg cac His Asp Leu Asn Gln Val Cys Arg Ser Gly Ser Val His Val Pro His 545 550 555	1680
	atc ttt gcc gtc gaa tcg ttc agc tct gtg cat cag ctg gtt agc acg Ile Phe Ala Val Glu Ser Phe Ser Ser Val His Gln Leu Val Ser Thr 560 565 570 575	1728
	gtc cgt ggc cac ctg cgc aac gat att tct acc atg gaa gcc atc cgt Val Arg Gly His Leu Arg Asn Asp Ile Ser Thr Met Glu Ala Ile Arg 580 585 590	1776
	gca tgc ttt ccg ggc ggt agt atg acg ggt gcc ccg aaa aaa cgt acc Ala Cys Phe Pro Gly Gly Ser Met Thr Gly Ala Pro Lys Lys Arg Thr 595 600 605	1824
	atg gaa att atc gac ggc ctg gaa acc tgt gcc cgc ggt gtt tat tcc Met Glu Ile Ile Asp Gly Leu Glu Thr Cys Ala Arg Gly Val Tyr Ser 610 615 620	1872
[0014]	ggc gca ctg ggt tgg att tca ttt tcg ggc agc gca gaa ctg tca att Gly Ala Leu Gly Trp Ile Ser Phe Ser Gly Ser Ala Glu Leu Ser Ile 625 630 635	1920
	gtg atc cgc acc gct gtt ctg cat aaa cag caa gcg gaa ttc ggt att Val Ile Arg Thr Ala Val Leu His Lys Gln Gln Ala Glu Phe Gly Ile 640 645 650 655	1968
	ggc ggt gct atc gtg gcg cac agc gat ccg aat gaa gaa ctg gaa gaa Gly Gly Ala Ile Val Ala His Ser Asp Pro Asn Glu Glu Leu Glu Glu 660 665 670	2016
	acc ctg gtc aaa gca agc gtg ccg tat tat tcg ttc tat gcc ggt agt Thr Leu Val Lys Ala Ser Val Pro Tyr Tyr Ser Phe Tyr Ala Gly Ser 675 680 685	2064
	gaa aaa tga ctcgag Glu Lys	2079
	<210> 8	
	<211> 689	
	<212> PRT	
	<213> PFLU1771 cDNA	

<400> 8

Met Lys Ile Leu Leu Ile Asp Asn Phe Asp Ser Phe Thr Gln Asn Ile
1 5 10 15

Ala Gln Tyr Leu Tyr Glu Val Thr Gly Ile Cys Ala Asp Ile Val Thr
20 25 30

Asn Thr Val Thr Tyr Glu His Leu Gln Ile Glu Gln Tyr Asp Ala Val
35 40 45

Val Leu Ser Pro Gly Pro Gly His Pro Gly Glu Tyr Leu Asp Phe Gly
50 55 60

Val Cys Gly Gln Val Ile Leu His Ser Pro Val Pro Leu Leu Gly Ile
65 70 75 80

[0015]

Cys Leu Gly His Gln Gly Ile Ala Gln Phe Leu Gly Gly Thr Val Gly
85 90 95

His Ala Pro Thr Pro Val His Gly Tyr Arg Ser Lys Ile Thr His Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Leu Phe Arg Asp Leu Pro Glu Gln Phe Glu Val Val Arg
115 120 125

Tyr His Ser Leu Met Cys Thr His Leu Pro Gln Glu Leu Arg Cys Thr
130 135 140

Ala Trp Thr Glu Glu Gly Val Val Met Ala Ile Glu His Glu Ser Arg
145 150 155 160

Pro Ile Trp Gly Val Gln Phe His Pro Glu Ser Ile Asp Ser Glu Tyr
165 170 175

Gly His Ala Leu Leu Ser Asn Phe Ile Gly Met Ala Ile Glu His Asn
 180 185 190

Gly Asn His Arg Thr Ser Ala Thr Gln Asn Pro Asp Ala Ser Ala Ser
 195 200 205

Ala Asn Glu His Tyr Arg Ala Val Gly Gly Leu Leu Asn Met Gln Leu
 210 215 220

Ala Tyr Arg Thr Tyr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Leu Ala Leu Phe Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Tyr Ala Gln Asp His His Ala Phe Trp Leu Asp Ser Glu Lys
 245 250 255

[0016] Ser Glu Arg Pro Asn Ala Arg Tyr Ser Ile Met Gly Ser Gly Gln Ala
 260 265 270

Gln Gly Ser Ile Arg Leu Thr Tyr Asp Val Asn Ser Glu Ser Leu Thr
 275 280 285

Leu Ala Gly Pro Lys Gly Ser Arg Ile Val Thr Gly Asp Phe Phe Thr
 290 295 300

Leu Phe Ser Gln Ile Val Glu Ser Val Asn Val Ala Val Pro Gln Tyr
 305 310 315 320

Leu Pro Phe Glu Phe Lys Gly Gly Phe Val Gly Tyr Met Gly Tyr Glu
 325 330 335

Leu Lys Ala Leu Thr Gly Gly Asn Lys Val Tyr Arg Ser Gly Gln Pro
 340 345 350

Asp Ala Gly Phe Met Phe Ala Pro His Phe Phe Val Phe Asp His His
 355 360 365

Asp Gln Thr Val Tyr Glu Cys Met Ile Ser Ala Thr Gly Gln Ser Pro
 370 375 380

Gln Trp Pro Gln Leu Leu Thr Ser Met Thr Thr Leu Asn Asn Ala Thr
 385 390 395 400

Asp Arg Arg Pro Phe Val Pro Gly Ala Val Asp Glu Leu Glu Leu Ser
 405 410 415

Leu Glu Asp Gly Pro Asp Asp Tyr Ile Arg Lys Val Lys Gln Ser Leu
 420 425 430

[0017] Gln Tyr Ile Thr Asp Gly Glu Ser Tyr Glu Ile Cys Leu Thr Asn Arg
 435 440 445

Ala Arg Met Ser Tyr Ser Gly Glu Pro Leu Ala Ala Tyr Arg Arg Met
 450 455 460

Arg Glu Ala Ser Pro Val Pro Tyr Gly Ala Tyr Leu Cys Phe Asp Ser
 465 470 475 480

Phe Ser Val Leu Ser Ala Ser Pro Glu Thr Phe Leu Arg Ile Asp Glu
 485 490 495

Gly Gly Leu Ile Glu Ser Arg Pro Ile Lys Gly Thr Arg Ala Arg Ser
 500 505 510

Lys Asp Pro Ser Glu Asp Gln Arg Leu Arg Ser Asp Leu Gln Ala Ser
 515 520 525

Thr Lys Asp Arg Ala Glu Asn Leu Met Ile Val Asp Leu Val Arg His
 530 535 540

Asp Leu Asn Gln Val Cys Arg Ser Gly Ser Val His Val Pro His Ile
 545 550 555 560

Phe Ala Val Glu Ser Phe Ser Ser Val His Gln Leu Val Ser Thr Val
 565 570 575

Arg Gly His Leu Arg Asn Asp Ile Ser Thr Met Glu Ala Ile Arg Ala
 580 585 590

Cys Phe Pro Gly Gly Ser Met Thr Gly Ala Pro Lys Lys Arg Thr Met
 595 600 605

Glu Ile Ile Asp Gly Leu Glu Thr Cys Ala Arg Gly Val Tyr Ser Gly
 610 615 620

[0018]

Ala Leu Gly Trp Ile Ser Phe Ser Gly Ser Ala Glu Leu Ser Ile Val
 625 630 635 640

Ile Arg Thr Ala Val Leu His Lys Gln Gln Ala Glu Phe Gly Ile Gly
 645 650 655

Gly Ala Ile Val Ala His Ser Asp Pro Asn Glu Glu Leu Glu Glu Thr
 660 665 670

Leu Val Lys Ala Ser Val Pro Tyr Tyr Ser Phe Tyr Ala Gly Ser Glu
 675 680 685

Lys

<210> 9

<211>	357	
<212>	DNA	
<213>	PFLU1772 cDNA	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(8)..(349)	
<400>	9	
	ggatccg atg aat atg acc gaa cac cgc cac atg agc ccg acc acg ccg	49
	Met Asn Met Thr Glu His Arg His Met Ser Pro Thr Thr Pro	
	1 5 10	
	tct gcc atc ctg caa ccg caa cgc gac caa ctg gac cgt atc aac aac	97
	Ser Ala Ile Leu Gln Pro Gln Arg Asp Gln Leu Asp Arg Ile Asn Asn	
	15 20 25 30	
	cat ctg gtt gat ctg ctg ggc gaa cgt atg agt gtc tgc atg gat att	145
	His Leu Val Asp Leu Leu Gly Glu Arg Met Ser Val Cys Met Asp Ile	
	35 40 45	
[0019]	gcg gaa ctg aaa gcg gcc cac gac att ccg atg atg cag ccg caa cgt	193
	Ala Glu Leu Lys Ala Ala His Asp Ile Pro Met Met Gln Pro Gln Arg	
	50 55 60	
	atc gtg cag gtt ctg gat caa ctg aaa gac aaa agc tct acc gtg ggt	241
	Ile Val Gln Val Leu Asp Gln Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Val Gly	
	65 70 75	
	ctg cgc ccg gac tat gtc cag agc gtg ttt aaa ctg att atc gaa gaa	289
	Leu Arg Pro Asp Tyr Val Gln Ser Val Phe Lys Leu Ile Ile Glu Glu	
	80 85 90	
	acg tgt atc cag gaa gaa caa ctg att caa cgc cgt cgt aac cag ggt	337
	Thr Cys Ile Gln Glu Glu Gln Leu Ile Gln Arg Arg Arg Asn Gln Gly	
	95 100 105 110	
	caa cgc tgc tga gcggccgc	357
	Gln Arg Ser	
<210>	10	
<211>	113	

<212> PRT

<213> PFLU1772 cDNA

<400> 10

Met Asn Met Thr Glu His Arg His Met Ser Pro Thr Thr Pro Ser Ala
1 5 10 15

Ile Leu Gln Pro Gln Arg Asp Gln Leu Asp Arg Ile Asn Asn His Leu
 20 25 30

Val Asp Leu Leu Gly Glu Arg Met Ser Val Cys Met Asp Ile Ala Glu
 35 40 45

Leu Lys Ala Ala His Asp Ile Pro Met Met Gln Pro Gln Arg Ile Val
 50 55 60

[0020] Gln Val Leu Asp Gln Leu Lys Asp Lys Ser Ser Thr Val Gly Leu Arg
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Val Gln Ser Val Phe Lys Leu Ile Ile Glu Glu Thr Cys
 85 90 95

Ile Gln Glu Glu Gln Leu Ile Gln Arg Arg Arg Asn Gln Gly Gln Arg
 100 105 110

Ser

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> svpapA forward primer

<400> 11

gacacatatg cgcacgcttc tgatecgac

28

	<210> 12	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> svpapA reverse primer	
	<400> 12	
	gacgatatca tcgggcgccc gccacggc	28
	<210> 13	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> svpapB forward primer	
	<400> 13	
	gagccatggg caccgagcag aacgagctg	29
	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> DNA	
[0021]	<213> svpapB reverse primer	
	<400> 14	
	cagaagcttc accgccggtc ctcggccgtc	30
	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> svpapC forward primer	
	<400> 15	
	cagagacata tgagcggctt cccccgag	29
	<210> 16	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> svpapC reverse primer	
	<400> 16	
	gactcgagtc atcggtcctt ctcgccttcg	30

	<210> 17	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> sppapB forward primer	
	<400> 17	
	cagccatggg caceccgccc gccatcccc	29
	<210> 18	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> sppapB reverse primer	
	<400> 18	
	cagaagcttc acgacacggc cccccgcg	28
	<210> 19	
	<211> 31	
	<212> DNA	
[0022]	<213> sppapC forward primer	
	<400> 19	
	cagagacata tgaggggtgg ttcggtgttc g	31
	<210> 20	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> sppapC reverse primer	
	<400> 20	
	cagatatcag tgcagggcgg tgaacatc	28
	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Aro10 forward primer	
	<400> 21	
	gagccatggc acctgttaca attga	25

Leu Ile Thr Thr Tyr Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Leu Asn Gly Ile	
100 105 110	
gcc ggt tcg ttc gct gaa aat gtc aaa gtt ttg cac att gtt ggt gtg	386
Ala Gly Ser Phe Ala Glu Asn Val Lys Val Leu His Ile Val Gly Val	
115 120 125	
gcc aag tcc ata gat tcg cgt tca agt aac ttt agt gat cgg aac cta	434
Ala Lys Ser Ile Asp Ser Arg Ser Ser Asn Phe Ser Asp Arg Asn Leu	
130 135 140	
cat cat ttg gtc cca cag cta cat gat tca aat ttt aaa ggg cca aat	482
His His Leu Val Pro Gln Leu His Asp Ser Asn Phe Lys Gly Pro Asn	
145 150 155	
cat aaa gta tat cat gat atg gta aaa gat aga gtc gct tgc tcg gta	530
His Lys Val Tyr His Asp Met Val Lys Asp Arg Val Ala Cys Ser Val	
160 165 170 175	
gcc tac ttg gag gat att gaa act gca tgt gac caa gtc gat aat gtt	578
Ala Tyr Leu Glu Asp Ile Glu Thr Ala Cys Asp Gln Val Asp Asn Val	
180 185 190	
[0024]	
atc cgc gat att tac aag tat tct aaa cct ggt tat att ttt gtt cct	626
Ile Arg Asp Ile Tyr Lys Tyr Ser Lys Pro Gly Tyr Ile Phe Val Pro	
195 200 205	
gca gat ttt gcg gat atg tct gtt aca tgt gat aat ttg gtt aat gtt	674
Ala Asp Phe Ala Asp Met Ser Val Thr Cys Asp Asn Leu Val Asn Val	
210 215 220	
cca cgt ata tct caa caa gat tgt ata gta tac cct tct gaa aac caa	722
Pro Arg Ile Ser Gln Gln Asp Cys Ile Val Tyr Pro Ser Glu Asn Gln	
225 230 235	
ttg tct gac ata atc aac aag att act agt tgg ata tat tcc agt aaa	770
Leu Ser Asp Ile Ile Asn Lys Ile Thr Ser Trp Ile Tyr Ser Ser Lys	
240 245 250 255	
aca cct gcg atc ctt gga gac gta ctg act gat agg tat ggt gtg agt	818
Thr Pro Ala Ile Leu Gly Asp Val Leu Thr Asp Arg Tyr Gly Val Ser	
260 265 270	
aac ttt ttg aac aag ctt atc tgc aaa act ggg att tgg aat ttt tcc	866
Asn Phe Leu Asn Lys Leu Ile Cys Lys Thr Gly Ile Trp Asn Phe Ser	

	275	280	285	
	act gtt atg gga aaa tct gta att gat gag tca aac cca act tat atg			914
	Thr Val Met Gly Lys Ser Val Ile Asp Glu Ser Asn Pro Thr Tyr Met			
	290	295	300	
	ggt caa tat aat ggt aaa gaa ggt tta aaa caa gtc tat gaa cat ttt			962
	Gly Gln Tyr Asn Gly Lys Glu Gly Leu Lys Gln Val Tyr Glu His Phe			
	305	310	315	
	gaa ctg tgc gac ttg gtc ttg cat ttt gga gtc gac atc aat gaa att			1010
	Glu Leu Cys Asp Leu Val Leu His Phe Gly Val Asp Ile Asn Glu Ile			
	320	325	330	335
	aat aat ggg cat tat act ttt act tat aaa cca aat gct aaa atc att			1058
	Asn Asn Gly His Tyr Thr Phe Thr Tyr Lys Pro Asn Ala Lys Ile Ile			
	340	345	350	
	caa ttt cat ccg aat tat att cgc ctt gtg gac act agg cag ggc aat			1106
	Gln Phe His Pro Asn Tyr Ile Arg Leu Val Asp Thr Arg Gln Gly Asn			
	355	360	365	
[0025]	gag caa atg ttc aaa gga atc aat ttt gcc cct att tta aaa gaa cta			1154
	Glu Gln Met Phe Lys Gly Ile Asn Phe Ala Pro Ile Leu Lys Glu Leu			
	370	375	380	
	tac aag cgc att gac gtt tct aaa ctt tct ttg caa tat gat tca aat			1202
	Tyr Lys Arg Ile Asp Val Ser Lys Leu Ser Leu Gln Tyr Asp Ser Asn			
	385	390	395	
	gta act caa tat acg aac gaa aca atg cgg tta gaa gat cct acc aat			1250
	Val Thr Gln Tyr Thr Asn Glu Thr Met Arg Leu Glu Asp Pro Thr Asn			
	400	405	410	415
	gga caa tca agc att att aca caa gtt cac tta caa aag acg atg cct			1298
	Gly Gln Ser Ser Ile Ile Thr Gln Val His Leu Gln Lys Thr Met Pro			
	420	425	430	
	aaa ttt ttg aac cct ggt gat gtt gtc gtt tgt gaa aca ggc tct ttt			1346
	Lys Phe Leu Asn Pro Gly Asp Val Val Val Cys Glu Thr Gly Ser Phe			
	435	440	445	
	caa ttc tct gtt cgt gat ttc gcg ttt cct tcg caa tta aaa tat ata			1394
	Gln Phe Ser Val Arg Asp Phe Ala Phe Pro Ser Gln Leu Lys Tyr Ile			
	450	455	460	

	tgc caa gga ttt ttc ctt tcc att ggc atg gcc ctt cct gcc gcc cta	1442
	Ser Gln Gly Phe Phe Leu Ser Ile Gly Met Ala Leu Pro Ala Ala Leu	
	465 470 475	
	ggt gtt gga att gcc atg caa gac cac tca aac gct cac atc aat ggt	1490
	Gly Val Gly Ile Ala Met Gln Asp His Ser Asn Ala His Ile Asn Gly	
	480 485 490 495	
	ggc aac gta aaa gag gac tat aag cca aga tta att ttg ttt gaa ggt	1538
	Gly Asn Val Lys Glu Asp Tyr Lys Pro Arg Leu Ile Leu Phe Glu Gly	
	500 505 510	
	gac ggt gca gca cag atg aca atc caa gaa ctg agc acc att ctg aag	1586
	Asp Gly Ala Ala Gln Met Thr Ile Gln Glu Leu Ser Thr Ile Leu Lys	
	515 520 525	
	tgc aat att cca cta gaa gtt atc att tgg aac aat aac ggc tac act	1634
	Cys Asn Ile Pro Leu Glu Val Ile Ile Trp Asn Asn Asn Gly Tyr Thr	
	530 535 540	
[0026]	att gaa aga gcc atc atg ggc cct acc agg tgc tat aac gac gtt atg	1682
	Ile Glu Arg Ala Ile Met Gly Pro Thr Arg Ser Tyr Asn Asp Val Met	
	545 550 555	
	tct tgg aaa tgg acc aaa cta ttt gaa gca ttc gga gac ttc gac gga	1730
	Ser Trp Lys Trp Thr Lys Leu Phe Glu Ala Phe Gly Asp Phe Asp Gly	
	560 565 570 575	
	aag tat act aat agc act ctc att caa tgt ccc tct aaa tta gca ctg	1778
	Lys Tyr Thr Asn Ser Thr Leu Ile Gln Cys Pro Ser Lys Leu Ala Leu	
	580 585 590	
	aaa ttg gag gag ctt aag aat tca aac aaa aga agc ggg ata gaa ctt	1826
	Lys Leu Glu Glu Leu Lys Asn Ser Asn Lys Arg Ser Gly Ile Glu Leu	
	595 600 605	
	tta gaa gtc aaa tta ggc gaa ttg gat ttc ccc gaa cag cta aag tgc	1874
	Leu Glu Val Lys Leu Gly Glu Leu Asp Phe Pro Glu Gln Leu Lys Cys	
	610 615 620	
	atg gtt gaa gca gcg gca ctt aaa aga aat aaa aaa tag ggatccgtc	1922
	Met Val Glu Ala Ala Ala Leu Lys Arg Asn Lys Lys	
	625 630 635	

<210> 24
 <211> 635
 <212> PRT
 <213> Aro10 cDNA

<400> 24

Met Ala Pro Val Thr Ile Glu Lys Phe Val Asn Gln Glu Glu Arg His
 1 5 10 15

Leu Val Ser Asn Arg Ser Ala Thr Ile Pro Phe Gly Glu Tyr Ile Phe
 20 25 30

Lys Arg Leu Leu Ser Ile Asp Thr Lys Ser Val Phe Gly Val Pro Gly
 35 40 45

Asp Phe Asn Leu Ser Leu Leu Glu Tyr Leu Tyr Ser Pro Ser Val Glu
 50 55 60

[0027]

Ser Ala Gly Leu Arg Trp Val Gly Thr Cys Asn Glu Leu Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Tyr Ala Ala Asp Gly Tyr Ser Arg Tyr Ser Asn Lys Ile Gly Cys Leu
 85 90 95

Ile Thr Thr Tyr Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Leu Asn Gly Ile Ala
 100 105 110

Gly Ser Phe Ala Glu Asn Val Lys Val Leu His Ile Val Gly Val Ala
 115 120 125

Lys Ser Ile Asp Ser Arg Ser Ser Asn Phe Ser Asp Arg Asn Leu His
 130 135 140

His Leu Val Pro Gln Leu His Asp Ser Asn Phe Lys Gly Pro Asn His

Asn Gly His Tyr Thr Phe Thr Tyr Lys Pro Asn Ala Lys Ile Ile Gln
 340 345 350

Phe His Pro Asn Tyr Ile Arg Leu Val Asp Thr Arg Gln Gly Asn Glu
 355 360 365

Gln Met Phe Lys Gly Ile Asn Phe Ala Pro Ile Leu Lys Glu Leu Tyr
 370 375 380

Lys Arg Ile Asp Val Ser Lys Leu Ser Leu Gln Tyr Asp Ser Asn Val
 385 390 395 400

Thr Gln Tyr Thr Asn Glu Thr Met Arg Leu Glu Asp Pro Thr Asn Gly
 405 410 415

[0029] Gln Ser Ser Ile Ile Thr Gln Val His Leu Gln Lys Thr Met Pro Lys
 420 425 430

Phe Leu Asn Pro Gly Asp Val Val Val Cys Glu Thr Gly Ser Phe Gln
 435 440 445

Phe Ser Val Arg Asp Phe Ala Phe Pro Ser Gln Leu Lys Tyr Ile Ser
 450 455 460

Gln Gly Phe Phe Leu Ser Ile Gly Met Ala Leu Pro Ala Ala Leu Gly
 465 470 475 480

Val Gly Ile Ala Met Gln Asp His Ser Asn Ala His Ile Asn Gly Gly
 485 490 495

Asn Val Lys Glu Asp Tyr Lys Pro Arg Leu Ile Leu Phe Glu Gly Asp
 500 505 510

Gly Ala Ala Gln Met Thr Ile Gln Glu Leu Ser Thr Ile Leu Lys Cys
 515 520 525

Asn Ile Pro Leu Glu Val Ile Ile Trp Asn Asn Asn Gly Tyr Thr Ile
 530 535 540

Glu Arg Ala Ile Met Gly Pro Thr Arg Ser Tyr Asn Asp Val Met Ser
 545 550 555 560

Trp Lys Trp Thr Lys Leu Phe Glu Ala Phe Gly Asp Phe Asp Gly Lys
 565 570 575

Tyr Thr Asn Ser Thr Leu Ile Gln Cys Pro Ser Lys Leu Ala Leu Lys
 580 585 590

[0030]

Leu Glu Glu Leu Lys Asn Ser Asn Lys Arg Ser Gly Ile Glu Leu Leu
 595 600 605

Glu Val Lys Leu Gly Glu Leu Asp Phe Pro Glu Gln Leu Lys Cys Met
 610 615 620

Val Glu Ala Ala Ala Leu Lys Arg Asn Lys Lys
 625 630 635

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Rgpal forward primer

<400> 25
 gacggatccg atggccccct ccgtcgactc

30

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA

	acc ggc ttc ggc ggc tcg gca gac acc cgg acg gag gac gcg atc tcg Thr Gly Phe Gly Gly Ser Ala Asp Thr Arg Thr Glu Asp Ala Ile Ser 115 120 125	384
	ctg cag aag gct ctg ctc gag cac caa ctc tgc ggt gtc ctg ccc acc Leu Gln Lys Ala Leu Leu Glu His Gln Leu Cys Gly Val Leu Pro Thr 130 135 140	432
	tcg atg gac ggg ttc gcg ctc gga cgt ggc ctc gag aac tcg ctc ccg Ser Met Asp Gly Phe Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Asn Ser Leu Pro 145 150 155 160	480
	ctc gag gtt gtt cgt ggc gcg atg acg atc cgt gtc aac tcg ctc acg Leu Glu Val Val Arg Gly Ala Met Thr Ile Arg Val Asn Ser Leu Thr 165 170 175	528
	cgc ggc cac tcg gcg gtc cgc atc gtc gtc ctc gaa gcc ctc acc aac Arg Gly His Ser Ala Val Arg Ile Val Val Leu Glu Ala Leu Thr Asn 180 185 190	576
[0032]	ttc ctc aac cac ggc atc acc ccg atc gtc ccc ctc cgc ggc acc atc Phe Leu Asn His Gly Ile Thr Pro Ile Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile 195 200 205	624
	tcg gca tcg ggt gac ctt tcc ccc ctc tcg tac atc gcc gcc tcg atc Ser Ala Ser Gly Asp Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ile Ala Ala Ser Ile 210 215 220	672
	acc ggt cac cca gac tcg aag gtg cac gtc gac ggc caa atc atg tcc Thr Gly His Pro Asp Ser Lys Val His Val Asp Gly Gln Ile Met Ser 225 230 235 240	720
	gcc cag gag gcg atc gct ctc aag ggt ctc caa cct gtc gtc ctc ggt Ala Gln Glu Ala Ile Ala Leu Lys Gly Leu Gln Pro Val Val Leu Gly 245 250 255	768
	ccg aag gag ggt ctc ggg ctc gtc aac ggc acc gcc gtc tcc gcg tcc Pro Lys Glu Gly Leu Gly Leu Val Asn Gly Thr Ala Val Ser Ala Ser 260 265 270	816
	atg gcc act ctc gcc ctc acc gac gcg cat gtc ctc tcg ttg ctc gcc Met Ala Thr Leu Ala Leu Thr Asp Ala His Val Leu Ser Leu Leu Ala 275 280 285	864
	cag gcc aac acg gcc ctg acc gtc gag gcc atg gtc gga cac gcc ggc	912

Gln Ala Asn Thr Ala Leu Thr Val Glu Ala Met Val Gly His Ala Gly	
290	295 300
tcg ttc cac ccg ttc ctg cac gat gtc act cgc ccg cac ccg acc cag	960
Ser Phe His Pro Phe Leu His Asp Val Thr Arg Pro His Pro Thr Gln	
305	310 315 320
atc gag gtc gcg cgc aac att agg acg ctc ctc gag ggc agc aag tac	1008
Ile Glu Val Ala Arg Asn Ile Arg Thr Leu Leu Glu Gly Ser Lys Tyr	
	325 330 335
gcc gtc cac cat gag acc gag gtc aag gtc aag gac gac gag ggc atc	1056
Ala Val His His Glu Thr Glu Val Lys Val Lys Asp Asp Glu Gly Ile	
	340 345 350
ctc cgg cag gac cga tac ccg ctc cgc tgc tcg ccc cag tgg ctc ggg	1104
Leu Arg Gln Asp Arg Tyr Pro Leu Arg Cys Ser Pro Gln Trp Leu Gly	
	355 360 365
cct ctt gtc agt gac atg atc cac gcc cac tcg gtc ctc tcc ctc gag	1152
Pro Leu Val Ser Asp Met Ile His Ala His Ser Val Leu Ser Leu Glu	
	370 375 380
[0033]	
gcg ggt cag tcg acc acc gac aac ccc ctg atc gac ctc gag aac aag	1200
Ala Gly Gln Ser Thr Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Leu Glu Asn Lys	
	385 390 395 400
atg acc cac cac ggt ggc gcc ttc atg gcg agc agc gtc ggt aac acc	1248
Met Thr His His Gly Gly Ala Phe Met Ala Ser Ser Val Gly Asn Thr	
	405 410 415
atg gag aag act cgt ctc gcc gtc gca ctt atg ggc aag gtt agc ttc	1296
Met Glu Lys Thr Arg Leu Ala Val Ala Leu Met Gly Lys Val Ser Phe	
	420 425 430
act cag ctc acc gag atg ctc aac gcc ggc atg aac cgc gcg ctt ccc	1344
Thr Gln Leu Thr Glu Met Leu Asn Ala Gly Met Asn Arg Ala Leu Pro	
	435 440 445
tcc tgc ctc gcc gcc gag gac ccg tct ctg tcc tac cac tgc aag ggt	1392
Ser Cys Leu Ala Ala Glu Asp Pro Ser Leu Ser Tyr His Cys Lys Gly	
	450 455 460
ctc gac atc gcc gcc gct gca tac act tcg gag ctc ggt cac ctc gcg	1440
Leu Asp Ile Ala Ala Ala Ala Tyr Thr Ser Glu Leu Gly His Leu Ala	

465	470	475	480	
aac cca gtc tcg acc cac gtt cag ccg gca gag atg ggc aat cag gcg				1488
Asn Pro Val Ser Thr His Val Gln Pro Ala Glu Met Gly Asn Gln Ala				
	485	490	495	
atc aac tcg ctc gcc ctc atc tcg gcc cgt cgc acc gcc gag gcg aac				1536
Ile Asn Ser Leu Ala Leu Ile Ser Ala Arg Arg Thr Ala Glu Ala Asn				
	500	505	510	
gac gtc ctc tcg ctc ctc ctc gcc acc cac ctc tac tgc gtc ttg cag				1584
Asp Val Leu Ser Leu Leu Leu Ala Thr His Leu Tyr Cys Val Leu Gln				
	515	520	525	
gcg gtc gac ctg cgc gcg atg gag ttc gag cac acg aaa gag ttt gag				1632
Ala Val Asp Leu Arg Ala Met Glu Phe Glu His Thr Lys Glu Phe Glu				
	530	535	540	
ccg atg gtc acc gac ttg ctc aag cag cac ttt gcc gcg ctc gcg aca				1680
Pro Met Val Thr Asp Leu Leu Lys Gln His Phe Gly Ala Leu Ala Thr				
	545	550	555	560
[0034] gcc gac gtc gag gac aag gtc cgc aaa tcg atc tac aag cgg ctg cag				1728
Ala Asp Val Glu Asp Lys Val Arg Lys Ser Ile Tyr Lys Arg Leu Gln				
	565	570	575	
cag aac aac tcg tac gac ctc gag cag cgg tgg cac gac acg ttc tcg				1776
Gln Asn Asn Ser Tyr Asp Leu Glu Gln Arg Trp His Asp Thr Phe Ser				
	580	585	590	
gtc gcg acc ggc gcc gtc gtc gaa gcc ctc gcc ggg aac gag gtg tcg				1824
Val Ala Thr Gly Ala Val Val Glu Ala Leu Ala Gly Asn Glu Val Ser				
	595	600	605	
ctc gcg agc ctg aac gcc tgg aag gtc gcg tgc gct gag aag gcc atc				1872
Leu Ala Ser Leu Asn Ala Trp Lys Val Ala Cys Ala Glu Lys Ala Ile				
	610	615	620	
gcc ctg acc cgc acc gtg cgc gac tcg ttc tgg gcc gcg ccg tcg tcg				1920
Ala Leu Thr Arg Thr Val Arg Asp Ser Phe Trp Ala Ala Pro Ser Ser				
	625	630	635	640
gcg tcg ccc gcg ctc aag tac ctc tcg ccg cgg act cgc atc ctg tac				1968
Ala Ser Pro Ala Leu Lys Tyr Leu Ser Pro Arg Thr Arg Ile Leu Tyr				
	645	650	655	

tcg ttc gtc cgg gaa gac gtc ggc gtc aag gcc cgc cgc ggc gac gtc 2016
 Ser Phe Val Arg Glu Asp Val Gly Val Lys Ala Arg Arg Gly Asp Val
 660 665 670

tac ctc ggc aag cag gag gtc acg atc ggg acc aac gtc agc cgc atc 2064
 Tyr Leu Gly Lys Gln Glu Val Thr Ile Gly Thr Asn Val Ser Arg Ile
 675 680 685

tac gag gcg atc aag gac ggc cgc att gct ccg gtc ctc gtc aag atg 2112
 Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Gly Arg Ile Ala Pro Val Leu Val Lys Met
 690 695 700

atg gca taa 2121
 Met Ala
 705

<210> 28

<211> 706

<212> PRT

<213> Rgpal cDNA

[0035]

<400> 28

Met Ala Pro Ser Val Asp Ser Ile Ala Thr Ser Val Ala Asn Ser Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Gly Leu Ala Gly Asp Leu Arg Lys Lys Thr Ser Gly Ala Gly
 20 25 30

Ser Leu Leu Pro Thr Thr Glu Thr Thr Gln Ile Asp Ile Val Glu Arg
 35 40 45

Ile Leu Ala Asp Ala Gly Ala Thr Asp Gln Ile Lys Leu Asp Gly Tyr
 50 55 60

Thr Leu Thr Leu Gly Asp Val Val Gly Ala Ala Arg Arg Gly Arg Thr
 65 70 75 80

Val Lys Val Ala Asp Ser Pro Gln Ile Arg Glu Lys Ile Asp Ala Ser
85 90 95

Val Glu Phe Leu Arg Thr Gln Leu Asp Asn Ser Val Tyr Gly Val Thr
100 105 110

Thr Gly Phe Gly Gly Ser Ala Asp Thr Arg Thr Glu Asp Ala Ile Ser
115 120 125

Leu Gln Lys Ala Leu Leu Glu His Gln Leu Cys Gly Val Leu Pro Thr
130 135 140

Ser Met Asp Gly Phe Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Asn Ser Leu Pro
145 150 155 160

Leu Glu Val Val Arg Gly Ala Met Thr Ile Arg Val Asn Ser Leu Thr
165 170 175

[0036]

Arg Gly His Ser Ala Val Arg Ile Val Val Leu Glu Ala Leu Thr Asn
180 185 190

Phe Leu Asn His Gly Ile Thr Pro Ile Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile
195 200 205

Ser Ala Ser Gly Asp Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ile Ala Ala Ser Ile
210 215 220

Thr Gly His Pro Asp Ser Lys Val His Val Asp Gly Gln Ile Met Ser
225 230 235 240

Ala Gln Glu Ala Ile Ala Leu Lys Gly Leu Gln Pro Val Val Leu Gly
245 250 255

Pro Lys Glu Gly Leu Gly Leu Val Asn Gly Thr Ala Val Ser Ala Ser

260	265	270
Met Ala Thr Leu Ala Leu Thr Asp Ala His Val Leu Ser Leu Leu Ala		
275	280	285
Gln Ala Asn Thr Ala Leu Thr Val Glu Ala Met Val Gly His Ala Gly		
290	295	300
Ser Phe His Pro Phe Leu His Asp Val Thr Arg Pro His Pro Thr Gln		
305	310	315
Ile Glu Val Ala Arg Asn Ile Arg Thr Leu Leu Glu Gly Ser Lys Tyr		
325	330	335
Ala Val His His Glu Thr Glu Val Lys Val Lys Asp Asp Glu Gly Ile		
340	345	350
[0037]		
Leu Arg Gln Asp Arg Tyr Pro Leu Arg Cys Ser Pro Gln Trp Leu Gly		
355	360	365
Pro Leu Val Ser Asp Met Ile His Ala His Ser Val Leu Ser Leu Glu		
370	375	380
Ala Gly Gln Ser Thr Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Leu Glu Asn Lys		
385	390	395
Met Thr His His Gly Gly Ala Phe Met Ala Ser Ser Val Gly Asn Thr		
405	410	415
Met Glu Lys Thr Arg Leu Ala Val Ala Leu Met Gly Lys Val Ser Phe		
420	425	430
Thr Gln Leu Thr Glu Met Leu Asn Ala Gly Met Asn Arg Ala Leu Pro		
435	440	445

Ser Cys Leu Ala Ala Glu Asp Pro Ser Leu Ser Tyr His Cys Lys Gly
450 455 460

Leu Asp Ile Ala Ala Ala Ala Tyr Thr Ser Glu Leu Gly His Leu Ala
465 470 475 480

Asn Pro Val Ser Thr His Val Gln Pro Ala Glu Met Gly Asn Gln Ala
485 490 495

Ile Asn Ser Leu Ala Leu Ile Ser Ala Arg Arg Thr Ala Glu Ala Asn
500 505 510

Asp Val Leu Ser Leu Leu Leu Ala Thr His Leu Tyr Cys Val Leu Gln
515 520 525

[0038] Ala Val Asp Leu Arg Ala Met Glu Phe Glu His Thr Lys Glu Phe Glu
530 535 540

Pro Met Val Thr Asp Leu Leu Lys Gln His Phe Gly Ala Leu Ala Thr
545 550 555 560

Ala Asp Val Glu Asp Lys Val Arg Lys Ser Ile Tyr Lys Arg Leu Gln
565 570 575

Gln Asn Asn Ser Tyr Asp Leu Glu Gln Arg Trp His Asp Thr Phe Ser
580 585 590

Val Ala Thr Gly Ala Val Val Glu Ala Leu Ala Gly Asn Glu Val Ser
595 600 605

Leu Ala Ser Leu Asn Ala Trp Lys Val Ala Cys Ala Glu Lys Ala Ile
610 615 620

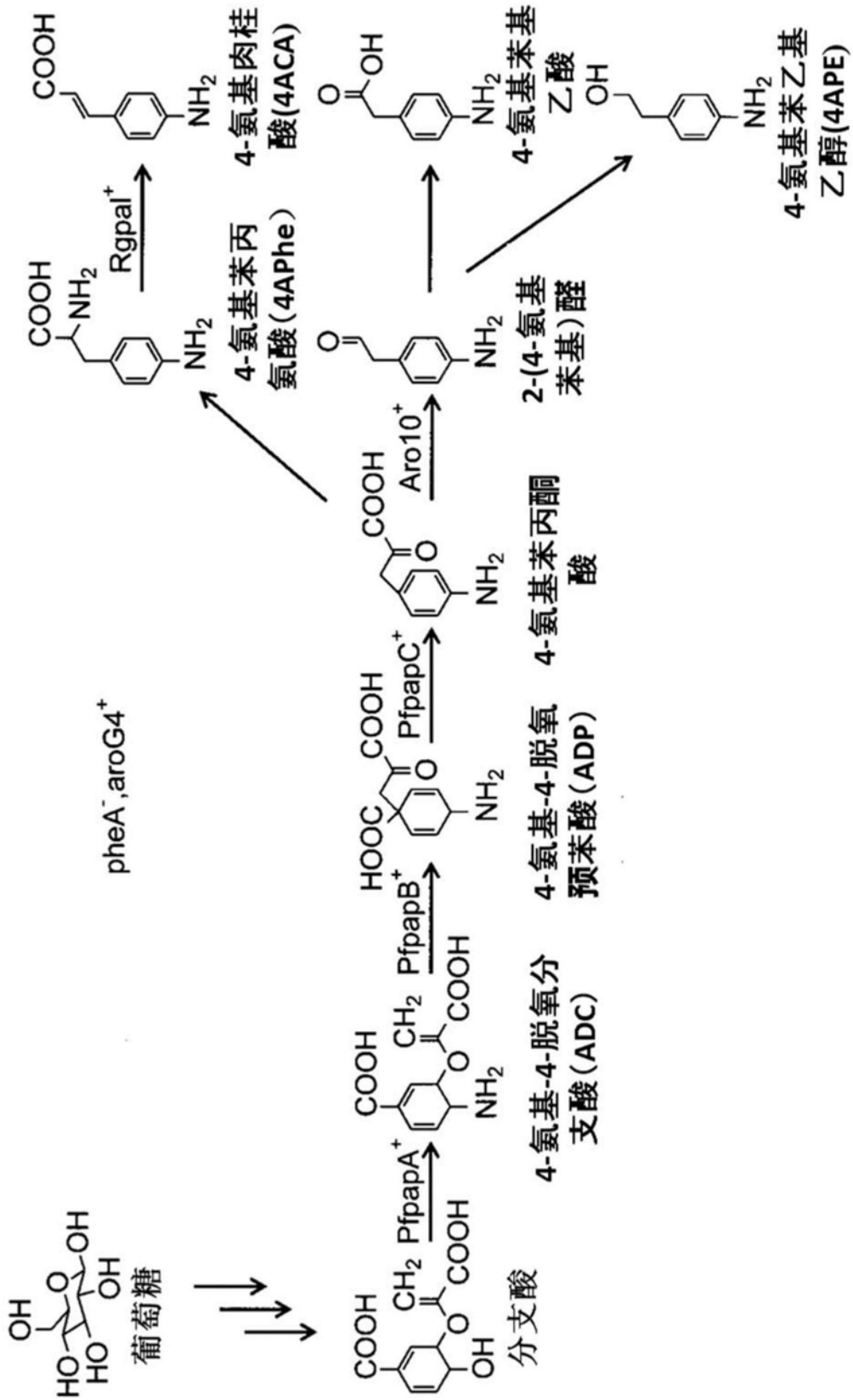


图1

Na ₂ HPO ₄	6.00g
KH ₂ PO ₄	3.00g
NaCl	0.50g
NH ₄ Cl	2.00g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.015g
盐酸硫胺	0.05g
胰蛋白胨	2.00g
酵母抽提物	1.00g
tryosine	50.0mg
色氨酸	50.0mg
微量元素溶液	2.00ml
蒸馏水	1.00L
pH	7.2

图2

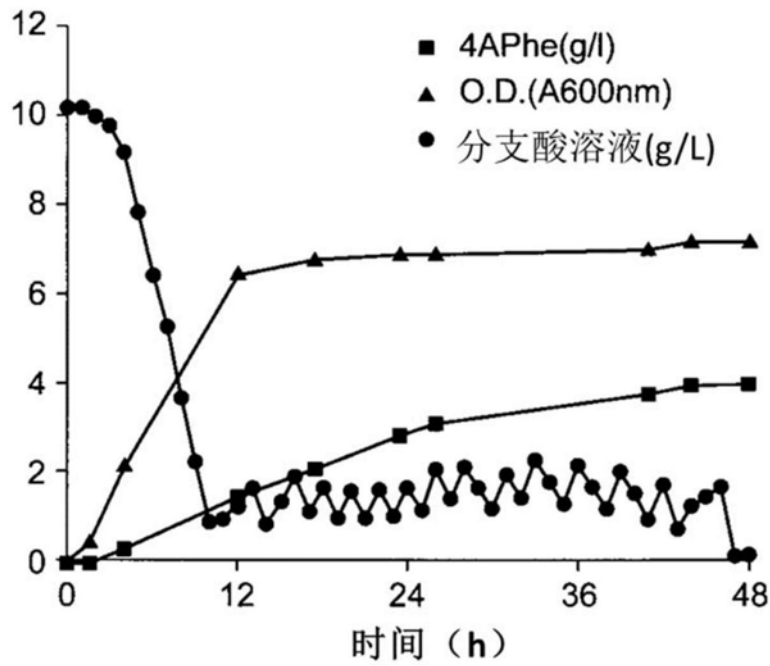


图3