

發明專利說明書

99. 5. 21

年 月 日修(更)正替換頁

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92120267

※申請日期：92 年 07 月 24 日

※IPC 分類：

C12N 9/12 (2006.01)
C12P 19/42 (2006.01)

壹、發明名稱：

(中) 維生素 B 1 2 之生物合成途徑中涉及之基因及其所編碼之多肽，含有該基因之載體及宿主細胞，及製造維生素 B 1 2 之方法

(英) Genes and their encoded polypeptides involved in the biosynthetic pathway of vitamin B12, vectors and host cells comprising the genes, and process for producing vitamin B12

貳、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) D S M 智慧財產有限公司

(英) DSM IP ASSETS B.V.

代表人：(中) 1. 傑朗 哈特格

(英) 1. DEN HARTOG, JEROEN HENDRIKUS JOSEPH

地址：(中) 荷蘭黑倫里特歐佛倫一號

(英) Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, the Netherlands

國籍：(中英) 荷蘭 NETHERLANDS

參、發明人：(共 2 人)

1. 姓名：(中) 賀曼 派爾

(英) PEL, HERMAN JAN

地址：(中) 荷蘭艾莫爾愛肯路七十五號

(英) Eikenstraat 75, 1326 AH Almere, the Netherlands

2. 姓名：(中) 絲維雅 霍普

(英) HOPPER, SYLVIA

地址：(中) 德國馬廷瑞德洛區哈莫路十一號

(英) Lochhamer Str. 11, 82152 Martinsried, Germany

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲 ; 2002/07/25 ; 02255203.8 有主張優先權

■主張專利法第二十六條微生物：

■熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

發明專利說明書

99. 5. 21

年 月 日修(更)正替換頁

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92120267

※申請日期：92 年 07 月 24 日

※IPC 分類：

C12N 9/12 (2006.01)
C12P 19/42 (2006.01)

壹、發明名稱：

(中) 維生素 B 1 2 之生物合成途徑中涉及之基因及其所編碼之多肽，含有該基因之載體及宿主細胞，及製造維生素 B 1 2 之方法

(英) Genes and their encoded polypeptides involved in the biosynthetic pathway of vitamin B12, vectors and host cells comprising the genes, and process for producing vitamin B12

貳、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) D S M 智慧財產有限公司

(英) DSM IP ASSETS B.V.

代表人：(中) 1. 傑朗 哈特格

(英) 1. DEN HARTOG, JEROEN HENDRIKUS JOSEPH

地址：(中) 荷蘭黑倫里特歐佛倫一號

(英) Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, the Netherlands

國籍：(中英) 荷蘭 NETHERLANDS

參、發明人：(共 2 人)

1. 姓名：(中) 賀曼 派爾

(英) PEL, HERMAN JAN

地址：(中) 荷蘭艾莫爾愛肯路七十五號

(英) Eikenstraat 75, 1326 AH Almere, the Netherlands

2. 姓名：(中) 絲維雅 霍普

(英) HOPPER, SYLVIA

地址：(中) 德國馬廷瑞德洛區哈莫路十一號

(英) Lochhamer Str. 11, 82152 Martinsried, Germany

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲 ; 2002/07/25 ; 02255203.8 有主張優先權

■主張專利法第二十六條微生物：

■熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於與維生素 B₁₂ 生物合成途徑有關聯的基因以及蛋白質（例如酵素）。特定言之，本發明提供四種源自丙酸桿菌（*Propionibacteria*），尤其是費氏丙酸桿菌（*Propionibacterium freudenreichii*）的新穎基因（及其編碼之對應的酵素）。此類酵素是合成酶或轉移酶，以及可用於維生素 B₁₂ 之製作。

【先前技術】

諸論

維生素 B₁₂ 是人類及動物重要的維生素。其為必需的維生素，且係得自人類及動物的膳食食品。維生素 B₁₂ 存在於天然的動物食品中，包括：魚類、牛奶以及乳類產品、蛋類、肉類以及家禽。某些食品，例如早餐的穀類薄片係添加入維生素 B₁₂，並對素食者提供有價值的維生素來源。

維生素 B₁₂ 係可用於治療惡性貧血以及周圍的神經炎，以及亦為動物飼料之添加物。

本文術語之維生素 B₁₂ 是用以描述類鈷啉家族之化合物，尤其是氰鈷胺素群之化合物。此群化合物中最具指標性之化合物是氰鈷胺，因此有時可用維生素 B₁₂ 表示氰鈷胺。本文術語之維生素 B₁₂ 指廣義的維生素 B₁₂，因此包含所有氰鈷胺素群的類鈷啉，尤其是包含其特徵分別為氰

基、羥基、甲基或 5'-去氧腺苷基自由基之氰鈷胺、羥鈷胺素、甲基氰鈷胺素以及 5'-去氧腺苷基鈷胺素。

工業上製作維生素 B₁₂ 是利用微生物的發酵，尤其是使用反硝化假單胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*)。然而目前維生素 B₁₂ 之產量不符合生產維生素 B₁₂ 之成本效率。爲了增加維生素 B₁₂ 的生產率，則需要改良發酵方法。

反硝化假單胞菌中維生素 B₁₂ 之生物合成途徑已被特徵化²⁴。並說明於大部份的路徑²⁵。總共有 22 個酵素被純化，並已確認 22 個 *cob* 基因。然而某些此類基因所扮演的角色仍然是未知的。據推測與謝氏丙酸桿菌 (*Propionibacterium shermanii*) 中之作用雖然緊密的相關，但仍有一些不同的路徑。

此外，鼠傷寒沙門菌 (*Salmonella typhimurium*) 中鈷胺素之合成途徑亦經研究。鼠傷寒沙門菌 *cob* 操縱子已被分離並選殖入的大腸桿菌，而且付予新宿主前所未有之全新地製作氰鈷胺素之能力。就專利公告案而言，在 *Blanche of Rhone Poulenc Rorer* 之專利公告案中提及製備氰鈷胺素之生物合成方法。

在費氏丙酸桿菌中已假設總共有 14 個基因，負責編碼 17 個厭氧 B₁₂ 路徑步驟之酵素。然而此文件未提及任何序列，以及僅表現二種基因產物，聲稱可造成甲基化作用。彼係表現於大腸桿菌，以及並未揭示於此類基因在實際產生維生素 B₁₂ 上的用途。

雖然在工業上已使用丙酸桿菌製作維生素 B₁₂，但產率及產量並不完全地令人滿意，仍有改善空間。因此，本發明經從事研究闡明費氏丙酸桿菌之生物合成途徑，結果確認四種不同基因以及酵素。此可改進工業量級維生素 B₁₂ 之產量。

【發明內容】

本發明概要

目前提供與維生素 B₁₂ 之生物合成有關的新穎酵素。

廣義而言，本發明之第一特色係關於革蘭氏陽性細菌，放射菌目，例如丙酸桿菌科，例如丙酸桿菌屬，例如費氏丙酸桿菌之合成酶或轉移酶。此類酵素為（例如醯胺）合成酶或（例如磷醯基或核苷醯基）轉移酶。較佳者具有 EC 6.3.1.-、2.7.7.-、2.7.8.- 或 2.5.1.17 之活性。

更明確的說，本發明的第一特色提供分離及／或純化的合成酶或轉移酶多肽，其係包含：

- (i) 序列識別號：2、4、6 或 8 之胺基酸序列；或
- (ii) 合成酶或轉移酶 (i) 之變異體；或
- (iii) 合成酶或轉移酶 (i) 或 (ii) 之片段。

依據本發明之第二特色係提供多核苷酸，其係包含：

(a) 序列識別號 1、3、5 或 7 之核酸序列，或編碼本發明多肽之序列；

(b) 互補至，或雜交至任何定義於 (a) 之序列的序列；

(c) 任何 (a) 或 (b) 序列之片段；

(d) 與任何定義於 (a)，(b) 或 (c) 之序列至少有 60、65 或 70% 相似性之序列；或

(e) 任何定義於 (a) 至 (d) 之序列，因遺傳密碼退化造成的序列。

本發明亦提供：

— 一種 (例如表現) 載體 (第三特色)，其係包含本發明之多核苷酸以及可能表現本發明之多肽；

— 一種宿主 (第四特色)，例如包含本發明之載體之細胞系或菌株；

— 一種產生本發明多肽之方法，其係包含在適於表現多肽之條件下維持本發明之細胞系或菌株並視需要的分離多肽；以及

— 一種產生維生素 B₁₂ 或其前驅物之方法 (第五特色)，該方法包含接觸反應受質與本發明多肽或宿主細胞。

序列簡述

序列識別號 1 為本發明來自費氏丙酸桿菌之第一酵素醯胺合成酶的 DNA 序列；

序列識別號 2 為第一酵素 (A) 的胺基酸序列；

序列識別號 3 為來自相同生物體之第二酵素 (磷酸及 / 或核苷醯基) 轉移酶的 DNA 序列；

序列識別號 4 為第二酵素 (BA) 的胺基酸序列；

序列識別號 5 為來自相同生物體之第三醇素轉移酶的 DNA 序列；

序列識別號 6 為第三醇素 (C) 的胺基酸序列；

序列識別號 7 為來自相同生物體之第四醇素 (核苷醯基) 轉移酶的 DNA 序列；

序列識別號 8 為第四醇素 (D) 的胺基酸序列；以及
序列識別號 9 至 17 為引子。

發明之詳細描述

A. 多核苷酸

本發明提供編碼本發明多胜肽之 (例如分離及 / 或純化的) 多核苷酸。如此本發明提供多核苷酸, 較佳者編碼合成酶或轉移酶, 其胺基酸序列為序列識別號 2、4、6 及 / 或 8。本發明進一步的提供與編碼序列識別號 2、4、6 及 / 或 8 之胺基酸序列具有實質上胺基酸序列同源性之多核苷酸。

亦包括一種多肽, 其係選自:

(a) 包含序列識別號 1、3、5 及 / 或 7、或其互補之核苷酸序列的多核苷酸;

(b) 包含能 (例如選擇地) 雜交至序列識別號 1、3、5 或 7、或其片段之核苷酸序列的多核苷酸;

(c) 包含能 (例如選擇地) 雜交至與序列識別號 1、3、5 或 7 互補之核苷酸序列、或其片段的多核苷酸;

(d) 包含定義於 (a)、(b) 或 (c) 之聚核苷酸序

列由於遺傳密碼退化的結果產生之多核苷酸。

多核苷酸可含有 2、3 或更多個本發明之序列，例如序列識別號 1 及 5 或 1、3 及 5（或任何定義於（a）、（b）或（c）之變體）。

本發明之多核苷酸亦可包含以下之多核苷酸：

（a）編碼具有合成酶或轉移酶活性之多肽，該多核苷酸為：

（1）序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼序列；

（2）選擇地雜交至定義（1）之互補序列的序列；

或

（3）定義於（1）或（2）由於遺傳密碼退化的結果產生之序列；或

（b）互補至定義於（a）之多核苷酸的序列。

可雜交的序列

本文術語之“能雜交”意指本發明之目標多核苷酸（例如序列識別號 1、3、5 或 7，或其片段或其互補體之核苷酸序列）可作為探子在背景以上之水平雜交至核酸。本發明亦包括編碼合成酶或轉移酶之核苷酸序列或其變異體以及與彼互補的核苷酸序列。核苷酸序列可為 RNA 或 DNA 以及包括染色體 DNA、合成的 DNA 或互補 DNA）。較佳之核苷酸序列為 DNA 序列以及互補 DNA 序列。本發明典型地多核苷酸包含在選擇的條件下能雜交至序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼序列或互補之編碼序列的核苷酸之

鄰近的序列。該核苷酸可依據技藝上已知的方法合成¹。

本發明多核苷酸可在背景以上的程度（適宜的）雜交至序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼序列或其互補之編碼序列。因為例如互補 DNA 庫中存在有其它之互補 DNA，故可發生背景雜交。典型地信號程度（例如本發明多核苷酸與序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼序列或其互補之編碼序列之間產生的交互作用）至少是 10 倍，較佳者至少 100 倍，或者和其它多核苷酸與序列識別號 1、3、5 或 7 編碼序列間之交互作用一樣的強烈。交互作用之強度可加以測量，例如經放射性標記之探針，例如 ³²P。通常使用低嚴格條件（0.3 莫耳濃度氯化鈉以及 0.03 莫耳濃度檸檬酸鈉，約 40℃）、中嚴格（例如 0.3 莫耳濃度氯化鈉以及 0.03 莫耳濃度檸檬酸鈉，約 50℃）或高嚴格條件（例如 0.3 莫耳濃度氯化鈉以及 0.03 莫耳濃度檸檬酸鈉，約 60℃）可達成選擇性的雜交。可用技藝上已知的任何適當的條件¹進行雜交，以及低嚴格條件可為 2 x SSC，55℃、中嚴格條件可為 0.5 至 1.0 x SSC，60℃、以及高嚴格條件可為 0.1 或 0.2 x SSC，60℃或更高（例如 68℃），以上均含 0.5% SDS。

修正

本發明之多核苷酸可包含 DNA 或 RNA。彼可為單股或雙股的核苷酸。彼亦可為其中包含一個或多個合成的或經修正之核苷酸的多核苷酸。技藝上已知有許多不同修正

類型之多核苷酸。此類修正包含甲基磷酸酯以及硫代磷酸（酯）骨幹及／或在分子之 3' 及／或 5' 端添加吡啶或聚賴氨酸鏈。在本發明之目的中，據了解在此描述之多核苷酸可經在此技藝中提供的任何方法修正。

據了解熟悉此技藝的專業人士可使用常規地技藝，例如以反映任何表現本發明多肽的特定宿主生物體密碼子，選擇性的進行核苷酸取代而不影響本發明多核苷酸編碼之多肽序列。

序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼序列可經核苷酸取代，例如進行 1、2 或 3 多至 10、25、50 或 100 個取代加以修正。此外或額外地，多核苷酸可經一個或多個插入及／或刪除及／或在各端或兩端延伸加以修正。一般而言經修正之多核苷酸編碼其帶有合成酶或轉移酶活性之多肽。可製作退化取代及／或取代，當轉譯（例如以下多肽之討論）經修正之序列時，可導致保守胺基酸的取代。

同系物

能選擇地雜交至（例如互補至）序列識別號 1、3、5 或 7 之 DNA 編碼序列的核苷酸序列與序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼序列有至少 50% 或 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的序列相似性（或同源性）。此涵蓋的區域至少為 20，較佳者至少為 30，例如至少為 40 或 50，例如至少為 60 或 80，更佳者至少為 100、200、400、500 或 600 個鄰近的核

苷酸或最佳者為序列識別號 1、3、5 或 7 的全長。在個別地序列中，序列相似性大概可為：

(a) 以序列識別號 1 為例，至少 85% 或 90% ；

(b) 以序列識別號 3 為例，至少 70% ；

(c) 以序列識別號 5 為例，至少 90% 或 95% ；及 /

或

(d) 以序列識別號 7 為例，至少 95% 或 98% 。

任何上述同源性程度之組合以及最小量之大小可用以定義本發明之多核苷酸，更迫切的組合（即在更長的長度有較高的同源性）其係較佳。如此例如在 25，較佳者 30 個核苷酸中至少有 80% 或 90% 的同源性，以及在 40 個核苷酸中至少有 90% 的同源，形成本發明特色之一。

典型地多核苷酸（或蛋白質）序列之同系物，例如在至少 15、20、30、100 個更多的鄰近核苷酸（或胺基酸）區域至少有 70% 的同源性，較佳者至少 80、90%、95%、97% 或 99% 同源性。可基於胺基酸特性計算同源性（有時稱為“硬同源性”）。除非特別說明通常是基於全部序列計算特性或同源性。

例如 UWGCG 套裝軟體提供 BESTFIT 程式，其可用以計算同源性（例如用其預設設定）。可用 PILEUP 以及 BLAST 演算法計算同源性或排列序列（例如確認等效性或對應的序列，例如以其預設設定^{6,7}）。

進行 BLAST 分析的軟體是可公開得自 National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。此演算法包含先在詢問序列中確認長度 W 的短字與數據庫序列中相同長度的短字可匹配或滿足一些正臨界值 T ，以確認高評分序列對 (HSPs)。 T 為鄰居字分臨界值^{6,7}。此類起始命中的鄰居字可作為搜尋發現內含彼之 HSP 的種子。命中的字可自各序列往雙方向延伸直到累計的序列對比分數增加為止。當累計的序列對比分數從最大值達成值下降 X 量；由於累積一個或多個負分殘基序列對比使累計的分數變成零或以下；或到達序列的一個端點，則命中的字在各方向之延伸即可停止。BLAST 演算法之參數 W 、 T 以及 X 可決定序列對比之敏感度及速度。BLAST 程式預設之字長度 (W) 為 11，BLOSUM62 分數矩陣⁸ 序列對比 (B) 為 50，期望值 (E) 為 10， $M=5$ ， $N=4$ ，並比較雙股。

BLAST 演算法在二個序列之間進行相似性之統計分析⁹。BLAST 演算法提供的相似性測量之一是最小總數或然率 ($P(N)$)，其提供二個核苷酸或胺基酸序列間發生偶然匹配之或然率。例如，若比較第一序列與第二序列後其最小總數或然率少於約 1，較佳者少於約 0.1，更佳者少於約 0.01，最佳者少於約 0.001，則可考慮序列相似於另一序列。

片段、同系物以及其它變異體可至少為 500 或 550 個核苷酸之長度 (例如序列識別號 7) 以及至少可編碼對應蛋白質 (例如第一) 之 170、180 或 200 個胺基酸。

引子以及探針

本發明多核苷酸可作為引子，例如 PCR 引子、放大反應引子、探針、或可選殖入載體的多核苷酸。該引子、探針以及其它片段之長度至少或多至為 20，例如至少 25、30 或 40 個核苷酸。典型地長度可為序列識別號 1、3、5 或 7 編碼序列之 40、50、60、70、100、150、200 或 300 個核苷酸，或即使更多或更少個核苷酸（例如 5 或 10 核苷酸）。

一般而言，引子是用合成的方法製作，包含依據所要求的核酸序列將核苷酸一次一個依序合成之步驟。可使用在此技藝中提供的自動化技藝加以完成。

一般而言較長的多核苷酸是使用重組方法製作，例如使用 PCR（聚合酶連鎖反應）選殖技藝。其係包含製作一對引子（例如約 15 - 30 個核苷酸），其係對應至合成酶或轉移酶選殖區域，將引子與得自目標（例如：酵母菌、細菌、植物、原核或真菌的）細胞（較佳細菌，例如丙酸桿菌品系）之傳訊 RNA 或互補 DNA 接觸，在放大所要求的區域之條件下進行聚合酶連鎖反應，分離放大的片段（例如用瓊脂糖凝膠純化反應混合物）以及回收放大的 DNA。引子可設計成含有適當的限制酶識別位而使放大的 DNA 可選殖入適當的選殖載體。

該技藝可用以取得在此描述的所有或部份之合成酶或轉移酶序列。本發明中對應至 cDNA 序列識別號 1、3、5 或 7 或合成酶或轉移酶基因之基因體選殖菌落可內含例如

：內子以及啓動子區域以及彼亦可得自起始自菌的、酵母菌、細菌性植物或原核細胞基因體 DNA 之類似的方法（例如重組方法、PCR、選殖技藝）。

多核苷酸或引子可攜帶透露標記，例如放射性的或非放射性的標記。適當的標記包含放射性同位素，例如 ^{32}P 或 ^{35}S 酵素標記、或其它蛋白質標記，例如生物素。該標記可為添加入本發明之多核苷酸或引子以及可使用習知的技藝本身偵測。

核酸為基礎的測試可使用標記或未標記的核苷酸進行偵測或定序樣本（例如細菌的樣本）中之合成酶或轉移酶或其變異體。一般而言該偵測測試包含將疑似內含 DNA 的（例如細菌的）樣本與本發明探子或引子在雜交條件下接觸以及偵測探子與樣本中之核酸形成的任何雙體。可使用例如 PCR 技藝達成該檢測或將探子固定於固態持物上，去除樣本中不與探子雜交之核酸，然後偵測雜交至探子的核酸。此外，可將樣本核酸固定於固態支持物，以及偵測結合至該支持物的探子。

本發明探針可在適當的容器中方便地包裝成測驗組套的形式。該組套中探針可結合至固態支持物而該組套設計之分析形式中則需要該結合。該組套亦可含有處理探測之樣本、進行探針與樣本核酸之雜交的適當試劑、控制組試劑、說明書等。

較佳者，本發明之多核苷酸係得自相同生物體之多肽，例如細菌，尤其是分歧桿菌科的細菌，較佳者是丙酸

桿菌屬。

本發明多核苷酸亦包含帶有合成酶或轉移酶活性之序列識別號 1、3、5 或 7 序列的變異體。經加入、取代及／或刪除可形成變異體，以及可帶有合成酶或轉移酶或 EC 6.3.1-、2.7.7（或 8）.- 或 2.5.1.17 之活性。

產生多核苷酸

有許多方法可得到與序列識別號 1、3、5 或 7 沒有 100% 相同但屬於本發明範圍之多核苷酸。如此例如經由探測基因體 DNA 基因庫（製作自許多生物體，例如本發明多胜肽來源所討論的生物體）可得到在此描述之序列變異體。此外，可得自其它細菌的或原核的同系物，一般而言該同系物以及其片段將能與序列識別號 1、3、5 或 7 雜交。經探測其它物種之互補 DNA 基因庫或基因體 DNA 基因庫，以及用包含所有或部份之 SEQ ID. 1、3、5 或 7 之探針在中至高嚴格之條件下（描述如上）探測該基因庫可得到該序列。可使用包含所有或部份之序列識別號 1、3、5 或 7 之核酸探針以探測其它物種（例如本發明多胜肽來源描述之物種）之互補 DNA 基因庫。

使用退化性聚合酶鏈反應亦可得到物種同系物，其係使用設計成標定的變異體與編碼保守的胺基酸序列同系物之引子。該引子可含有一個或多個退化位置以及可用於較低於以單一的序列引子針對習知的序列進行序列選殖的迫切條件。

此外，合成酶或轉移酶序列或其變異體經位點定向誘變可得到該多核苷酸。此舉可適用於例如序列須要進行沈默密碼子的改變以最適化特定的宿主細胞在表現聚核苷酸序列之密碼子優先性。其它序列之改變可能是爲了引入限制酶識別位，或改變多核苷酸編碼多胜肽之性質或功能。

本發明包括雙股的多核苷酸，其係包含本發明之多核苷酸以及其互補體。

本發明亦提供編碼如下描述之本發明多胜肽的多核苷酸。由於該多核苷酸序列將用以重組產生本發明之多胜肽，所以雖然最好能，但不必一定要能雜交至序列識別號 1、3、5 或 7 之序列。或者，視需要該多核苷酸可用上述方法加以標記，使用、以及製作。

B. 多胜肽

本發明係關於（例如實質上純化的及／或分離的）合成酶或轉移酶或其定義於下之變異體。本發明多胜肽本質上可含有序列識別號 2、4、6 或 8 或該序列變異體之胺基酸序列。多胜肽亦可爲本發明說明如上之多核苷酸編碼之多胜肽。

本發明多肽可爲分離或相當純的形式。據瞭解該多肽可與不妨礙預期目的及／多肽功能之載體或稀釋劑混合以及仍視爲實質上的分離形式。一般而言多肽將內含於制劑中，制劑大於 20%，例如大於 30%、40%、50%、80%、90%、95% 或 99%、以重量計之多肽爲本發明之多肽

。常規地方法可用以純化及／或合成依據本發明之蛋白質¹。在一些調配物中（例如非藥學的用途）多肽用量可小到例如 0.01 至 10%，例如 0.1 至 5%、或 2% 或甚至 0.2 至 1%。

較佳者，本發明多肽係得自微生物，例如具有編碼合成酶或轉移酶酵素活性基因之微生物。更佳者該微生物是細菌，例如革蘭氏陽性細菌。微生物可為放線菌（Actinobacteria）門或綱，例如放線菌亞綱（Subclass Adinobacteridae）。較佳的微生是放射菌目，例如丙酸菌亞目以及最佳的是丙酸菌科。如此較佳的生物體是丙酸桿菌屬，例如費氏丙酸桿菌。較佳的微生物是能產生或合成維生素 B₁₂。

活性

本發明多肽具有一種或多種以下之特色，其為

- （1）具有合成酶或轉移酶活性；
- （2）作用如醯胺合成酶或磷基－、核苷醯基－或芳基轉移酶；
- （3）催化維生素 B₁₂ 生物合成途徑中至少一個步驟；
- （4）具有 EC 6.3.1－、EC 2.7.7－、EC 2.7.8－或 EC 2.5.1.17 之活性；
- （5）長度為 150 或 170 至 270 或 300 個胺基酸或從 800 或 840 至 880 或 920 個胺基酸；

(6) 是鈷啉胺酸 - a, c - 二醯胺合成酶、鈷啉醇醯胺磷激酶、鈷啉醇醯胺磷酸鹽甲脒基轉移酶、氰鈷胺素 (5' - 磷酸鹽) 合成酶及 / 或腺苷基轉移酶；

(7) 作用之受質、或產生之產物，包含：

(i) 咕啉核心或環系統；

(ii) 多至 4 個芳基 (可視需要具有吡咯) 的環；

(iii) 四吡咯環系統及 / 或過渡金屬 (例如鈷) 原子；及 / 或

(iv) 醯胺、磷酸鹽、胍基、芳基或腺苷基部分或基團；及 / 或

(8) 催化醯胺化、磷酸化、核苷醯基化、芳基化、核醯化或腺苷基加成及 / 或腺苷基化。

本發明多胜肽主要的特性如下表。

指定/反應	DNA 序列識別號(長度,核苷酸)	蛋白質序列識別號	序列長度(氨基酸)	酵素活性	受質	產物(公式)	酵素分類/類型	基因參考號碼(編號)
A	1(2586)	2	861	鈷胺胺酸 a,c 二醯胺合成酶 (EC 6.6.3.-)	鈷胺胺酸(I)	鈷胺胺酸 a,c 二醯胺 (IB)(含中間物鈷胺胺酸 c-醯胺, IA)	(醯胺)合成酶	PFR 111925 (cobA/cbiA)
B(B1, B2)	3(657)	4	218	鈷胺醇醯胺磷酸激酶(EC 2.7.1.) 鈷胺醇醯胺磷酸甲脞基轉移酶(EC 2.7.7.)	腺苷基鈷胺醇醯胺(II) 腺苷基鈷胺醇醯胺磷酸鹽(IIA)	腺苷基鈷胺醇醯胺磷酸 腺苷基-GDP-鈷胺醯胺 (IIB)	(磷酸)轉移酶 (核苷基)轉移酶	PFR 111926 (cobU)
C	5(780)	6	256	氰鈷胺素(5'-磷酸鹽)合成酶 (EC 2.7.8.-)	腺苷基-GDP-鈷胺醯胺(IIB) 腺苷基-5,6-二甲基苯并咪唑基鈷胺醯胺(腺苷基)素 B ₁₂ (IIC)	腺苷基-5,6-二甲基苯并咪唑基鈷胺醯胺(腺苷基)素 B ₁₂ (IIC)	(芳基)轉移酶	PFR111927 (cobS)
D	7(603)	8	200	(氰鈷胺素)腺苷基轉移酶(EC 2.5.1.17)	鈷胺胺酸 a,c 二醯胺(II)	腺苷基鈷胺胺酸 a,c 二醯胺(II)	(核苷基)轉移酶	PFR 111924

變異體及同系物

本發明多肽包含序列識別號 2、4、6 或 8（或其變異體，例如）之胺基酸序列實質上同源的序列或各序列之片段，以及具有合成酶或轉移酶活性。一般而言，較佳者為展示於序列識別號 2、4、6 或 8 的天然胺基酸序列。

特定言之，本發明多肽可包括：

（a）序列識別號 2、4、6 或 8 之多肽序列；

（b）天然變異體或其物種同系物、同物種同源基因產物或異物種同源基因產物；或

（c）與（a）或（b）有至少 70、至少 80、至少 90、至少 95、至少 98 或至少 99% 序列相似性之蛋白質。

變異體可為天然發生的變異體，例如發生於真菌、細菌、酵母菌或植物細胞以及其功能實質上相似於序列識別號 2、4、6 或 8 之蛋白質，例如有合成酶或轉移酶之活性。同樣地，物種同質性之蛋白質是等值的蛋白質，其為另一種物種天然發生的蛋白質，其功能為合成酶或轉移酶酵素。變異體包含來自本發明多肽之相同菌株或不同菌株（但相同屬），或相同種之對偶基因的變異體。

變異體以及物種同系物可得自以下描述之產生序列識別號 2、4、6 或 8 之多肽的方法，並於適當的細胞來源，例如細菌、酵母菌、真菌或植物細胞進行該方法。亦可使用定義如上之探針探測產自酵母菌、細菌、真菌或植物細胞的基因庫以取得包括變異體或物種同源性的菌落。菌落可用產生本發明多肽的習見技藝操作，然後可用習知的重

組或合成的技藝本身製作。

本發明多肽較佳者至少與序列識別號 2、4、6 或 8 之任何蛋白質的各自序列區域中例如一段至少 60 與至少 100、150；200、250 或 300（或甚至 500、600、700 或 800）鄰近的胺基酸或序列識別號 2、4、6 或 8 的全長有 70% 之序列相似性，更佳者至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 97% 或至少 99% 之序列相似性。在個別地序列中，序列相似性大概可為：

（a）以序列識別號 2 為例，至少 55%、60% 或 65%

；

（b）以序列識別號 4 為例，至少 50%、55% 或 60%

；

（c）以序列識別號 6 為例，至少 40% 或 45%；及 /

或

（d）以序列識別號 8 為例，至少 90%、95%、98% 或 99%（例如超過，或至少比 150、170、200 或 230 個胺基酸還長的序列）。

如此序列識別號 2、4、6 或 8 之多肽序列以及變異體及物種同系物可經修正以作為本發明之多肽。胺基酸取代物可為例如多至從 1、2 或 3 至 10、20、30、50 或 100 之取代。亦可製作相同數目之刪除及插入。此類改變可位於多肽功能關鍵區域之外以及仍可產生有活性的酵素。一般而言經修正之多肽仍可保留合成酶或轉移酶之活性。

本發明多肽包含上述全長多肽之片段以及其變異

體，包括序列識別號 2、4、6 或 8 序列之片段。該片段典型地仍保留合成酶或轉移酶之活性。片段可至少長 50、100、150、200 或 250 個胺基酸或可少於此數之全長的胺基酸序列（如展示於序列識別號 2、4、6 或 8）。

如果必要的話本發明多胜肽可用合成的方法製作，雖然通常彼將用如下列所述之重組方法製作。彼可經修正，例如添加組氨酸殘基或 T7 標籤以助於其辨別或純化或經添加信號序列以促進其分泌至細胞外。

本文術語之“變異體”意指其帶有與合成酶或轉移酶相同的基本特性或基本生物學功能之多胜肽，以及包含對偶基因的變異體。合成酶的基本特性是展現 6.3.-.-.（例如 EC 6.3.1.-.）活性或可將胺基加至受質（例如醯胺）的酵素。轉移酶是展現 EC 2.7.-.-.（例如 EC 2.7.7 或 8.-）或 EC 2.5.-.-.（例如 EC 2.5.1,-，例如 EC 2.5.1.17）活性或可將取代基或化學部分從一個化合物轉送到另一化合物的酵素。較佳之變異體是具有相同活性之多肽。具有相同基本特性之多肽其可經反應受質降解試驗確認。

序列識別號 2、4、6 或 8 之變異體亦包含變化自序列識別號 2、4、6 或 8 但未必是源自天然酵素之序列。此類變異體可描述為序列識別號 2、4、6 或 8 之同源性百分比或具有許多取代的此一序列。此外，變異體可為雜交至序列識別號 1、3、5 或 7 之編碼的多核苷酸。

該變異體之定義與序列識別號 1、3、5 或 7 之變異體

的定義相似。如此變異體可包含序列源自其它細菌的品系。例如丙酸桿菌之變異體。其它變異體可經尋找合成酶或轉移酶活性確認自其它品系，並加以選殖及定序。變異體可包含在蛋白質序列中刪除、修正或添加單一胺基酸或一群胺基酸，只要該肽仍維持基本的生物學功能，例如合成酶或轉移酶。

可例如依據下表製作保守性替換。第二欄之相同方塊中的胺基酸，較佳者第三欄之同一列，可相互取代。較佳之取代不會影響多肽之摺疊或活性。

脂肪族的胺基酸	非極性	G A P
		I L V
	極性 - 不帶電	C S T M
		N Q
	極性 - 帶電價	D E
		K R
芳香族的胺基酸		H F W Y

較短的多肽序列亦屬於本發明範圍。例如，長度至少 50 個胺基酸或多至 60、70、80、100、150、200、400、500、600 或 700 個胺基酸之肽只要顯示基本的合成酶或轉移酶生物學功能亦屬於本發明範圍。特定言之，但非排外，本發明特色包含蛋白質是完全蛋白質序列片段之狀況以及可包含或代表反應受質結合區域、切斷及 / 或轉移區

域。

修正

本發明多胜肽可經化學地修正，例如轉譯後之修正。例如，彼可包含經修正之胺基酸殘基。彼亦可添加組氨酸殘基（幫助其純化）或添加信號序列（促進插入細胞膜）加以修正。多肽可帶有一個或多個（N）胺基—或（C）羧基—端的延伸端，例如胺基端之甲硫胺酸殘基；多至約20—25 殘基小連結子肽、或可增進純化之（小）延伸端，例如多組氨酸或 T7 標籤、抗原性的抗原決定部位或（例如麥芽糖）結合結構區 14（例如位於 C—端）。此類延伸端可或不可經由連結子加入。

本發明多肽可用透露標籤加以標記。透露標籤可為允許偵測多肽之任何適當的標籤。

適當的標記包含放射性同位素，例如 ^{125}I 、 ^{35}S 、酵素、抗體、多核苷酸以及連結子例如生物素。

多肽可修正成包含非天然胺基酸或增加多肽穩定性。當用合成的方法製作肽，該胺基酸可在生產期間引入。肽亦可在合成或重組產生之後加以修正。

本發明多胜肽亦可使用，或包含（一個或多個） β -胺基酸加以製作。

許多側鏈之修正是已知的技藝以及可施用於本發明蛋白質或肽類之側鏈。該修正包括例如：與醛反應接著用 NaBH_4 還原，還原烷化修正胺基酸、用甲基乙醯亞胺酯醯

胺化或用乙酸酐醃化。

本發明提供之序列亦可作為構築“第二代”酵素之起始材料。“第二代”酵素是經誘變技藝（例如定點突變）加以改變，其性質與野生型或重組酵素例如本發明製作之酵素不同。例如，可改變最適宜之溫度或酸鹼度、比活性、反應受質親和性或耐熱性，以更適於應用至特定之方法。

因此具有活性所必需的胺基酸，是取代較佳的目標，其可依據技藝上已知的方法，例如位點定向誘變或丙胺酸掃描誘變¹⁰加以確認。後一技術中，在分子的每一殘基引入突變，測試產生的突變分子之生物活性（例如合成酶或轉移酶活性）以確認明分子活性關鍵的胺基酸殘基。亦可用核磁共振、結晶學或光親合力、標記^{11,12,13}或分子模型測定之晶體結構分析測定酵素受質交互作用位點。

使用可提供後轉譯修正作用（例如蛋白質水解加工、十六烷基化作用、糖基化作用、截斷以及酪胺酸、絲胺酸或蘇胺酸磷酸化作用）的酵母菌及真菌宿主細胞以影響重組表現本發明產物的生物活性。

本發明多肽可提供其天然細胞環境以外的形式。因此，彼實質上可被分離或純化（討論如上）、或製作自天然上不含此肽之細胞，例如其它細菌、動物細胞、酵母菌、或真菌。

C. 重組特色

本發明亦提供包含本發明多核苷酸之載體，其係包括選殖以及表現載體，以及生長（例如在發生表現本發明多肽之條件下）、轉形或轉染該載體至適當的宿主細胞的方法。亦提供包含本發明多核苷酸或載體之宿主細胞，其中多核苷酸是宿主細胞染色體之異源性的多核苷酸。本文術語之“異源性”通常係關於宿主細胞，意指宿主細胞染色體中非天然發生的多核苷酸或細胞中非天然製作的多肽。較佳之宿主細胞是細菌的細胞，例如（例如革蘭氏陽性）丙酸桿菌科細胞。

本發明之多核苷酸可併入重組可複製性的載體，例如選殖或表現載體。在相容的宿主細胞中載體可用以複製核酸。如此本發明進一步的具體實施例是提供產生本發明多核苷酸之方法，其係將本發明之多核苷酸引入可複製的載體，將載體引入相容的宿主細胞，以及在生長宿主細胞之條件下複製載體。載體可自宿主細胞中回收。適當的宿主細胞與表現載體將描述如下。

載體

本發明多核苷酸可插入表現卡式盒。插入表現卡式盒或本發明多核苷酸的載體可為任何可方便地使用在重組DNA方法之載體，載體之選擇經常取決於引入之宿主細胞。因此，載體可為獨立自主複製的載體，即存在於染色體外的載體，其複製與染色體的複製無關，例如為一種質體。此外，當載體引入宿主細胞後可插入宿主細胞的染色

體，且與彼插入的染色體共同複製。

本發明多核苷酸係操作地聯結至能提供宿主細胞自其編碼序列表現多肽的調控序列，即該載體是表現載體。本文術語之“操作地聯結”意指並置，其中描述之成份為容許以其預期的方式作用之關係。調控的序列例如啓動子、強化子或其他的表現調控信號，係“操作地聯結”至編碼序列，其置入方法係足以使控制的序列在相容之條件下表現其編碼序列。

載體可為質體、黏接質體、病毒或噬菌體載體，通常提供複製起始點、可視需要表現多核苷酸之啓動子以及可視需要之增強子及／或啓動子調節器。可存在終止子序列，以及聚腺苷酸化序列。載體可含有一個或多個可選擇的標記基因，例如抗氨比西林基因（細菌的質體）或新黴素抗性基因（哺乳動物的載體）。可在活體外使用載體，例如產生 RNA 或用以轉染或轉形宿主細胞。彼可包含兩種或多種本發明多核苷酸，例如用於過度表現。

載體可包含二種、三種或所有四種本發明多核苷酸，換言之至少二種、三種或四種編碼四種本發明多胜肽（序列識別號 2、4、6 以及 8，或變異體（片段或其實質上同源的序列）（定義如前）之聚核苷酸序列。較佳的組合包含編碼蛋白質 B（cobU）以及蛋白質 C（cobS），可視需要具有第三種蛋白質 A（cobA／cbiA）之序列。因此，載體可包含序列識別號 1、3、5 及／或 7，或其片段，或與其雜交之序列（如定義於上）。

較佳者至少為相同操縱子（例如操縱子 C）內之 2、3 以及（最佳者為）4 個多核苷酸。

彼可安排而使載體（或宿主）包含操縱子、或包含編碼一個或多個下列酵素之序列，其次序為：（核苷醯基）轉移酶、（醯胺）合成酶、（磷基）轉移酶及／或（核苷醯基）轉移酶、（芳基）轉移酶。因此，若存在所有四種多核苷酸，則較佳之順序為序列識別號 7、1、3、5（或先前定義之此類序列的變異體）。

引入適當宿主的編碼多肽之 DNA 序列，較佳者是表現盒（或建築體）的一部份，其中 DNA 序列係操作地聯結至其能直接地在宿主細胞中表現 DNA 序列之表現訊息。轉形表現建構體引入適當的宿主時，可使用熟悉此技藝的專業人士熟知的轉形方法^{3,4}。

轉形宿主之表現建構體可為攜帶可選擇標記的載體之一部份，或表現建構體可與攜帶可選擇標記的載體之分開分子共同進行共轉形的作用。載體可包含一種或多種可選擇的標記基因。

較佳的選擇性標識^{15,16}包含（但非限於）那些可互補宿主細胞缺點或賦予藥物抗性的標識。彼包含例如可作為轉形之細菌（例如大腸桿菌）、大多數絲狀真菌以及酵母菌之各種標記基因，例如乙醯胺酶基因或 cDNA（構巢曲菌（*A. nidulans*）、米曲霉（*A. oryzae*）、或黑曲霉（*A. niger*）之 *amdS*、*niaD*、*facA* 基因或 cDNA），或提供抗生素如 G418、潮黴素、博來霉素、康黴素、腐草黴素

或免賴得抗性 (benA) 之抗性基因。此外，可使用需要對應的突變宿主品系之專一性選擇標識 (例如營養缺陷的標識)：例如 URA3 (來自啤酒酵母或其它酵母菌的同功基因)、pyrG 或 pyrA (來自構巢曲菌或黑曲霉)、argB (來自構巢曲菌或黑曲霉) 或 trpC。在較佳的具體實施例中，自轉形的宿主細胞刪除選擇標記之後引入表現建構體以使取得能產生不含選擇標記基因之多肽的轉形宿主細胞^{21,22}。

其它標識包含 ATP 合成酶、次單體 9 (oliC)、乳清嘧啶-5'-磷酸鹽脫羧酶 (pvrA)，細菌的 G418 抗性基因 (此亦可為用於酵母菌，但非真菌)，抗氨比西林基因 (大腸桿菌)、新黴素抗性基因 (桿菌) 以及大腸桿菌 uidA 基因，編碼 β -葡萄糖醛酸苷酶 (GUS) 之基因。可在活體外使用載體，例如產生 RNA 或用以轉染或轉形宿主細胞。

對大多數的絲狀真菌、酵母菌或細菌而言，載體或表現建構體較佳者係插入宿主細胞染色體以取得穩定轉形株。然而，對某些酵母菌而言亦可提供併入穩定及高度表現表現建構體之適當的染色體外核酸體型載體，其實施例包含源自 2μ 之載體以及酵母菌以及克魯維酵母之 pKD1 質體，或內含 AMA 序列之載體 (例如麴菌之 AMA1^{3,20})。在表現構築體插入宿主細胞基因組的案例中，構築體可使用同源重組作用隨機插入基因組中之基因座，或預定目標的基因座，在後一案例中，較佳之目標基因座係包含高度

表現的基因。高度表現的基因是傳訊 RNA 佔總細胞傳訊 RNA 的至少 0.01% (w/w) 之基因 (例如在誘發的條件下)，或基因產物佔總細胞蛋白質至少 0.2% (w/w) 的基因，或分泌的基因產物其分泌的水準至少為 0.05 克/升。許多高度表現基因的適當實施例將提供於下。

給定的宿主細胞之載體或表現建構體可包含下列從相對編碼第一發明多肽密碼股序列之 5'端至 3'一端以連續不斷的次序相互操作地聯結的元件：

(1) 在給定的宿主細胞中能直接地轉錄編碼多肽 DNA 序列之啓動子序列；

(2) 可視需要，能直接地從給定的宿主細胞分泌多肽至培養基之信號序列；

(3) 編碼成熟的以及較佳者為多肽活性形式的 DNA 序列；以及較佳者亦含有

(4) 編碼多肽 DNA 序列下游能終止轉錄轉錄之終止區域 (終止子)。

編碼多肽之 DNA 序列下游 可為內含一個或多個轉錄終止位點 (例如終止子) 之 3' 未轉譯的區域。終止子的起點較不重要。終止子可為例如天然的編碼多肽之 DNA 序列。然而，較佳者是在酵母菌宿主細胞中使用酵母菌終止子以及在絲狀真菌的宿主細胞中使用絲狀真菌的終止子以及細菌細胞的細菌終止子。更佳者，是宿主細胞 (其中表現編碼多肽之 DNA 序列) 之內生的終止子。

選擇可增加表現的異性調控區域，例如啓動子、及/

或終止子區域，亦可達成增強編碼本發明多肽多核苷酸之表現以及，可視需要增強宿主分泌重要蛋白質的量，及／或可提供可誘發本發明多肽表現的控制元件。

除了編碼本發明多肽之基因的天然啓動子以外，可使用其它啓動子表現本發明之多肽。可選擇在表現宿主中可有效表現本發明多肽之啓動子。

可選擇在設計上係具有能和宿主細胞相容共存之啓動子／增強子以及其它表現調控的訊息之表現載體。爲了要在細菌中有效的進行表現，例如可使用適用於大腸桿菌品系之啓動子。當在哺乳動物的細胞中進行表現時，可使用哺乳動物的啓動子。亦可使用組織專一性啓動子，例如肝細胞細胞專一性啓動子。亦可使用病毒的啓動子，例如 Moloney 小鼠白血病病毒長末端重複序列 (MMLV LTR)、Rous 肉瘤病毒 (RSV) LTR 啓動子、SV40 (例如大的 T 抗原) 啓動子、人類巨細胞病毒 (CMV) IE 啓動子、單純胞疹病毒啓動子或腺病毒啓動子、RSV 啓動子例如 HSV IE 啓動子、或 HPV 啓動子，尤其是 HPV 上游調控的區域 (LTRR)。酵母菌啓動子包含釀酒酵母菌 (*S. cerevisiae*) 之 GAL4 以及 ADH 啓動子、裂變酵母 (*S. pombe*) 之 nmt 1 以及 adh 啓動子。哺乳動物的啓動子包含金屬硫蛋白啓動子，其可誘發重金屬例如鎘的反應以及 β -肌動蛋白啓動子。尤佳者爲組織專一性啓動子，尤其是內皮的或神經元的細胞專一性啓動子 (例如 DDAHI 以及 DDAHII 啓動子)。

能使用各種可在本發明宿主細胞中直接轉錄的啓動子^{15,16}。較佳者，啓動子序列係源自之前定義的高度表現之基因。較佳源自及／或其包含表現構築體嵌入較佳的預定目標基因座啓動子之較佳的高度表現基因的實施例包含（但非限於）編碼糖解酵素，例如丙糖－磷酸鹽異構酶（TPI）、甘油醛磷酸鹽去氫酶（GAPD）、磷酸甘油酸激酶（PGK）、丙酮酸激酶（PYK）、乙醇脫氫酶（ADH）之基因，與編碼澱粉酶、葡糖澱粉酶、蛋白酶、木聚糖酶、細胞生物水解酶、 β -半乳糖苷酶、酒精（甲醇）氧化酶、延伸因子以及核糖體的蛋白質之基因。適當的高度表現基因的特定實施例包含例如：克魯維酵母（*Kluyveromyces* sp.）之 LAC4 基因、漢遜酵母（*Hansenula*）以及畢赤酵母（*Pichia*）之甲醇氧化基因（分別地為 AOX 以及 MOX）、黑曲霉（*A. niger*）以及泡盛曲霉（*A. awamori*）之葡糖澱粉酶（*glaA*）基因、米曲霉（*A. oryzae*）之 TAKA 澱粉基因、構巢曲菌（*A. nidulans*）之 *gpdA* 基因以及裡氏木黴（*T. reesei*）之細胞生物水解酶基因。

較佳的應用於真菌表現宿主^{15,16}的有力的既存的及／或可誘發的啓動子之實施例係可得自真菌基因木聚糖酶（*xlnA*）、植酸酶、ATP-合成酶、次單體 9（*oliC*）、丙糖磷酸鹽異構酶（*tpi*）、乙醇脫氫酶（*AdhA*）、 α -澱粉（*amy*）、戊基葡萄糖苷酶（AG-來自 *glaA* 基因）、acet 醯胺酶（*amdS*）以及甘油醛-3-磷酸鹽去氫酶（

gpd) 的啓動子。

有力的酵母菌啓動子之實施例係來自乙醇脫氫酶、乳糖酶、3-磷酸甘油酸激酶以及丙糖磷酸異構酶基因。

有力的細菌啓動子的實施例是 α -澱粉酶以及 SPo2 啓動子，與細胞外蛋白質基因之啓動子。

適用於植物細胞之啓動子包含胭脂鹼合成酶 (nos)、章魚鹼合成酶 (ocs)、甘露鹼合成酶 (mas)、核酮糖小次單體 (rubico ssu)、組織蛋白、稻米肌動蛋白、菜豆蛋白；花椰菜鑲嵌病毒 (CMV) 35S 以及 19S 以及環狀病毒之啓動子，所有此類啓動子均可立即得自己知的技藝。

載體可進一步的包含得自 RNA 鄰接的多核苷酸序列，其係包含真核基因體序列（較佳者為哺乳動物的基因體序列，或病毒基因體的序列）的同源序列。此將允許真核細胞或病毒之染色體經同源重組作用引入本發明之多核苷酸。特定言之，包含表現盒鄰接病毒序列的質體載體可用以製備適用於運送本發明多核苷酸至哺乳動物細胞的病毒載體。其它適當的病毒載體之實施例包含單純疱疹病毒的載體^{18,19} 以及反轉錄病毒，包括豆狀病毒、腺病毒、腺病毒相關的病毒及 HPV 病毒（例如 HPV-16 或 HPV-18）。對熟悉此技藝的專業人士而言使用此類病毒之基因移轉術是習知的技藝。例如可使用反轉錄病毒載體將此多核苷酸以產生反義 RNA 的方式穩定地整合入宿主基因組。反之，複製具有缺陷的腺病毒載體則保持基因附體的形

式，因此可允許短暫的表現。

載體可含有反義方向之本發明多核苷酸以產生反義 RNA。若必要的話。此可用以降低多肽表現之含量。

在細菌中，可使用特別的載體，例如表現載體或質體。丙酸桿菌的適當載體以及表現系統是已知的技藝^{27,28,30}。例如可使用來自另一種丙酸桿菌（例如酸性丙酸桿菌）之質體。此質體可用於製備內含酸性丙酸桿菌（*P. acidipropionici*）質體六個開放編閱架構中的一個或多個開放編閱架構之穿梭載體（例如 pPK705）。載體可含有藥物標記，例如抗潮黴素（hygromycin）B 基因。此載體已成功地轉形入費氏丙酸桿菌謝氏亞種。該轉形可經電穿孔法進行。

可使用尤其是適用於丙酸桿菌（尤其是費氏丙酸桿菌謝氏亞種）之許多啓動子。此類啓動子包含丙酸桿菌啓動子 P4 以及 P138。

此外，可使用一個或多個丙酸桿菌內生性的質體，或源自該質體之載體，以在細菌中表現較佳之異性蛋白質。該質體以及載體是習知的技藝²⁹以及可為基於丙酸桿菌 LMG16545（寄存編號 CBS 101022 以及 CBS 101023）之質體。

宿主細胞以及表現

本發明進一步的特色是提供製備依據本發明多肽之方法，其係在（以載體）表現依據本發明之多肽之條件下培

養宿主細胞（例如轉形或轉染說明如上之表現載體）以及可視需要回收表現的多肽。本發明之多核苷酸可併入重組可複製性的載體，例如表現載體。在相容的宿主細胞中載體可用以複製核酸。其可至少含有一個本發明多核苷酸之複本（例如多重複本）。如此本發明進一步的具體實施例是提供產生本發明多核苷酸之方法，其係將本發明之多核苷酸引入可複製的載體，將載體引入相容的宿主細胞，以及在生長宿主細胞之條件下複製載體。載體可自宿主細胞中回收。適當的宿主細胞包含細菌，較佳者革蘭氏陽性細菌例如丙酸桿菌科之細菌。其他可包含大腸桿菌、酵母菌、哺乳動物的細胞系以及其它真核細胞株，例如昆蟲細胞例如 Sf9 細胞以及（例如絲狀的）真菌細胞。

多肽係製作成分泌的蛋白質，此案例中表現建構體中編碼成熟多肽形式的 DNA 序列可操作地聯結至編碼信號肽的 DNA 序列。較佳者該信號序列是編碼多肽的天然（同源的）DNA 序列。此外，信號序列可為編碼多肽的 DNA 序列之外來的（異性的）序列，在此案例中，較佳之信號序列是表現 DNA 序列的宿主細胞之內生性序列。適當的酵母菌宿主細胞信號序列之實施例是源自酵母菌 α -因子基因之信號序列。同樣地，絲狀真菌宿主細胞的適當信號序列可為例如源自絲狀真菌澱粉葡糖苷酶（AG）基因（例如黑曲霉之 *glaA* 基因）之信號序列。可使用澱粉葡糖苷酶（亦稱為（葡糖）澱粉酶）啓動子本身之組合，以及與其它啓動子之組合。本發明中亦可使用混合的信

號序列。

適當的異生性的分泌前導序列係源自真菌的澱粉葡萄糖苷酶（AG）基因（*glaA-18* 以及 24 個胺基酸之版本，例如源自曲霉屬）、 α -因子基因（酵母菌例如酵母菌以及克魯維酵母）或 α -澱粉酶基因（芽胞桿菌屬）。

該載體可轉形或轉染入說明如上之適當的宿主以表現本發明多肽或產生維生素 B₁₂。該方法可包含在表現編碼序列載體之編碼多肽的條件下培養轉形入上述表現載體之宿主細胞。

如此本發明進一步的特色是提供轉形的或轉染包含本發明之多核苷酸或載體的宿主細胞。較佳之多核苷酸內含複製多核苷酸以及表現多肽之載體。可選擇與該載體能相容共存之細胞，例如原核的（例如細菌的）、真菌的、酵母菌或植物細胞。

本發明包含使用編碼多肽之 DNA 序列進行重組表現以產生本發明多肽之方法。爲了達成此目的，本發明 DNA 序列進行基因擴增及／或交換表現訊息（例如啓動子、分泌信號序列）以在適當的同源或異性的宿主細胞中經濟的產生多肽。同源的宿主細胞之定義是相同種之宿主細胞或 DNA 序列源自相同種之變異體。

適當的宿主細胞爲原核的微生物例如：細菌，或真核的生物體，例如：真菌例如酵母菌或絲狀真菌，或植物細胞。一般而言，酵母菌細胞比真菌細胞好，因爲彼易於操作。然而，一些蛋白質不是在酵母菌中分泌太差，不然就

是加工不適當（例如在酵母菌中過糖基化）。在此類實例中可選擇真菌的或細菌的宿主生物體。爲了產生維生素 B₁₂，較佳的是原核或細菌的宿主。

宿主細胞可過度表現多肽，以及過度表現多肽是熟知的技藝³。宿主可具有兩個或多個編碼多核苷酸複本（據此載體可具有兩個或多個複本）。

來自桿菌屬之細菌爲適當的異生性宿主，因爲其可分泌蛋白質至培養基。其它適當的細菌宿主是來自鏈黴菌以及假單胞菌屬。然而，較佳之宿主是來自得到本發明多核苷酸之費氏丙酸桿菌的相同目（例如放射菌目（*Actinomycetales*））或科（丙酸桿菌科（*Propionibacteriaceae*））之細菌。

表現編碼本發明多肽 DNA 序列之較佳的酵母菌宿主細胞爲酵母菌（*Saccharomyces*）、克魯維酵母（*Kluyveromyces*）、漢遜酵母（*Hansenula*）、畢赤酵母（*Pichia*）、著草酵母（*Yarrowia*）、以及裂殖酵母（*Schizosaccharomyces*）。更佳之酵母菌宿主細胞，係選自：釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、乳酸克魯維酵母（*Kluyveromyces lactis*）（亦爲習知的克魯維酵母乳酸亞種（*Kluyveromyces marxianus var. lactis*））、多形漢遜酵母（*Hansenula polymorpha*）、巴斯德畢赤酵母（*Pichia pastoris*）、解脂著草酵母菌（*Yarrowia lipolytica*）、及粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）。

然而最佳地是（例如絲狀的）真菌宿主細胞。較佳的

絲狀真菌宿主細胞係選自：曲霉屬 (*Aspergillus*)、木霉屬 (*Trichoderma*)、鐮孢屬 (*Fusarium*)、雙側孢黴屬 (*Disporotrichum*)、青霉屬 (*Penicillium*)、頂孢菌屬 (*Acremonium*)、脈孢菌屬 (*Neurospora*)、嗜熱子囊菌屬 (*Thermoascus*)、毀絲霉屬 (*Myceliophthora*)、孢子絲菌屬 (*Sporotrichum*)、梭孢殼屬 (*Thielavia*)、及塔拉霉屬 (*Talaromyces*)。更佳之絲狀真菌宿主細胞是稻米麴黴 (*Aspergillus ozyae*)、大豆麴黴 (*Aspergillus sojae*)、構巢曲霉、或黑曲霉群。²³ 此類菌種包含 (但非限於)：黑曲霉、泡盛曲霉、塔賓曲霉 (*Aspergillus tubingensis*)、棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)、麴黴屬 (*Aspergillus foetidus*)、構巢曲霉、日本麴菌 (*Aspergillus japonicus*)、米麴黴以及無花果曲霉 (*Aspergillus ficuum*)，以及進一步的其係包含：裡氏木黴、禾穀鐮刀菌 (*Fusarium graminearum*)、產黃青黴 (*Penicillium chrysogenum*)、阿拉巴馬枝頂孢菌 (*Acremonium alabamense*)、粗糙脈孢菌 (*Neurospora crassa*)、嗜熱毀絲霉 (*Myceliophthora thermophilum*)、嗜纖維孢子絲菌 (*Sporotrichum cellulophilum*)、兩形孢雙側孢黴 (*Disporotrichum dimorphosporum*) 以及陸生梭孢殼 (*Thielavia terrestris*)。

本發明範圍內表現宿主的實施例是：真菌，例如麴黴^{31, 32} 及木霉屬；細菌，例如桿菌^{33, 34} 例如枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽胞桿菌 (*Bacillus*

licheniformis) 、 解 澱 粉 芽 孢 桿 菌 (Bacillus amyloliquefaciens) 、 假 單 胞 菌 ； 以 及 酵 母 菌 例 如 克 魯 維 酵 母 ³⁵ ， 例 如 ； 乳 酸 克 魯 維 酵 母 ³⁶ 以 及 酵 母 菌 ， 例 如 釀 酒 酵 母 。

培 養 宿 主 細 胞 以 及 重 組 產 生 ； [cobA 或 cbiA]

本 發 明 亦 包 括 經 修 正 以 表 現 本 發 明 多 勝 肽 之 細 胞 。 較 佳 者 宿 主 將 具 有 至 少 二 套 、 或 多 套 的 多 核 苷 酸 。 該 細 胞 包 含 短 暫 的 、 或 較 佳 者 穩 定 的 高 等 真 核 細 胞 株 ， 例 如 哺 乳 動 物 的 細 胞 或 昆 蟲 細 胞 、 較 低 等 的 真 核 細 胞 ， 例 如 酵 母 菌 及 (例 如 絲 狀 的) 真 菌 細 胞 或 原 核 細 胞 例 如 細 菌 的 細 胞 (例 如 放 射 菌 目) 。

本 發 明 蛋 白 質 亦 可 能 在 細 胞 株 或 膜 ， 例 如 桿 狀 病 毒 的 表 現 系 統 中 進 行 短 暫 的 表 現 。

依 據 本 發 明 ， 可 在 習 見 的 營 養 性 發 酵 培 養 基 中 培 養 帶 有 轉 形 的 一 個 或 多 個 多 核 苷 酸 之 本 發 明 微 生 物 的 表 現 宿 主 以 產 生 本 發 明 多 肽 。

依 據 本 發 明 之 重 組 宿 主 細 胞 可 用 技 藝 上 已 知 的 方 法 培 養 。 在 各 啓 動 子 組 合 以 及 宿 主 細 胞 中 ， 培 養 條 件 為 有 助 於 表 現 編 碼 多 肽 之 DNA 序 列 及 / 或 產 生 維 生 素 B₁₂ 之 條 件 。 達 成 所 要 求 的 細 胞 密 度 或 滴 度 之 後 ， 可 停 止 培 養 並 用 習 知 的 方 法 回 收 多 肽 或 維 生 素 。

發 酵 培 養 基 可 包 含 碳 源 (例 如 ； 葡 萄 糖 、 麥 芽 糖 、 糖 蜜 、 纖 維 素 、 β - 葡 聚 糖 等) 以 及 (無 機) 源 (例 如 ； 硫

酸銨、硝酸銨、氯化銨等)及/或(有機的)氮來(例如：酵母菌抽出物、麥芽抽出物、蛋白胨等)。可含有無機的營養來源(例如：磷酸鹽、鎂、鉀、鋅、鐵、等)及/或誘導物(例如：纖維素、 β -葡聚糖、麥芽糖或麥芽糖糊精)。

適當培養基的選擇可基於表現宿主及/或基於表現建築體的調控需求。該培養液為熟悉此技藝的專業人士習知的培養液。培養基可視需要含有附加的成份使轉形的表現宿主比其它可能地污染微生物更具生長優勢。

發酵可進行 0.5 - 30 天。發酵可為批次、連續或分批進料，適當地溫度介於 0 至 45°C 之間，酸鹼度介於例如 2 至 10 之間。較佳的發酵溫度介於 20 至 37°C 之間及/或酸鹼度介於 3 至 9 之間。適當的條件的選擇通常是基於選擇之表現宿主以及表現的蛋白質。

發酵之後，如果必要的話可使用離心或過濾自發酵培養液中移除細胞。發酵停止之後或去除細胞之後，然後可回收本發明之多肽，視需要用習見的方法純化及分離。

D. 使用生物合成途徑之多肽以及產生維生素 B₁₂ (反應/酵素)

A 醯胺化作用 ((醯胺) 合成酶)

本發明額外的特色係關於醯胺化方法，或製備胺，該方法包含接觸反應受質與本發明多肽。因此該方法包括醯胺化受質。較佳之多肽為合成酶，例如醯胺合成酶。

彼可為具有序列識別號 2 之序列，或其變異體或片段（定義如上），例如在第一個特色中之多肽。此外，多肽可為分歧桿菌科細菌（例如丙酸桿菌屬，尤其是費氏丙酸桿菌）之合成酶。

該方法可在麩胺醯胺存在下進行。反應中麩胺醯胺可轉換成麩胺酸鹽。多肽能將羥基轉換成胺，或將羧基（ COOH ）轉換成羧醯胺基團（ CONH_2 ）。因此該方法之產物為一級胺。

可重覆該方法，由於多肽可醯胺化反應受質兩次，換言之可在受質上產生二個（較佳者一級）胺基取代基。因此該方法可將第一個羧基轉換成羧醯胺基。可重覆該方法，並將第二個羧基轉換成羧醯胺基。此方法中可醯胺化兩次，例如產生二個分開的（例如一級）胺。第二個醯胺化作用較佳者是發生在受質上的不同取代基（例如羧基）。

較佳者，反應受質是鈷啉胺酸或鈷啉胺酸 c-醯胺及／或產物是鈷啉胺酸 c-醯胺或鈷啉胺酸 - a，c-二醯胺。此反應中麩胺酸可轉換成麩胺酸鹽。麩胺醯胺之添加或存在量大約為鈷啉胺酸之兩倍（換言之，麩胺醯胺之莫耳濃度約為鈷啉胺酸莫耳濃度之兩倍）。因為鈷啉胺酸先醯胺化成鈷啉胺酸 c-醯胺，其可作為中間物，然後在第二醯胺化反應中鈷啉胺酸 c-醯胺可醯胺化以生成鈷啉胺酸 a，c-二醯胺。

因此，此方法中較佳之多肽是鈷啉胺酸 a，c-二醯

胺合成酶（例如 *cobA* 或 *cbiA*）。該多肽可帶有 EC 6.3.1. - 之活性。

BI（磷基）轉移酶（磷酸化）：[*cob U*]

本發明亦關於磷酸化，或製備內含磷酸鹽化合物之方法，該方法包含接觸反應受與本發明多肽。較佳之多肽者包含序列識別號第 4 號之多肽或其變異體或片段（定義如上）。此外，多肽可為分歧桿菌科細菌（例如丙酸桿菌屬，尤其是費氏丙酸桿菌）之磷酸轉移酶。如此該方法包含磷醯化（或加上一個磷酸鹽基團）至受質。

該方法可在核苷醯基（例如三）磷酸鹽，例如 ATP 存在下進行。反應受質可包含核苷酸，例如包括腺嘌呤核苷。

較佳之方法包含轉移（從一個化合物轉移至另一個化合物，例如轉移至受質）磷酸鹽部分，例如磷酸化羥基（OH）以形成磷酸鹽基（ $-PO^{-4}$ ）。如此多肽可為磷酸轉移酶以醇基（例如羥基）作為受體。

較佳之反應受是腺苷基鈷啉醇醯胺（式 II）及／或產物是腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽（式 IIA）。該方法可額外地包含將核苷酸三磷酸鹽轉化成核苷酸二磷酸鹽（例如，將 ATP 轉化成 ADP）。因此該多肽可為鈷啉醇醯胺磷激酶（例如 *cobU*）。較佳者具有 EC 2.7.1. - 活性。

B2（核苷醯基）轉移酶（核苷醯化作用）

本發明之此特色亦關於核苷醯化，或製備內含核苷醯基化合物之方法，該方法包含接觸反應受與核苷酸轉移酶多肽。此多肽與描述於以上 B1 者相同。因為（第二）酵素（稱為 B）具有雙重功能，故為雙功能酵素。

如此酵素 B 可作為普通的轉移酶，轉移磷酸鹽基團與核苷醯基。因此可作為磷酸轉移酶（B1）以及作為核苷醯基轉移酶（B2）。

第二種功能（稱為 B2）係關於內含核苷醯基之轉移酶的酵素活性。

因此，較佳之方法包含核苷醯基化受質，例如胍基化（受質）。較佳之反應受質包含至少一個磷酸鹽基團。適當的多肽能核苷醯基化磷酸鹽基團。

該方法可在核苷基（例如三磷酸鹽，例如 GTP）存在下發生。如此在該方法中，多肽較佳者係催化磷酸鹽基團之胍基化。

較佳之反應受是腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽（式 IIA）及／或產物是腺苷基 - GDP - 鈷啉醇醯胺（式 IIB）。如此該酵素可催化反應受質例如腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽形成內含核苷醯基之化合物，例如腺苷基 GDP - 鈷啉醇醯胺。如此多肽可為（核苷醯基）轉移酶，或具有 EC 2.7.7. - 之活性。多肽其它較佳的特色描述於以前磷酸轉移酶活性（B1）的部分。

C 芳基化（芳基轉移酶）或核氮唑（ribazole）加成：

[cobS]

本發明方法包含芳基化，或製備內含芳基化合物之方法，該方法包含接觸反應受質與本發明多肽，較佳者（例如芳基）轉移酶。較佳之多肽者包含序列識別號第 6 號之多肽或其變異體或片段（定義如上）。此外，多肽可為分歧桿菌科細菌（例如丙酸桿菌屬，尤其是費氏丙酸桿菌）之芳基轉移酶。如此該方法包含芳基化受質。

芳基部分（例如核氮唑（ribazole），可在反應時轉移）包含芳香族胺基酸環系統。芳基部分可包含一或二個芳香族胺基酸環。環系統可經一至四個 C₁₋₈ 烷基取代。芳基部分可包含無、一或二個雜原子，例如一或二個氮原子。較佳之芳基部分包含苯并咪唑環。因此該方法包含製備內含（例如二甲基）苯并咪唑（DMB）之化合物。

芳基團可鍵結至或相聯至（中心）金屬，例如鈷原子。此外，芳基團可鍵結至碳原子，例如核糖基團之碳原子。較佳之芳基部分係鍵結至鈷原子及核糖基團（在反應之產物中稱為產生之內含苯并咪唑的化合物）。

該方法可在核氮唑（ribazole），例如 α -核氮唑（ribazole）之存在下發生。其存在量大約與受質等莫耳濃度。反應可包含 α -核氮唑（ribazole）加成（至受質）。

較佳之反應受質是腺苷基 - GDP - 鈷胺醯胺。反應之產物（內含芳基之化合物），較佳者是腺苷基 - 5,6 - 二甲基 苯并咪唑基鈷胺醯胺（式 IIC）。進行反應時，核

氮唑 (ribazole) 可被轉換成 GMP。

本方法中較佳之多肽是甾鈷胺素 (5'-磷酸鹽) 合成酶 (例如 cob)。多肽可帶有 EC 2-7.8-.-.- 之活性。

D 腺苷基化 (腺苷基轉移酶)

本發明方法包含腺苷基化，或製備內含腺嘌呤核苷化合物之方法，該方法包含接觸反應受質與本發明多肽，較佳者是轉移酶，例如腺苷基轉移酶。較佳之多肽者包含序列識別號第 7 號之多肽或其變異體或片段 (定義如上)。此外，多肽可為分歧桿菌 (Mycobacteriaceae) 科細菌 (例如丙酸桿菌屬，尤其是費氏丙酸桿菌) 之轉移酶。如此該方法包含腺苷基化受質。

因此該方法包含轉移腺嘌呤核苷 (較佳者) 至受質。較佳者腺嘌呤核苷可結合至金屬原子，例如過渡金屬 (例如第一系)，例如鈷。

反應受質 (及 / 或產物) 可為醯胺，例如二醯胺。較佳之反應受質是鈷啉胺酸 a, c 二醯胺及 / 或產物是腺苷鈷啉胺酸 a, c 二醯胺。

該方法可在核苷基 (例如三磷酸鹽，例如 ATP) 存在下發生。亦可在腺嘌呤核苷存在下發生。較佳者，腺嘌呤核苷以及核苷基磷酸鹽之量大約與受質等莫耳濃度。核苷基三磷酸鹽可轉換成核苷基二磷酸鹽。

較佳者本方法中之多肽是腺苷基轉移酶。彼帶有 EC 2.5.1.7 之活性。較佳之多肽是能轉移甲基之外的烷基

或芳基之轉移酶。如此可排除甲基化，或導致甲基化作用之胜肽。

受質（或催化反應產物）：維生素 B₁₂ 中間物及／或前驅物

較佳之反應受質及／或產物包含咕啉核心或環系統。較佳者，彼包含多至四個環（可為相同或不同）之芳基環系統。然而較佳者是具有四個相同的環。各環可含有一或二個雜原子，例如一個氮原子。環可為五員環。如此較佳的環是吡咯，以及較佳之該環系統包含四吡咯系統。較佳者是二個吡咯環相互相聯，以及另外二個吡咯環經橋（例如甲烯單位）相聯。

環系統可包含金屬原子，例如位於其核心。此金屬可為過渡金屬，例如第一系（基團 VIII）。彼可屬於第四週期。較佳之金屬是鈷，以及彼可為單一中心的鈷原子。環系統可附著至醯胺、磷酸鹽、胍基或腺苷基部分或基團。除了金屬原子以及環系統以外，可有第五、以及可視需要甚至是第六個取代基，例如結合至金屬。各取代基可位於環平面以上及／或低於環平面，二者均可採用。適當的（以及當為維生素 B₁₂）時，此類取代基之可包含核苷基團，例如二氧基核苷基，較佳者為 5'-二氧基腺嘌呤核苷。另一取代基可為定義如以上 C 節芳基化中之芳基部分。因此較佳之取代基可包含二甲氧基苯并咪唑。在本發明中使用之受質，可存在一或二個取代基，以使鈷原子可帶有第五以及第六個取代基，5'-二氧基腺嘌呤核苷以及二甲

氧基苯并咪唑基團。只要不是受質，相同較佳的特色亦適用於反應之產物。

以下列出維生素 B₁₂ 生物合成途徑酵素所扮演的角色之後的五個催化反應或生物合成步驟之受質及產物。

A(cobA)

B(cobU)

C(cobS)

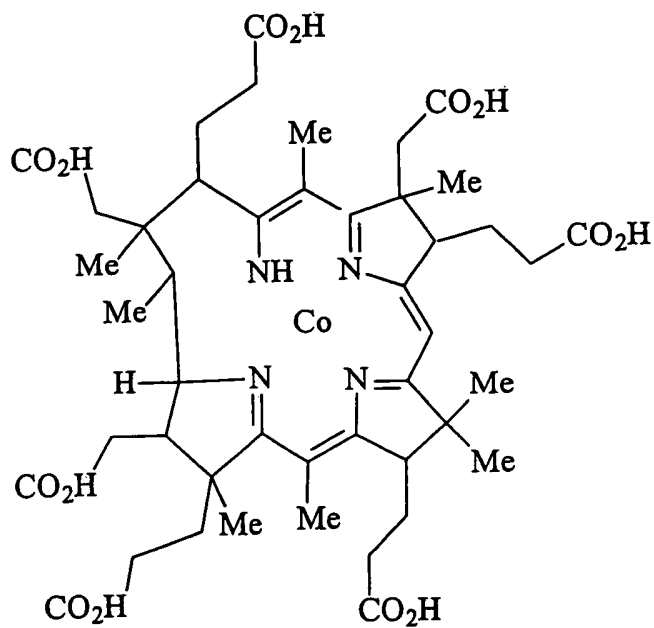
Uro III → → → → 鈷啉醇醯胺 → 鈷啉醇醯胺-P → 維生素 B₁₂

酵素公式	俗名	反應 / 生物合成的步驟:
I	鈷啉胺酸	
	↓	A 醯胺合成酶
IA	鈷啉胺酸 c-醯胺	
	↓	A 醯胺合成酶
IB	鈷啉胺酸 a,c-二醯胺	
	↓	D (腺苷基)轉移酶
IC	腺苷基鈷啉胺酸 a,c-二醯胺	
II	腺苷基鈷啉醇醯胺	
	↓	B1 (磷基)轉移酶
(cobU)IIA	腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽	
	↓	B2 (核苷醯基)轉移酶
(cobU)IIB	腺苷基-GDP 鈷胺醯胺	
	↓	C (苯并咪唑基)
轉移酶	腺苷基-5,6-二甲基苯并咪唑基	
(cobS)IIC	鈷胺醯胺(維生素 B ₁₂)	

較佳的中間物或前驅物包含鈷啉醇醯胺、鈷啉醇醯胺-P (磷酸鹽) 或式 1A、1B、II、IIA、IIB 或 IIC 之化合物。

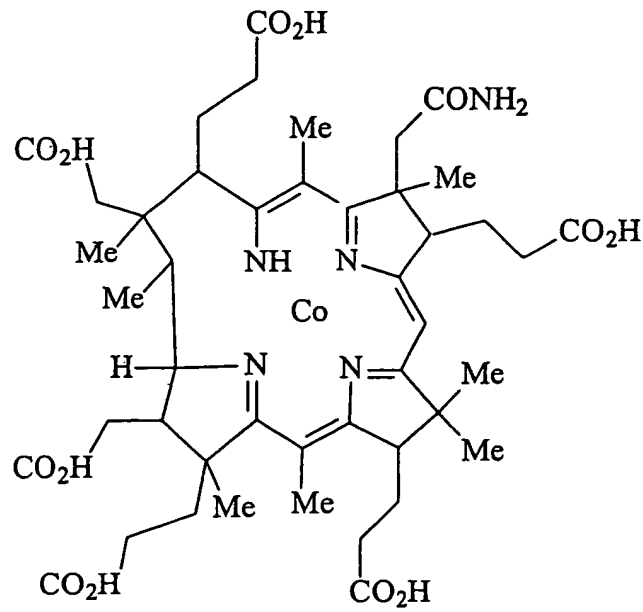
因此本發明之方法可包含一個或多個以下之步驟 (使用化學式說明)，其為：

式I



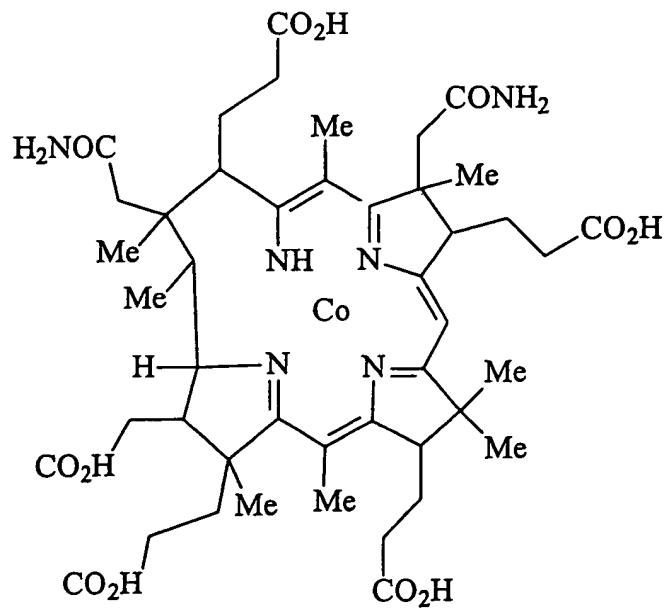
↓ (醯胺)合成酶(A)
(序列識別號 2,或其變異體)

式IA



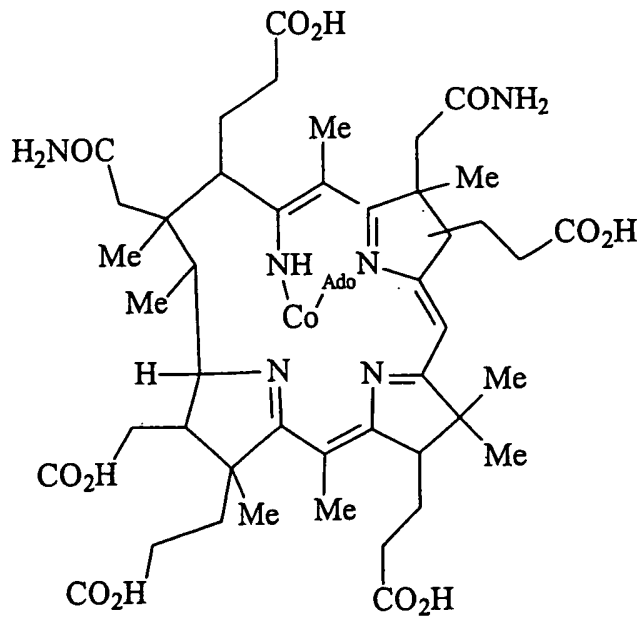
↓ (醯胺)合成酶(A)
(序列識別號2,或其變異體)

式IB

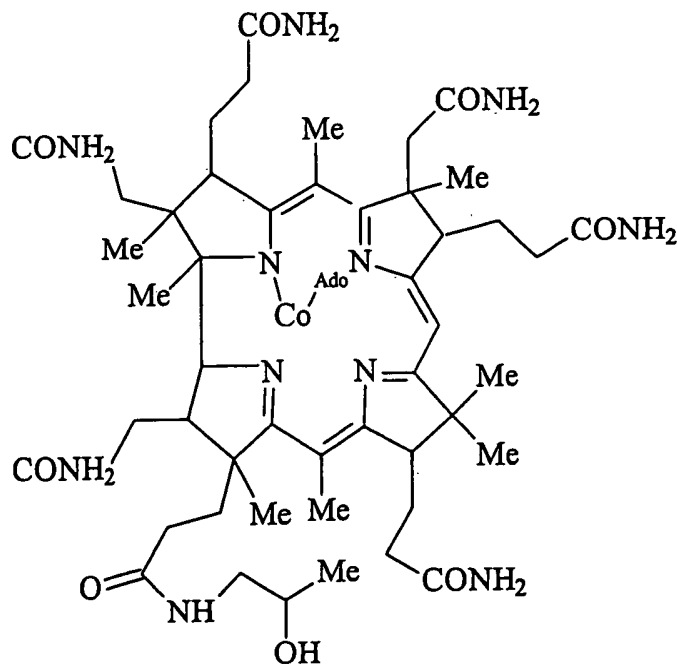


↓ 腺苷基轉移酶(D)
(序列識別號8,變異體)

式IC

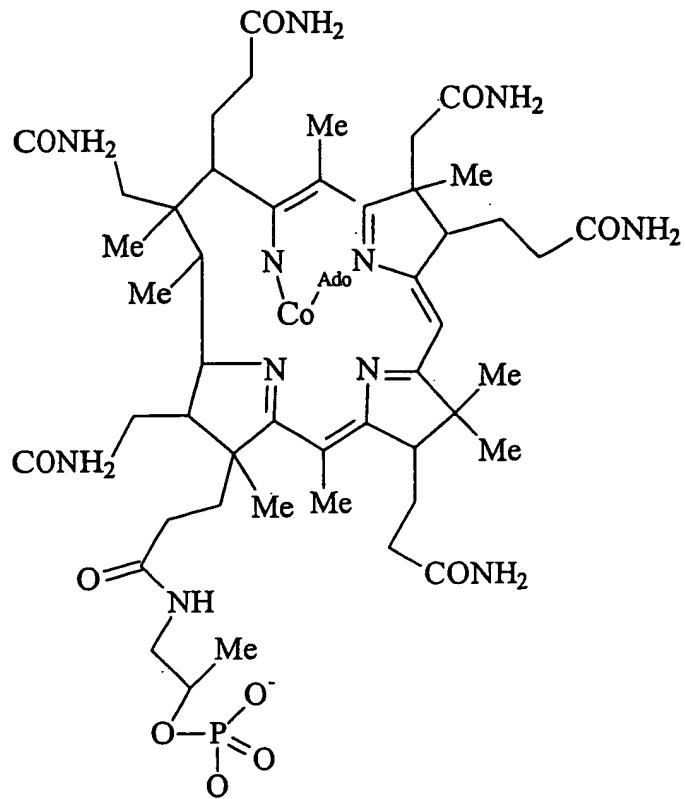


式II



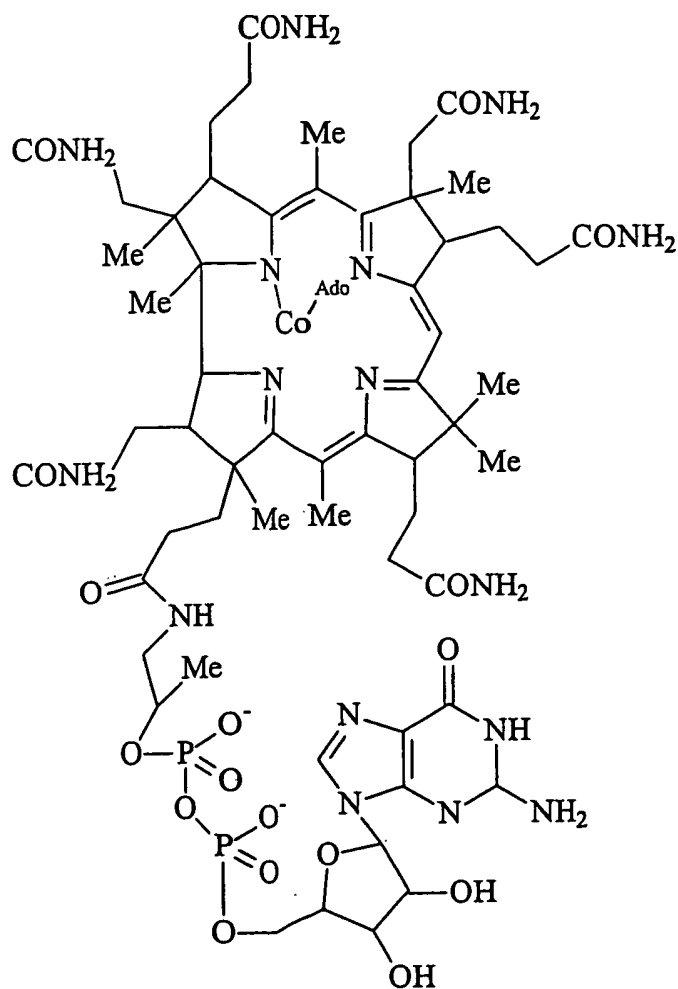
↓(磷基)轉移酶(B1)
(序列識別號4,或其變異體)

式IIA

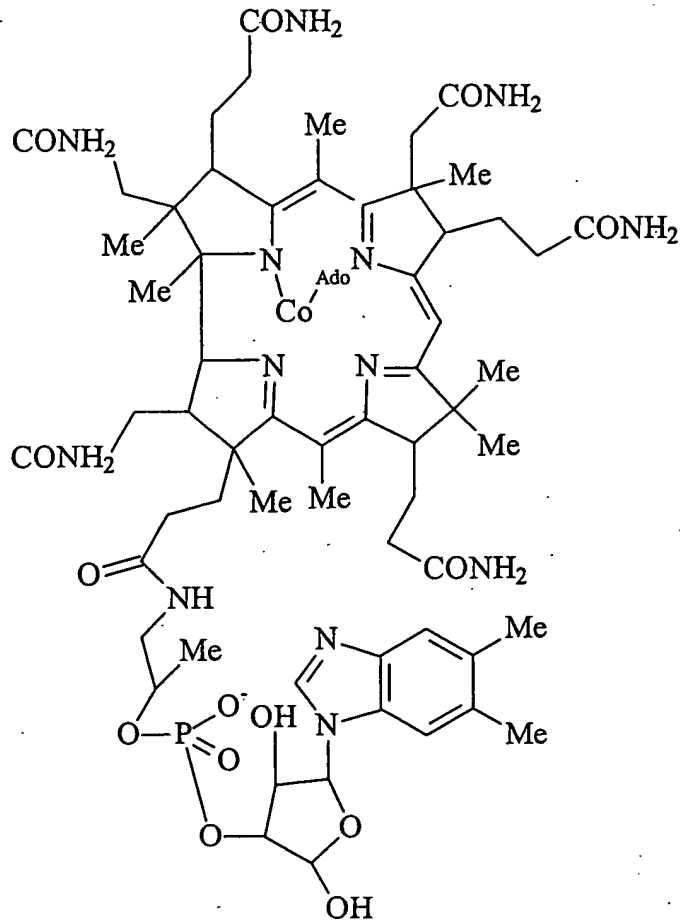


↓ (核苷鹽基)轉移酶((B2)
(序列識別號 4,或其變異體)

式II B



↓ (苯并咪唑基)轉移酶(C)
(序列識別號6,或其變異體)

式IIC(包括維生素B₁₂)

E. 工業上製備維生素 B₁₂

如上述之說明，本發明多胜肽可用來進行製備維生素 B₁₂ 路徑的一個或多個生物合成步驟。多肽可接觸適當的反應受質並發生反應。當多肽位於（例如宿主）細胞之外亦可發生該反應，換言之將多肽與受質例如在體外混合。然而，使用包含一個或多個本發明多胜肽之本發明宿主細胞將更有效，以進行一個或多個維生素 B₁₂ 生物合成途徑中所要求的步驟，或較佳者使用宿主細胞產生維生素 B₁₂（或中間性質或其前驅物）。

因此本發明亦關於製備維生素 B₁₂（或其前驅物）之

方法，該方法包含在允許細胞生物合成（因此製造）維生素 B₁₂（或前驅物）之條件下培養一種或多種本發明宿主細胞。

該方法可使用發酵槽。發酵槽可裝有攪拌裝置，例如攪拌器。發酵槽容器亦可裝有通氣裝置，例如造成內含氧之空氣與發酵槽內之液體接觸的裝置。液體通常是液體培養基，內含細胞的懸浮溶液。然後可發生發酵。發酵槽之最小體積為 10、50、100 或 1,000 公升。

在發酵開始之前、發酵開始時、或連續發酵地期間，細胞可提供的一種或多種碳及／或氮源。

發酵後，停止供應碳或氮源，或用盡一種或多種此類來源。各碳及／或氮源可為複雜的來源或有機的或無機化合物。

然後可自發酵槽移除細胞。在移除細胞之前或之後，可自細胞移除水（或水溶液）。然後可將細胞加熱或滅菌以殺死細胞。

從微生物的細胞萃取或分離維生素 B₁₂ 是熟知的方法⁴⁵。例如（為了能夠取得維生素 B₁₂），較佳者是打破（或至少局部地打開）製作維生素的宿主細胞，而使細胞內至少部份之可溶解的內含物（包含維生素 B₁₂）釋出至液體，例如細胞內含之液體。然後從液體（包含維生素 B₁₂）中可分開打開的或破的細胞，或產生的細胞碎片。如此處理的微生物細胞（其中內含維生素 B₁₂）可導致細胞膜之破壞。打開細胞適當的處理包含熱處理，例如巴斯

德式處理、高壓滅菌器加熱、溶菌酵素（例如溶菌酶）處理、及／或機械性的破壞細胞（研磨，或使用剪力）、或化學藥品處理（以導致細胞溶解，例如使用兩性介面活性劑或有機溶劑）。

溶解或其它膜破壞方法可產生溶解液，然後可分離成固態及液相。然後可分離（從內含維生素 B₁₂ 之液體）溶解液中包含之固相細胞碎片。有許多適當的固體－液體分離技藝，包括離心及／或過濾。然而較佳者之固態液體分離是使用超濾法進行。

較佳者，將打開／打破微生物的細胞清洗，以及然後在液體（內含維生素 B₁₂）中合併或添加入洗滌劑，分離細胞碎片。適當地清洗包含以去離子水進行之透析過濾。然後可將內含（維生素 B₁₂）之透析過濾物與（內含維生素 B₁₂）之液相合併。

然後可將內含維生素 B₁₂ 之液體乾燥，例如噴霧乾燥、流體－床乾燥、冷凍乾燥或真空乾燥。

較佳者，在打開（溶解）產生維生素 B₁₂ 之細胞前先清洗，因為去除培養基成份可增加乾燥物質中之維生素 B₁₂ 濃度。此可使用透析過濾進行，較佳者使用去離子水。

較佳的特色以及本發明特色之一是採用在細節上已作必要的修正的另一特色。

【實施方式】

本發明將用下列實施例加以描述，其僅預期用以說明而非限制。

實施例 1

丙酸菌載體

使用具有相同 2 個質體之質體圖譜的二種品系（費氏丙酸桿菌 LMG16545 以及費氏丙酸桿菌 LMG16546）。一個質體較大以及另一個較小，屬於高豐度的質體大小約 3.6 仟鹼基。選擇此類來自 LMG16545 以及 LMG16546 之 3.6 仟鹼基之質體作為進一步的使用的載體。此類載體之質體已描述於²⁹。丙酸桿菌表現系統是已知的技藝³⁰。

構築大腸桿菌／丙酸桿菌穿梭載體

將來自紅色糖多孢菌（*Saccharopolyspora erythraea*）NRRL2338 紅黴素生物合成群以及內含紅黴素抗性授與基因^{37, 37,38}之 1.7 仟鹼基 Acc651 片段插入的 Acc651 線性化之 pBR322AI²⁹。然後將此新建築體（名稱為 pBRES）用 RcoRV 線性化以及連結至用 BsaBI 水解之 p545DNA。發現具有正確的雙向插入體之載體的大腸桿菌轉形株。產生的質體載體稱為 pBRESP36B 1 以及 pBRESP36B2（參閱圖 2a 以及 2b²⁹）。

亦得到以 p545DNA 在假定的複製區域以外其它限制位點線性化之質體載體構築體，稱為 AIwNI。此建築中 pBRES 載體必須提供適當的選殖位點。設計接合器並將寡

體徐冷創造出分別具有 Acc651 及 Bgf 黏性端地雙股 DNA 片段，其內更含有一個 Sfi1 限制位，其可提供與 AlwNI 水解 p545 質體相容的端點。將接合器選殖入 pBRES 的 BgIII 以及鄰近的 Acc65I 位點之間。如此得到 pBRES - Sfi 載體，接著用 Sfi1 水解以及連結至 AlwNI 水解的 p545。轉形大腸桿菌，以限制酶分析証實正確的轉形株。得到的載體稱為 pBRESP36A²⁹。

用大腸桿菌／丙酸桿菌穿梭載體轉形丙酸桿菌

描述以 pBRESP36B 1 轉形費氏丙酸桿菌菌株 ATCC6207。

將細菌的細胞培養於 SLB（乳酸鈉液體培養基³⁹，30℃下）至靜止生長相，以及接著用 1：50 新鮮的 SLB 稀釋。30℃下培育約 20 小時之後，收穫細胞（目前在指數生長相）以及用冷卻的 0.5 莫耳濃度蔗糖廣泛地清洗。接著細胞用電穿孔緩衝液（0.5 莫耳濃度蔗糖，以 1 毫莫耳濃度乙酸鉀緩衝，酸鹼度 5.5）清洗一次，最後再懸浮於電穿孔緩衝液，約 1／100 原本的培養體積。在全部過程中將細胞保持於冰浴內。

進行電穿孔法（儀器來自 BIORAD）時，將 80 - 100 微升之細胞與 ±1 微克之 DNA（或較小量）懸浮於冷卻的 1 或 2 厘米電穿孔透明小容器，以及運送一個電脈衝。最佳的脈衝條件為 25kV／公分，電組為 200Ω，電容為 25μF。然而，較低以及較高的電壓（亦為 100Ω）亦可產

生轉形株。

脈衝之後，在懸浮液中添加入 900 微升內含 0.5 莫耳濃度蔗糖之冷卻的 SLB，並在 30°C 下培養 2.5 至 3 小時，接著塗片至內含 0.5 莫耳濃度蔗糖及 10 微克／毫升紅黴素之 SLB／瓊脂平皿。30°C、缺氧情況之下培養 5 至 7 天之後，偵測轉形株。

自大腸桿菌 DH5a (Promega) 分離之 DNA，轉形效率為 20 - 30 轉形株／微克 DNA。自大腸桿菌 JM110 (dam^- , dcm^- 品系) 分離之 DNA，轉形效率為 10 - 100 倍的高效率。大腸桿菌轉形是依據 BIORAD 之說明。

轉形株內含的真實載體，與轉形 ATCC6207 之原本的質體 DNA 無法區別。其可以小量分離步驟分離的質體 DNA 經限制酶分析分離自轉形株質體 DNA 加以証實。

載體僅為自主複製質體。用分離的總 DNA 進行南方墨點雜交⁴⁰ 顯示染色體 DNA 不會與載體 DNA 探針雜交，顯示沒有發生染色體嵌入質體 DNA 的現象。

載體 pBRESP36B2 以及 pBRESP36A 之轉形亦得到成功，顯示載體的官能性與 p545 之方向或選殖位點無關。在此案例中亦証實載體之確實性。

此外，用分離自丙酸桿菌轉形株之 DNA 轉形費氏丙酸桿菌菌株 ATCC6207，其結果比用分離自大腸桿菌 DH5a 之 DNA 在轉形效率上高出 $10^5 - 10^6$ 倍。

轉形另一費氏丙酸桿菌菌株 LMG 16545 (得到 p545 質體之相同菌株)，其轉形效率與 ATCC 品系相當。

使用各序列識別號 1、3、5 以及 7 操作地聯結至適當的轉錄以及轉譯作用起始訊息之穿梭載體進行重覆轉形。

實施例 2

構築內含醃胺合成酶 (A) 基因之質體載體

以下將描述建築以及應用質體載體以增加費氏丙酸桿菌菌株 ATCC6207 合成維生素 B₁₂ (鈷胺素) 之水準

使用費氏丙酸桿菌之 16S rRNA 啓動子構築過度表達基因之質體。測驗帶有啓動子片段之策略之一是使用啓動子探測載體。以編碼不存在於野生型品系之容易偵測的酵素活性之報導基因監測啓動子的活性。以來自 pACYC 184^{11,42} 之 cat (氯黴素乙醃基轉移酶) 基因構築啓動子探測載體。爲了分析 16S rRNA 啓動子活性，該啓動子係置於 cat 基因上游。

爲了構築啓動子 - 探測載體，將無啓動子之 cat 基因用 PCR 選殖入大腸桿菌 / 丙酸桿菌穿梭載體 pBRESP36B2²⁹，產生載體 pB2 / PoCAT。PCR 引子上游包括序列 5'-GGGATCCTCTAGAGCATGCAAGCTTCTCGAGAA TCGATAGATCTCTAAGG AAGCTAAAATG - 3'，其中最後三個核苷酸爲 cat 基因之起始密碼子。此源自合成的序列包括多選殖位點 (MCS)，其中內含限制位點 BamHI、XbaI、HindIII、SphI、XhoI、ClaI 以及 BglII。PCR 下游引子包括 BamHI 限制位點。PCR 放大之後將 cat 基因以 BamHI 片段選殖入載體之 BglIII 位點 (喪失 BamHI

以及 BglIII 位點) 。得到二種 *cat* 基因方向。使用 *cat* 基因方向與 β 內醯胺酶基因相同方向的 pBR322 片段作進一步的實驗。

基於費氏丙酸桿菌 ATCC6207 之 16S rRNA 序列 (基因資料庫寄存編號 X53217) 選擇適當的限制酶 (HindIII) 以及設計可經倒轉 PCR² 放大的包含啓動子之大約 3 仟鹼基區域的適當 PCR 引子。從 PCR 片段中分離出 6S rRNA 編碼序列上游的 0.6 仟鹼基 SphI-HindIII 片段。將此片段與相同酵素水解之 pB2/PoCAT 連結產生之質體稱爲 pB2/PrRNACAT。轉形大腸桿菌之後得到氯黴素抗性轉形株。轉形費氏丙酸菌菌株 ATCC 6207 之後，僅於內含紅黴素之平板得到菌落，而非從內含氯黴素之平板。然而，當劃線在內含氯黴素之平板上時，內含 pB2/PrRNACAT 之轉形株可生長而內含 " pB2/PoCAT 之 ATCC6207 細胞則不會生長，如此在費氏丙酸菌中顯示 16S rRNA 之官能性。

內含 16S rRNA 啓動子但缺少 *cat* 基因之表現載體其構築係聯接來自費氏丙酸桿菌內含 16S 核糖體 RNA 啓動子載體 pB2/PrRNACAT 之大約 700 bp 的 BamHI-BglIII 片段進入 pBRESP36B2 之獨一無二的 BglIII 位點。得到二種啓動子可能之方向的載體。當該核糖體的啓動子進行表現轉錄基因被不適當的終止時，若核糖體的啓動子走向此類複製基因，經由該讀取可阻塞丙酸桿菌複製子中二個複製基因之轉錄。因此可使用啓動子選殖成相反的方向的載

體 (pBRESP36B2pI6SH) 作進一步的實驗。啓動子下游獨一無二的 BglIII 位點可作為表現型基因庫之選殖。

實施例 3

從當的引子經 PCR 產生腺苷基轉移酶 (D, 序列識別號 7)。上游 PCR 引子包括內含 BglIII 限制位點的 5' 延伸端以及基因起始密碼子上游之核糖體結合部位。PCR 下游引子包括內含 BglIII 限制位點的 5' 延伸端。放大的片段用 BglIII 酶切消化之後, 將該片段連結入用 BglIII 水解以及去磷酸化去除 5' 磷酸鹽基團的載體 pBRESP36B2pI6SH。轉形大腸桿菌之後得到氨比西林抗性菌落。可觀察到相對於載體的雙方向選殖片段。然而, 僅以 16S rRNA 啓動子直接位於核糖體結合部位上游的建構體表現腺苷基轉移酶基因。

將後一建構體如前述之描述轉形入費氏丙酸桿菌 ATCC6207。轉形株中合成維生素 B₁₂ 之水準測定如下: 將冷凍培養丙酸桿菌轉形株, 與僅含 pBRESP36B2 載體質體之對照組菌株, 接種入內含 50 毫升 BHI (腦心輸液) 培養基 (Difco) 之 100 毫升燒瓶中, 並在 28°C、未搖動下反應 72 小時。將 4 毫升之前培養轉移至內含 200 毫升之生產培養基 (其組成爲 Difco 酵母萃取物 15 克/升、乳酸鈉 30 克/升、KH₂PO₄ 0.5 克/升、MnSO₄ 0.01 克/升、以及 CoCl₂ 0.005 克/升) 之 500 毫升搖動燒瓶以及在 28°C 下搖動 48 小時。

使用 HPLC⁴³ 測定維生素 B₁₂ 力價並顯示比對照組菌株有較高的維生素 B₁₂ 產生。

將該方法重覆用於其它三個下列之基因：

A：序列識別號 1，鈷啉胺酸 - a, c - 二醯胺合成酶；

B：序列識別號 3，鈷啉醇醯胺磷激酶基因；以及

C：序列識別號 5，氰鈷胺素（5' - 磷酸鹽）合成酶。

然後將四種基因（A、B、C、及 D）合併於一個操縱子之下進一步的增加維生素 B₁₂ 生產。

使用已知的技藝⁴⁴ 將產生的轉形細胞（費氏丙酸菌 ATCC 6207）培養於發酵槽。爲了殺死細胞，以及導致溶解，入將液體培養基在 65°C 下巴氏加熱三十分鐘。將然後液體培養基進行超濾法，以及得到內含維生素 B₁₂ 之粉紅色過濾物。加熱引起細胞的溶解，以及因此將細胞內維生素 B₁₂ 釋放至培養基。

實施例 4

構築丙酸桿菌之表現載體及其於表現本發明酵素以及在費氏丙酸菌中產生維生素 B₁₂ 上之用途

除了說明如上^{29,30} 的表現系統之外，技藝上已知二種其它表現系統（視需要可爲多套），可用以進行表現編碼本發明新穎酵素的基因。第一種是之 pRGO 1，其爲來自酸性丙酸菌之質體²⁷。用此可產生穿梭載體 pPK705。

使用該載體可成功地攜帶鈷啉胺酸 a, c-二醯胺合成酶 (A) 酵素，並進行轉形。費氏丙酸菌 *shermanii* 亞種。

其他適當的表現系統是習知的穿梭載體 pPK705²⁸，其能在大腸桿菌以及丙酸菌之間穿梭移動。如此可容許構築丙酸菌表現載體，並將酵素 B、鈷啉醇醯胺磷激酶併入費氏丙酸菌之謝氏亞種。使用本發明之鈷啉醇醯胺磷激酶基因（序列識別號 3）可達成此目的。

比較實施例 5

搖動燒瓶發酵內含空載體的丙酸桿菌。

用大腸桿菌 / 丙酸桿菌穿梭載體 pBRESP36B2p16SH 轉形費氏丙酸桿菌品系 ATCC6207 已描述於實施例 2。以前述內含紅黴素之瓊脂平皿選擇轉形株，以限制分析選擇內含真正質體的轉形株。

轉形株生長於棕色玻璃製之青黴素燒瓶，其中內含 50 毫升之厭氧 M1 培養液，其製備的方法如下。在缺氧情況下將 90 毫升之部份 B 加到 810 克之部份 A 以製備 900 克之 M1 培養液。添加入紅黴素，最終濃度為 10 毫克 / 公升。

810 克之部份 A 是由 52.2 克 MES、12.51 克 Difco 酵母萃取物及 0.68 克甲硫胺酸溶於水所組成。將酸鹼度用氫氧化銨調至 7 以及脫氣移除氧氣以及用氮沖洗。最後部份 A 以高壓滅菌器滅菌。

90 毫升之部份 B 由 1.5 毫升微量元素溶液、1.5 毫

升過濾滅菌的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 克 / 公斤) 、 0.9 毫升過濾滅菌的泛酸鈣 (20 克 / 公斤) 以及 86.1 毫升脫除氣體的無菌葡萄糖 (440 克 / 公斤) 組成。

1 公斤之微量元素溶液為 10 克檸檬酸、10 毫升 H_2SO_4 、1.2 克 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、300 克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、6 克 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、以及 2.4 克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶於水所組成。溶液經過濾器滅菌。

在缺氧情況下於 50 毫升 M1 培養基中接種入 5 毫升先前生長於厭氧、 30°C 、溫和的震盪 3 天至 OD_{630} 大約為 10 之預培養菌種 (選擇的 pBRESP36B2p16SH 轉形株)。

將此 50 毫升菌種在 30°C 、未搖動下培養 40 小時。在此時間點從培養菌種中取樣本並測定 OD_{630} (— OD — ana)。在厭氧下添加 NaOH (10%) 校正培養液之酸鹼度。須要之 NaOH (10%) 微升數之計算公式為： NaOH (10%) 微升數 = $(19.67 \times \text{OD} - \text{ana}) - 60$ 。下一步驟是在厭氧下加入 0.5 毫升 DBI (0.5 克 / 公斤)。加入後將菌種在 30°C 、200 rpm 震盪下再培養 24 小時。再一次測定 OD_{630} (— OD — 終點)。

收集 10 毫升培養樣品。離心收穫細胞以及用一倍體積無菌的去礦物水清洗沈澱物。將沈澱物儲存於 -20°C 。將沈澱物在內含緩衝劑之 2% KCN 中加熱至 80°C 解凍樣品以打開細胞以及穩定維生素 B12 以及前驅物。使用 HPLC 以適當的標準 (43) 測定維生素 B12 值效價與腺苷

基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽前驅物之含量。依據質譜分析法數據確立腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽前驅物之吸收峰的相同性。

將每毫升 pBRESP36B2p 16SH 轉形株菌種製作之維生素 B₁₂ 量除以 OD - 終點。pBRESP36B2p 16SH 轉形株得到之產率可作為內含其它質體之費氏丙酸桿菌轉形株（例如下—實施例）得到之產率的參考。經計算腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之產量（量每毫升菌種 / OD - 終點）亦有相似的比例。此類比例可作為含其它質體之費氏丙酸桿菌轉形株分別得到腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之比率的參考。

實施例 6

構築費氏丙酸桿菌 *cobA* / *cbiA* 基因之表現載體及彼在費氏丙酸桿菌中產生維生素 B₁₂ 以及其前驅物之用途

使用編碼費氏丙酸桿菌麩胺酸鹽 1 半醛胺基變位酶（*hemL*）⁴⁶（EMBL 寄存編號 D 12643）之基因。此基因之編碼區接著轉錄性 *hemL* 之終止子。將內含 *hemL* 基因編碼區以及 *hemL* 終止子之 DNA 片段依下列描述之步驟選殖入 pBRESP36B2p16SH。以 PCR 從費氏丙酸桿菌 ATCC6207 分離的染色體 DNA 中放大 DNA 片段是使用下列之引子：5'-CAgTAgATCTCgACAAggAggAACCCAtgAg-3'以及 5'-CgTAAgATCTCAgTTTCggACATggCAgTg-3'。此二引子均含有 BglIII 限制位點。將得到之 PCR 片段連

結入載體 pCR - Blunt II - TOPO (Invitrogen) 產生 pGBPHEL - 1。轉形大腸桿菌之後得到康黴素抗性菌落。如此得到之構築體以限制水解分析証實以及片段之 DNA 序列經由序列分析証實。

接著將 pGBPHEL - 1 用 BglIII 水解，分離內含 hemL 基因之片段並連結入先用 BglIII 水解以及去磷酸化的載體 pBRESP36B2p16SH。轉形大腸桿菌之後得到氨比西林 抗性菌落。用限制水解分析選擇以 16S 啓動子轉錄 hemL 基因的建構體。產生的建構體被稱爲 pGBPO1HEL - 1。

使用編碼費氏丙酸菌尿紫質原 III 甲基轉移酶之基因 (名稱爲 cobA, EMBL 寄存編號 U 13043)⁴⁷。爲了在丙酸菌過度表現 cobA 基因，將基因置於 pGBPO1HEL - 1 的 16S rRNA 啓動子之後以及 hemL 終止子之前，其步驟描述如下。以 PCR 從費氏丙酸桿菌 ATCC6207 分離的染色體 DNA 中放大內含內含 cobA 編碼區之 DNA 片段是使用下列之引子：5' - CACCACCAACATCgATgAggAAAC-3' 以及 5' - TCCAATTgggACTCAgTggTCgCTg - 3'。

第一引子含有 ClaI 以及第二引子含有 MfeI 限制位點。將得到的 PCR 片段連結入載體 pCR - Blunt II - TOPO (Invitrogen)。轉形大腸桿菌之後得到康黴素抗性菌落。經由序列分析証實選殖片段的 DNA 序列。產生的建構體稱爲 pGBPCOB - 1。

接著用 ClaI 以及 MfeI 水解 pG13Pcob - 1，分離內含 cobA 基因之片段 以及連結入分離自 pGBPO1 HEL - 1 以

相同酵素水解之大的載體片段。轉形大腸桿菌之後得到氨比西林抗性菌落。以限制分析証實分離自轉形株的質體 DNA，產生的建構體被稱為 pOBP02COB-1。

將 pGBP02COB-1 轉形入大腸桿菌 JM101 以及用限制水解分析証實分離自得到的轉形株的質體 DNA。然後將質體 DNA 如前述之描述轉形入費氏丙酸桿菌 ATCC6207。以前述之方法用內含紅黴素之瓊脂平皿選擇轉形株。以限制水解分析証實分離自費氏丙酸桿菌轉形株之質體 DNA。

於內含 M1 培養液之搖動燒瓶中發酵 pGBP02COB-1 轉形株，並用描述於前之實施例中的方法測定維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之含量。

以描述於前之實施例中的方法計算維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽 / 毫升培養菌種 OD-終點之產例。維生素 B₁₂ 之產率比以前實施例的 pBRESP36B2p16SH 轉形株低 6%。然而，腺苷基鈷啉醇醯胺之產率比以前實施例的 pBRESP36B2p16SH 轉形株高 227%，以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之產率比以前實施例的 pBRESP36B2p16SH 轉形株高 200%。如此鈷啉醇醯胺之產率比空的質體（比較實施例 5）增加 2 倍，鈷啉醇醯胺 P 之產率比空的質體（比較實施例 5）增加 3 倍。

實施例 7

構築編碼費氏丙酸菌蛋白質 B (cob U) 基因之表現載體以及彼在費氏丙酸桿菌中產生維生素 B₁₂ 以及其前驅物之用途

爲了在丙酸菌過度表現編碼酵素 B (序列識別號 3) 之基因，將基因置於 pGBPOIHEL-1 的 16S rRNA 啓動子之後以及 hemL 終止子之前，其步驟描述如下。以 PCR 從費氏丙酸桿菌 ATCC6207 分離的染色體 DNA 中放大內含內含 B 編碼區之 DNA 片段是使用下列之引子：5' - CTgATATCAATTggAggACATCAgATgACCCgCATCgTC - 3' 以及 5' - CTgAATTCggCCACgTCAgATCgCgTCC - 3'。

第一引子含有 EcoRV 以及 MfeI 限制位點以及第二引子含有 EcoRI 限制位點。將得到的 PCR 片段連結入載體 pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)。轉形大腸桿菌之後得到康黴素抗性菌落。經由序列分析証實選殖片段的 DNA 序列。產生的建構體稱爲 pGBPCOU-1。

接著將 pGBPCOU-1 用 EcoRV 以及 EcoRI 水解，以及分離內含基因編碼 B 片段並連結至分離自 pGBPO1HEL-1 先用 ClaI 水解，然後以克列諾酶鈍化，以及最後用 MfeI 水解之大的載體片段。轉形大腸桿菌之後得到氨比西林抗性菌落。以限制分析証實分離自轉形株的質體 DNA，產生的建構體被稱爲 pGBP02COU-1。

將 pGBP02COU-1 轉形入大腸桿菌 JM101 以及用限制水解分析証實分離自得到的轉形株的質體 DNA。然後將質體 DNA 如前述之描述轉形入費氏丙酸桿菌

ATCC6207。以前述之方法用內含紅黴素之瓊脂平皿選擇轉形株。以限制水解分析証實分離自費氏丙酸桿菌轉形株之質體 DNA。

於內含 M1 培養液之搖動燒瓶中發酵 pGBP02COU-1 轉形株，並用描述於前之方法測定維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之含量。

以描述於前之方法計算維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽 / 毫升培養菌種 OD - 終點之比例。腺苷基鈷啉醇醯胺之產率比 pBRESP36B2p16SH 轉形株低 96%，以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之產率比 pBRESP36B2p16SH 轉形株高 700%。如此如此中間物鈷啉醇醯胺 - P 之產率比空的質體增加 7 倍。

實施例 8

構築費氏丙酸桿菌編碼蛋白質 B 以及 C (cob U 以及 S) 基因之表現載體以及彼在費氏丙酸桿菌中產生維生素 B₁₂ 以及其前驅物之用途

爲了在丙酸菌過度表現編碼酵素 B (序列識別號 3) 以及 C (序列識別號 5) 之基因，將基因置於 pGBPOIHEL-1 的 16S rRNA 啓動子之後以及 hemL 終止子之前，其步驟描述如下。二個因相鄰的位於費氏丙酸桿菌全部染色體上且在相同之操縱子內。以 PCR 從費氏丙酸桿菌 ATCC6207 分離的染色體 DNA 中放大內含此二基因之

DNA 片段是使用下列之引子：

5'-CTgATATCAATTggAggACATCAgATgACCCgCATCgTC-3'以及 5'-CTgAATTCCggCggCTCAggCgAACAAATg-3'。第一引子含有 EcoRV 以及 MfeI 限制位點以及第二引子含有 EcoRI 限制位點。將得到的 PCR 片段連結入載體 pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)。轉形大腸桿菌之後得到康黴素抗性菌落。經由序列分析証實選殖片段的 DNA 序列。產生的建構體稱為 pGBPPOB-1。

接著將 pGBPPOB-1 用 EcoRV 以及 EcoRI 水解，以及分離內含基因編碼 B 以及 C 之片段並連結至分離自 pGBPO1HEL-1 先用 ClaI 水解，然後以克列諾酶鈍化，以及最後用 MfeI 水解之大的載體片段。轉形大腸桿菌之後得到氨比西林抗性菌落。以限制分析証實分離自轉形株的質體 DNA，產生的建構體被稱為 pGBP02POB-1。

將 pGBP02POB-1 轉形入大腸桿菌 JM101 以及用限制水解分析証實分離自得到的轉形株的質體 DNA。然後將質體 DNA 如前述之描述轉形入費氏丙酸桿菌 ATCC6207。以前述之方法用內含紅黴素之瓊脂平皿選擇轉形株。以限制水解分析証實分離自費氏丙酸桿菌轉形株之質體 DNA。

於內含 M1 培養液之搖動燒瓶中發酵 pGBP02POB-1 轉形株，並用描述於前之方法測定維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之含量。

以描述於前之方法計算維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯

胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽 / 毫升培養菌種 OD - 終點之比例。維生素 B₁₂ 之產率比 pBRESP36B2p16SH 轉形株高 19 %。腺苷基鈷啉醇醯胺之產率比 pBRESP36B2p16SH 轉形株低 96 %，且在 pGBP02POB - 1 轉形株中無法偵測到腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽。

實施例 9

構築費氏丙酸桿菌編碼蛋白質 B、C 以及 cobA (cobA 以及 U 以及 S) 基因之表現載體以及彼在費氏丙酸桿菌中產生維生素 B₁₂ 和其前驅物上之用途。

爲了在丙酸菌過度表現編碼酵素 B (序列識別號 3)、C (序列識別號 5)、以及 cobA 基因之基因，將基因置於 pGBPOIHEL - 1 的 16S rRNA 啓動子之後以及 hemL 終止子之前，其步驟描述如下。用 MfeI 以及 BglII 水解 pGBP02POB - 1 以及分離 1.6 仟鹼基之片段。將此片段連結入以相同酵素水解之 pGBP02COB - 1 載體的 9.7 仟鹼基片段。轉形大腸桿菌之後得到康黴素抗性菌落。經由序列分析証實選殖片段的 DNA 序列。產生的建構體稱爲 pGBPPOE - 1。

將 pGBP02POE - 1 轉形入大腸桿菌 JM101 以及用限制水解分析証實分離自得到的轉形株的質體 DNA。然後將質體 DNA 如前述之描述轉形入費氏丙酸桿菌 ATCC6207。以前述之方法用內含紅黴素之瓊脂平皿選擇轉形株。以限制水解分析証實分離自費氏丙酸桿菌轉形株

之質體 DNA。

於內含 M1 培養液之搖動燒瓶中發酵 pGBP02POE-1 轉形株，並用描述於前之方法測定維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽之含量。

以描述於前之方法計算維生素 B₁₂、腺苷基鈷啉醇醯胺以及腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽 / 毫升培養菌種 OD-終點之比例。維生素 B₁₂ 之產率比 pBRESP36B2p16SH 轉形株高 45%。腺苷基鈷啉醇醯胺之產率比

pBRESP36B2p16SH 轉形株低 65%，且在 pGBP02POE-1 轉形株中無法偵測到腺苷基鈷啉醇醯胺磷酸鹽。

實施例摘要

表下顯示轉形的質體相對於空的質體對照組之實驗數據（空質體值設定成 100% 以供參考）。

實施例	基因	鈷啉醇醯胺 (量/毫升/OD)	鈷啉醇醯胺 P (量/毫升/OD)	維生素 B ₁₂ (量/毫升/OD)
5	空質體	100	100	100
6	cobA	227(+127%)	300(+200%)	94(6%)
7	cobU	4(-96%)	800(+700%)	94(-6%)
8	cobU 以及 S	4(-96%)	0	119(+19%)
9	cobA 以及 U 以及 S	35(-65%)	0	145(+45%)

參考文獻

1. Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A laboratory manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York
2. Innis et al. (1990) "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego
3. WO-A-99/32617
4. van Zeijl, C. et al. (1998) *J. of Biotechnol.* 59: 221-224
5. Devereux et al (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395
6. Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300
7. Altschul, S, F et al (1990) *J Mol Biol* 215:403-10
8. Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919)
9. Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787
10. Cunningham and Wells, *Science*, 244, 1081-1085, 1989
11. de Vos et al. (*Science*, 255, 306-312, 1992)
12. Smith et al. (*J. Mol. Biol.*, 224, 899-904, 1992)
13. Wlodaver et al. (*FEBS Lett.*, 309, 59-64, 1992)
14. Ford et al, *Protein Expression and Purification*, 2, 95-107, 1991
15. Goosen et al, "Transformation and Gene Manipulation in Filamentous Fungi: an overview" in: *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 4 (1992)
16. Romanos et al, *Yeast* 8:423-488 (1992)
17. R. E. Rose, *Nucleic Acids Research* 16(1): 355(1988)
18. WO-A-98/04726
19. WO-A-98/30707
20. Alenkso and Clutterbuck, *Fungal Genet. Biol* 21: 373-397 (1997)
21. EP-A-0,635,574
22. WO-A-98/46772

23. Rapper and Fennell, The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp 293-344, 1965.
24. B. Cameron *et al.*, J. Bacteriol 171:547-557 (1989)
25. Blanche *et al*, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 34:383-411 (1995)
26. WO-A-97/43421
27. Kiatpapan *et al*, Applied & Environmental Microbiology 66(11):4688-4695 (Nov. 2000)
28. Kiatpapan & Murooka, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 144-149 (2001)
29. WO-A-99/67356 (DSM N.V.)
30. Jore *et al*, Applied and Environmental Microbiol. 67(2):499-503 (February 2001)
31. EP-A-0184483
32. EP-A-0284603
33. EP-A-0134048
34. EP-A-0253455
35. EP-A-096430
36. EP-A-0301670
37. Bibb *et al*, Gene 38: 215 (1985).
38. Thompson *et al*, Gene 20:51 (1982)
39. de Vries *et al*, J. Gen. Microbiol. 71:515 (1972)
40. Southern, J. Mol. Biol 98: 503 (1975)
41. Roessner *et al*, Microbiology 148:1845-1853 (2002)
42. Chang *et al*, Journal of Bacteriology 134(3):1141-1156 (June 1978)
43. Blanche *et al*, Anal. Biochem. 189:24 (1990)
44. Spalla *et al*, "Microbial Production of Vitamin B₁₂" in: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, E. J. Van Damme ed., Elsevier, London, New York, pages 257-284.
45. WO-A-98/06868
46. Murakami K, Hashimoto Y, Murooka Y., 1993, Appl Environ Microbiol. 59: 347-350
47. Sattler I, et al. 1995, J Bacteriol. 177:1564-1569.

All documents are herein incorporated by reference.

所有文件全文在此併入參考文獻。

序列表

<110> DSM IP ASSETS B.V.

<120> 生物合成途徑中之基因

<130> N.84450A SMW

<140>

<141>

<150> EP 02255203.8

<151> 2002-07-25

<160> 17

<170> 專利送入版本3.1

<210> 1

<211> 2586

<212> DNA

<213>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2586)

<223>

<400> 1

atg gtg acg gcg acg gct ctt ccg cgg gtg ctc atc gcg gcc ccc gcg 48
 Met Val Thr Ala Thr Ala Leu Pro Arg Val Leu Ile Ala Ala Pro Ala
 1 5 10 15

tcc agc cag gga aag acc acc gtg gcc atc ggc ctg atg gcg gcc ctg 96
 Ser Ser Gln Gly Lys Thr Thr Val Ala Ile Gly Leu Met Ala Ala Leu
 20 25 30

cgg gcc tcg ggg cgc agc gtg gcc gga ttc aag gtg ggc ccc gac tac 144
 Arg Ala Ser Gly Arg Ser Val Ala Gly Phe Lys Val Gly Pro Asp Tyr
 35 40 45

atc gat ccg gcc tat cac gca ctg gcc tgc ggt cgc ccc gcc cgc aac 192
 Ile Asp Pro Gly Tyr His Ala Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gly Arg Asn
 50 55 60

ctg gat ccc tat ttg tgc ggg ccc gag cgc att gcg ccg ttg ttc gcc 240
 Leu Asp Pro Tyr Leu Cys Gly Pro Glu Arg Ile Ala Pro Leu Phe Ala
 65 70 75 80

cat gcc gcg ctg cat ccc gaa ccc gcg gac atc tcg gtc gtc gaa gcc 288
 His Gly Ala Leu His Pro Glu Pro Ala Asp Ile Ser Val Val Glu Gly
 85 90 95

gtg atg gcc atg ttc gac gcc aag ctc gcc gcg tgg ccc gac gcc acc 336
 Val Met Gly Met Phe Asp Gly Lys Leu Gly Ala Trp Pro Asp Gly Thr
 100 105 110

gat gac ccc gcc ggt ttt gcc tca tcg gcc cat atc gcc agg ctg ctc 384
 Asp Asp Pro Ala Gly Phe Gly Ser Ser Ala His Ile Ala Arg Leu Leu

115	120	125	
gat gcc ccc gtg ctg ctc gtg gtc gac ggc tca cac agt gcc cgt acc Asp Ala Pro Val Leu Leu Val Val Asp Gly Ser His Ser Ala Arg Thr 130 135 140			432
gcc gca gcc ctg tgc cat ggc ctg gcc agc tac gat ccc cgc atc cat Ala Ala Ala Leu Cys His Gly Leu Ala Ser Tyr Asp Pro Arg Ile His 145 150 155 160			480
gtg gcc ggc gtc atc ctc aat cgg gtg atg ggt gcc cgc gtg gtc gac Val Ala Gly Val Ile Leu Asn Arg Val Met Gly Ala Arg Val Val Asp 165 170 175			528
gag atc acc cgg ggc tgc gca cgt gtc ggc ctg ccg gtg ctg ggg gct Glu Ile Thr Arg Gly Cys Ala Arg Val Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala 180 185 190			576
ctg ccg aaa agc acg cgg gtg gcc gtg ggc tca cgc cac ctg gga ctg Leu Pro Lys Ser Thr Arg Val Ala Val Gly Ser Arg His Leu Gly Leu 195 200 205			624
gtc acg gcc gac gag cag ggt gac gcg atc ggc atc gtg cag cag gcc Val Thr Ala Asp Glu Gln Gly Asp Ala Ile Gly Ile Val Gln Gln Ala 210 215 220			672
ggt gag ctc gtc gcc gca cac ctc gac ctc gac gcc atc gcc acg atc Gly Glu Leu Val Ala Ala His Leu Asp Leu Asp Ala Ile Ala Thr Ile 225 230 235 240			720
gcc ggt ggg gcc cct gac ctg gcc gtc gat ccc tgg gat ccc gcc gca Ala Gly Gly Ala Pro Asp Leu Ala Val Asp Pro Trp Asp Pro Ala Ala 245 250 255			768
gag gtc gaa ccg gta ccg ggg cgt ccg gtc atc gcc atg gcc tcg ggt Glu Val Glu Pro Val Pro Gly Arg Pro Val Ile Ala Met Ala Ser Gly 260 265 270			816
ccc gca ttc acc ttc cgg tac acc gaa acc gca gaa ctg ctg gag gcg Pro Ala Phe Thr Phe Arg Tyr Thr Glu Thr Ala Glu Leu Leu Glu Ala 275 280 285			864
gcc ggc tgc cgg gtg acg gcc ttc gat ccg ctc acc gcc cgg ggc ctt Ala Gly Cys Arg Val Thr Ala Phe Asp Pro Leu Thr Ala Arg Gly Leu 290 295 300			912
ccg gcc gat gtg tcc ggc ctg tac ctg ggg ggt ggt ttc ccc gag gag Pro Ala Asp Val Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Gly Phe Pro Glu Glu 305 310 315 320			960
cac gcc gag gcg ctc gcc ggc aac acc tcc ctg ggc gct gaa atc gcc His Ala Glu Ala Leu Ala Gly Asn Thr Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala 325 330 335			1008
tca cgc gtg tcc gag ggc ctg ccg acg gtg gcc gag tgt gcg ggg ctg Ser Arg Val Ser Glu Gly Leu Pro Thr Val Ala Glu Cys Ala Gly Leu 340 345 350			1056
ctc tac ctg tgc cgc agc ctg gat gga ctg gcg atg gcc ggg gtg gtc			1104

Leu Tyr	Leu Cys	Arg Ser	Leu Asp	Gly Leu	Ala Met	Ala Gly	Val Val	
	355			360		365		
gac gcc	gac tcg	tcc atg	acg ccg	cgc ctg	acc atc	ggc tac	cac cac	1152
Asp Ala	Asp Ser	Ser Met	Thr Pro	Arg Leu	Thr Ile	Gly Tyr	His His	
	370		375		380			
gcc cgc	gcc gcc	aac gac	agc ttc	ctg atg	cgc gcc	ggg gag	cgc tat	1200
Ala Arg	Ala Ala	Asn Asp	Ser Phe	Leu Met	Arg Ala	Gly Glu	Arg Tyr	
385		390			395		400	
cgg gcc	cat gag	ttc cac	cgc acc	acc ctg	gac acg	ccc ccc	tac gac	1248
Arg Ala	His Glu	Phe His	Arg Thr	Thr Thr	Leu Asp	Thr Pro	Pro Tyr	
		405		410			415	
cgc gac	ccc gga	cca caa	cgg ctg	ggc gac	caa cgg	ttg gcg	tgg gac	1296
Arg Asp	Pro Gly	Pro Gln	Arg Leu	Gly Asp	Gln Arg	Leu Ala	Trp Asp	
	420			425		430		
gtg gag	acc ccg	acg ggg	ggc aac	cga ccc	gag ggg	gtg ctg	gtc gcc	1344
Val Glu	Thr Pro	Thr Gly	Gly Asn	Arg Pro	Glu Gly	Val Leu	Val Ala	
	435		440			445		
ccg acc	ccc ggt	tcc gcg	ccc agc	gtc cac	gcc tcc	tac cag	cac ctg	1392
Pro Thr	Pro Gly	Ser Ala	Pro Ser	Val His	Ala Ser	Tyr Gln	His Leu	
	450		455		460			
cac tgg	gca ggg	agt ccg	gta ctg	gcg caa	cgc ttc	gcc cgg	gcg gcg	1440
His Trp	Ala Gly	Ser Pro	Val Leu	Ala Gln	Arg Phe	Ala Arg	Ala Ala	
465		470			475		480	
agc gaa	tat ggg	cac acc	ggc cat	cac tcc	ccc cgg	cct gcc	gcc acg	1488
Ser Glu	Tyr Gly	His Thr	Gly His	His Ser	Pro Arg	Pro Ala	Ala Thr	
		485		490		495		
acg ccg	gga gat	gcg ttg	tcc gca	gcg ccc	gac ctc	acc cat	cac ggg	1536
Thr Pro	Gly Asp	Ala Leu	Ser Ala	Ala Pro	Asp Leu	Thr His	His Gly	
	500			505		510		
gat cgc	gat gtg	ctg ccc	ggc ctg	gtc gac	ttg gcg	gtg aac	gtg cgc	1584
Asp Arg	Asp Val	Leu Pro	Gly Leu	Val Asp	Leu Ala	Val Asn	Val Arg	
	515		520			525		
gat gtg	cga cct	ccg gcc	tgg ctc	gtg gag	cgc atc	gtc gcc	tcc agc	1632
Asp Val	Arg Pro	Pro Ala	Trp Leu	Val Glu	Arg Ile	Val Ala	Ser Ser	
	530		535		540			
gac cag	tgg gcc	cac tac	ccc gat	cag cgc	gaa gcg	acc cgt	gcg gtg	1680
Asp Gln	Trp Ala	His Tyr	Pro Asp	Gln Arg	Glu Ala	Thr Arg	Ala Val	
545		550			555		560	
gca ctg	cgc cat	ggc gtc	aac ccc	gac cag	gta ctg	ctc acg	gcc ggg	1728
Ala Leu	Arg His	Gly Val	Asn Pro	Asp Gln	Val Leu	Leu Thr	Ala Gly	
		565		570			575	
tcc tcg	gag gcg	ttc agc	ctg atc	gcc cac	ggg ttc	tcc ccg	cgc tgg	1776
Ser Ser	Glu Ala	Phe Ser	Leu Ile	Ala His	Gly Phe	Ser Pro	Arg Trp	
	580			585		590		

gcg gtc gtg gtg cat ccc cag ttc acc gaa cca gag gtg gcc ctg cgc	1824
Ala Val Val Val His Pro Gln Phe Thr Glu Pro Glu Val Ala Leu Arg	
595 600 605	
aac gcc ggg cgc ccg gtc ggc cgc ctg gtg ctc cat gcc tcg gat ggc	1872
Asn Ala Gly Arg Pro Val Gly Arg Leu Val Leu His Ala Ser Asp Gly	
610 615 620	
ttc cag ttc gat cac gaa ctg ctg gac ccc agg gcc gac atg gtg gtc	1920
Phe Gln Phe Asp His Glu Leu Leu Asp Pro Arg Ala Asp Met Val Val	
625 630 635 640	
atc ggc aat ccg acc aat ccc acc ggc gtg ctg cat tcg gcg gcg agc	1968
Ile Gly Asn Pro Thr Asn Pro Thr Gly Val Leu His Ser Ala Ala Ser	
645 650 655	
ctg cgc gcg ttg tgc cgg ccc gga cgc gtg gtg gtg gtt gac gag gca	2016
Leu Arg Ala Leu Cys Arg Pro Gly Arg Val Val Val Val Asp Glu Ala	
660 665 670	
ttc atg gac gcc gtg ccg ggc gag ccc gag agc ctc atc ggg gca cgc	2064
Phe Met Asp Ala Val Pro Gly Glu Pro Glu Ser Leu Ile Gly Ala Arg	
675 680 685	
atg gat ggc ctg ttg gtc acc cgc tcg ttc acg aag act tgg agc gtc	2112
Met Asp Gly Leu Leu Val Thr Arg Ser Phe Thr Lys Thr Trp Ser Val	
690 695 700	
ccg ggg ctg cgg atc gga tat gtg gtc ggg gat ccc gcg ctc att cgc	2160
Pro Gly Leu Arg Ile Gly Tyr Val Val Gly Asp Pro Ala Leu Ile Arg	
705 710 715 720	
gtc ctg gcg cac gaa cag ccc tgt tgg ccc atc tcc acc ccc gcc ctg	2208
Val Leu Ala His Glu Gln Pro Cys Trp Pro Ile Ser Thr Pro Ala Leu	
725 730 735	
gtc acc gcc cgc gaa tgc tcc acg cca cgc gcc gtg gag cag gcc acc	2256
Val Thr Ala Arg Glu Cys Ser Thr Pro Arg Ala Val Glu Gln Ala Thr	
740 745 750	
tca gat gcc cga cag gcg gcg cag gac cgc cga cac ctg gtg gcc cgc	2304
Ser Asp Ala Arg Gln Ala Ala Gln Asp Arg Arg His Leu Val Ala Arg	
755 760 765	
ctg gcc ggg atc ggc atc cag acc gtc ggg gag gcc agg gcc ccc ttc	2352
Leu Ala Gly Ile Gly Ile Gln Thr Val Gly Glu Ala Arg Ala Pro Phe	
770 775 780	
gtc cta gtc gac ctg cgc gcc cac ccg ccc ggt ggg ctt cgt gcg gga	2400
Val Leu Val Asp Leu Arg Ala His Pro Pro Gly Gly Leu Arg Ala Gly	
785 790 795 800	
ttg cgg acg ctc ggc ttc acc gtg cgc agc ggc gag agc ttc ccc ggc	2448
Leu Arg Thr Leu Gly Phe Thr Val Arg Ser Gly Glu Ser Phe Pro Gly	
805 810 815	
ctg ggc gcg ggc tgg ttg cgg ctc gcg gtt cgc cac ccg gac atc agc	2496
Leu Gly Ala Gly Trp Leu Arg Leu Ala Val Arg His Pro Asp Ile Ser	
820 825 830	

225					230					235				240	
Ala	Gly	Gly	Ala	Pro	Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Pro	Trp	Asp	Pro	Ala	Ala
				245					250					255	
Glu	Val	Glu	Pro	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Val	Ile	Ala	Met	Ala	Ser	Gly
			260					265					270		
Pro	Ala	Phe	Thr	Phe	Arg	Tyr	Thr	Glu	Thr	Ala	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala
		275					280					285			
Ala	Gly	Cys	Arg	Val	Thr	Ala	Phe	Asp	Pro	Leu	Thr	Ala	Arg	Gly	Leu
	290					295					300				
Pro	Ala	Asp	Val	Ser	Gly	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Glu
305					310					315					320
His	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala
				325					330					335	
Ser	Arg	Val	Ser	Glu	Gly	Leu	Pro	Thr	Val	Ala	Glu	Cys	Ala	Gly	Leu
			340					345					350		
Leu	Tyr	Leu	Cys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gly	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Val	Val
		355					360					365			
Asp	Ala	Asp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	Arg	Leu	Thr	Ile	Gly	Tyr	His	His
	370					375					380				
Ala	Arg	Ala	Ala	Asn	Asp	Ser	Phe	Leu	Met	Arg	Ala	Gly	Glu	Arg	Tyr
385				390					395						400
Arg	Ala	His	Glu	Phe	His	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Thr	Pro	Pro	Tyr	Asp
				405					410					415	
Arg	Asp	Pro	Gly	Pro	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln	Arg	Leu	Ala	Trp	Asp
			420					425					430		
Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Gly	Gly	Asn	Arg	Pro	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Ala
		435					440					445			
Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Ser	Val	His	Ala	Ser	Tyr	Gln	His	Leu
	450					455					460				
His	Trp	Ala	Gly	Ser	Pro	Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Phe	Ala	Arg	Ala	Ala
465					470					475					480
Ser	Glu	Tyr	Gly	His	Thr	Gly	His	His	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Ala	Thr
				485					490				495		
Thr	Pro	Gly	Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Pro	Asp	Leu	Thr	His	His	Gly
			500				505						510		
Asp	Arg	Asp	Val	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Asp	Leu	Ala	Val	Asn	Val	Arg
		515					520					525			
Asp	Val	Arg	Pro	Pro	Ala	Trp	Leu	Val	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Ser	Ser
	530					535					540				

Asp Gln Trp Ala His Tyr Pro Asp Gln Arg Glu Ala Thr Arg Ala Val
 545 550 555 560

Ala Leu Arg His Gly Val Asn Pro Asp Gln Val Leu Leu Thr Ala Gly
 565 570 575

Ser Ser Glu Ala Phe Ser Leu Ile Ala His Gly Phe Ser Pro Arg Trp
 580 585 590

Ala Val Val Val His Pro Gln Phe Thr Glu Pro Glu Val Ala Leu Arg
 595 600 605

Asn Ala Gly Arg Pro Val Gly Arg Leu Val Leu His Ala Ser Asp Gly
 610 615 620

Phe Gln Phe Asp His Glu Leu Leu Asp Pro Arg Ala Asp Met Val Val
 625 630 635 640

Ile Gly Asn Pro Thr Asn Pro Thr Gly Val Leu His Ser Ala Ala Ser
 645 650 655

Leu Arg Ala Leu Cys Arg Pro Gly Arg Val Val Val Val Asp Glu Ala
 660 665 670

Phe Met Asp Ala Val Pro Gly Glu Pro Glu Ser Leu Ile Gly Ala Arg
 675 680 685

Met Asp Gly Leu Leu Val Thr Arg Ser Phe Thr Lys Thr Trp Ser Val
 690 695 700

Pro Gly Leu Arg Ile Gly Tyr Val Val Gly Asp Pro Ala Leu Ile Arg
 705 710 715 720

Val Leu Ala His Glu Gln Pro Cys Trp Pro Ile Ser Thr Pro Ala Leu
 725 730 735

Val Thr Ala Arg Glu Cys Ser Thr Pro Arg Ala Val Glu Gln Ala Thr
 740 745 750

Ser Asp Ala Arg Gln Ala Ala Gln Asp Arg Arg His Leu Val Ala Arg
 755 760 765

Leu Ala Gly Ile Gly Ile Gln Thr Val Gly Glu Ala Arg Ala Pro Phe
 770 775 780

Val Leu Val Asp Leu Arg Ala His Pro Pro Gly Gly Leu Arg Ala Gly
 785 790 795 800

Leu Arg Thr Leu Gly Phe Thr Val Arg Ser Gly Glu Ser Phe Pro Gly
 805 810 815

Leu Gly Ala Gly Trp Leu Arg Leu Ala Val Arg His Pro Asp Ile Ser
 820 825 830

Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Ala Arg Thr Ile Asp Ala Leu Asp Thr
 835 840 845

Ala Gln His Pro Met Arg Pro Pro Gln Gly Asp Ile Arg
 850 855 860

<210> 3
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 費氏丙酸桿菌

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(657)
 <223>

 <400> 3
 atg gac gtt cct gac agt ccc gag tcc cga agg ctg ctc gat cag ctg 48
 Met Asp Val Pro Asp Ser Pro Glu Ser Arg Arg Leu Leu Asp Gln Leu
 1 5 10 15

 tca ggc ctc ggt gcc cgg caa cgt ccg gca cga acc ctc gtc acc ggg 96
 Ser Gly Leu Gly Ala Arg Gln Arg Pro Ala Arg Thr Leu Val Thr Gly
 20 25 30

 ggc gcc cgg agc ggg aag tcc agc tat gcc gag gcg ctg ctg ggg tcg 144
 Gly Ala Arg Ser Gly Lys Ser Ser Tyr Ala Glu Ala Leu Leu Gly Ser
 35 40 45

 ttc gac cac gtc gac tac atc gcc acc tcg caa cgc aac cct gac gac 192
 Phe Asp His Val Asp Tyr Ile Ala Thr Ser Gln Arg Asn Pro Asp Asp
 50 55 60

 ccc gag tgg atg gcc cgc atc gcc gcc cac gtc gcg cgc cgc ccg aag 240
 Pro Glu Trp Met Ala Arg Ile Ala Ala His Val Ala Arg Arg Pro Lys
 65 70 75 80

 agc tgg aac acc gtg gag acc ctt gac gtg gcg cag gtg ctg tcc gac 288
 Ser Trp Asn Thr Val Glu Thr Leu Asp Val Ala Gln Val Leu Ser Asp
 85 90 95

 gac ggc tcc ccc gcc ctg gtc gat tgc ctg gcc gtg tgg ctc acc cgc 336
 Asp Gly Ser Pro Ala Leu Val Asp Cys Leu Gly Val Trp Leu Thr Arg
 100 105 110

 gag ctg gac gtc acc gac gcc tgg cag cac ccg gag cag gcc cgc ccc 384
 Glu Leu Asp Val Thr Asp Ala Trp Gln His Pro Glu Gln Ala Arg Pro
 115 120 125

 gag ctg cag cac cgc atc gat gag ttg gcc act gcg gtc gcc ggc tcc 432
 Glu Leu Gln His Arg Ile Asp Glu Leu Ala Thr Ala Val Ala Gly Ser
 130 135 140

 ccg cgc cgc gtg gtg ctg gtc acc aac gag gtc ggt tcc ggc gtg gtg 480
 Pro Arg Arg Val Val Leu Val Thr Asn Glu Val Gly Ser Gly Val Val
 145 150 155 160

 ccc gcc acg cag gca ggg cgc acc ttc cgt gac tgg ctg gga atc ctc 528
 Pro Ala Thr Gln Ala Gly Arg Thr Phe Arg Asp Trp Leu Gly Ile Leu
 165 170 175

 aac gcc agc gtc gcg gac gcc tgc gac gag gta ctg ctg tgc gtc gcc 576
 Asn Ala Ser Val Ala Asp Ala Cys Asp Glu Val Leu Leu Cys Val Ala

	180		185		190		
gga cgg gcg ctg agc ctg cca ccg cga ccg gga ggc cct cat ggc gcc							624
Gly Arg Ala Leu Ser Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro His Gly Ala							
	195		200		205		
ggc acg gac ccc caa ccg aag gac gcg atc tga							657
Gly Thr Asp Pro Gln Pro Lys Asp Ala Ile							
	210		215				
<210>	4						
<211>	218						
<212>	PRT						
<213>	費氏丙酸桿菌						
<400>	4						
Met Asp Val Pro Asp Ser Pro Glu Ser Arg Arg Leu Leu Asp Gln Leu							
1	5		10		15		
Ser Gly Leu Gly Ala Arg Gln Arg Pro Ala Arg Thr Leu Val Thr Gly							
	20		25		30		
Gly Ala Arg Ser Gly Lys Ser Ser Tyr Ala Glu Ala Leu Leu Gly Ser							
	35		40		45		
Phe Asp His Val Asp Tyr Ile Ala Thr Ser Gln Arg Asn Pro Asp Asp							
	50		55		60		
Pro Glu Trp Met Ala Arg Ile Ala Ala His Val Ala Arg Arg Pro Lys							
	65		70		75		80
Ser Trp Asn Thr Val Glu Thr Leu Asp Val Ala Gln Val Leu Ser Asp							
	85		90		95		
Asp Gly Ser Pro Ala Leu Val Asp Cys Leu Gly Val Trp Leu Thr Arg							
	100		105		110		
Glu Leu Asp Val Thr Asp Ala Trp Gln His Pro Glu Gln Ala Arg Pro							
	115		120		125		
Glu Leu Gln His Arg Ile Asp Glu Leu Ala Thr Ala Val Ala Gly Ser							
	130		135		140		
Pro Arg Arg Val Val Leu Val Thr Asn Glu Val Gly Ser Gly Val Val							
	145		150		155		160
Pro Ala Thr Gln Ala Gly Arg Thr Phe Arg Asp Trp Leu Gly Ile Leu							
	165		170		175		
Asn Ala Ser Val Ala Asp Ala Cys Asp Glu Val Leu Leu Cys Val Ala							
	180		185		190		
Gly Arg Ala Leu Ser Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro His Gly Ala							
	195		200		205		
Gly Thr Asp Pro Gln Pro Lys Asp Ala Ile							
	210		215				

<210> 5
 <211> 780
 <212> DNA
 <213> 費氏丙酸桿菌

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(780)
 <223>

 <400> 5
 atg gcc acc cgc aat gga ctg ctg gct gcc tgg gga ctg ttc acg gtg 48
 Met Ala Thr Arg Asn Gly Leu Leu Ala Ala Trp Gly Leu Phe Thr Val
 1 5 10 15

 ctg ccc gca ccc gtg gtg gcc gag gtg gat gag cga ctc gcc gtg cgg 96
 Leu Pro Ala Pro Val Val Ala Glu Val Asp Glu Arg Leu Ala Val Arg
 20 25 30

 gcg atc gcc tcg atg ccg tgg gtc ggc ctc gga ctg ggc ctg atc gcc 144
 Ala Ile Ala Ser Met Pro Trp Val Gly Leu Gly Leu Gly Leu Ile Ala
 35 40 45

 gga ctc ggc tgc gcc atc gtc acc gtc gcg ggg ggc gcc cag cca ctg 192
 Gly Leu Gly Cys Ala Ile Val Thr Val Ala Gly Gly Gly Gln Pro Leu
 50 55 60

 gca atc gca gca ggc ctg gca atc ctg gcc ctg tgc acc ggc ttc ctg 240
 Ala Ile Ala Ala Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Cys Thr Gly Phe Leu
 65 70 75 80

 cac ctc gac gga ctc gcc gac acc gcc gac ggc ctg ggc tcc cgc aag 288
 His Leu Asp Gly Leu Ala Asp Thr Ala Asp Gly Leu Gly Ser Arg Lys
 85 90 95

 ccg gcc cac gag gcc ctg acc atc atg cgc caa tca gac atc ggg ccc 336
 Pro Ala His Glu Ala Leu Thr Ile Met Arg Gln Ser Asp Ile Gly Pro
 100 105 110

 atg ggc gtc acc gcc atc atc ctc gtg ctg gcg ttg gag atc gcg gca 384
 Met Gly Val Thr Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala Leu Glu Ile Ala Ala
 115 120 125

 ggc ggt tca gga cac ctt gat ggc tgg cgt ggc gtc tgg ctg ctg gtg 432
 Gly Gly Ser Gly His Leu Asp Gly Trp Arg Gly Val Trp Leu Leu Val
 130 135 140

 aca atg ccc atg gtg gcg cgc gtc agc gcc ctg tcc gcc acc gga cga 480
 Thr Met Pro Met Val Ala Arg Val Ser Ala Leu Ser Ala Thr Gly Arg
 145 150 155 160

 tgg att ccg agc gcc cac aag aag ggg ttc gga gcg ctc ttc gcc gga 528
 Trp Ile Pro Ser Ala His Lys Lys Gly Phe Gly Ala Leu Phe Ala Gly
 165 170 175

 aag acg cac cct gcg acg atc gtg gtc gcc tca gtg atc gcc gcg gtg 576
 Lys Thr His Pro Ala Thr Ile Val Val Ala Ser Val Ile Ala Ala Val
 180 185 190

tgg gcc cac gtg cgc acc ctg ctc gcc gca cag acc cac egg ctc tac 384
 Trp Ala His Val Arg Thr Leu Leu Ala Ala Gln Thr His Arg Leu Tyr
 115 120 125

atc ctc gac gaa ttc gcc cat gtg ctc aac aag gga tgg ctg gat gtc 432
 Ile Leu Asp Glu Phe Ala His Val Leu Asn Lys Gly Trp Leu Asp Val
 130 135 140

gac gag gtc gct gac gac ctg gca cat cgt ccc ggc acg caa cat gtg 480
 Asp Glu Val Ala Asp Asp Leu Ala His Arg Pro Gly Thr Gln His Val
 145 150 155 160

gtg atc acc gga cgc aac tgc ccc gcc gga atc atc ggg atc gcc gac 528
 Val Ile Thr Gly Arg Asn Cys Pro Ala Gly Ile Ile Gly Ile Ala Asp
 165 170 175

atc gtc acg tcc atg gac aac gtc aaa cat ccc ttt ggc aag gga gaa 576
 Ile Val Thr Ser Met Asp Asn Val Lys His Pro Phe Gly Lys Gly Glu
 180 185 190

cga gga cag gcg ggt atc gaa tgg tga 603
 Arg Gly Gln Ala Gly Ile Glu Trp
 195 200

<210> 8

<211> 200

<212> PRT

<213> 費氏丙酸桿菌

<400> 8

Met Ser Gly Ser Ala Pro Gln Arg Thr Glu Pro Thr Thr Ala Glu Leu
 1 5 10 15

Arg His Arg Pro Arg Leu Ile Val Asn Thr Gly Asn Gly Lys Gly Lys
 20 25 30

Ser Thr Ala Ala Phe Gly Met Gly Leu Arg Ala Trp Ala Gln Gly Trp
 35 40 45

Ser Ile Gly Val Phe Gln Phe Ile Lys Ser Gly Arg Trp His Thr Gly
 50 55 60

Glu Gln Gln Ala Tyr Ala Gln Leu Asp Gln Ala His Arg Thr Thr Gly
 65 70 75 80

Val Gly Gly Pro Val Glu Trp Gln Ser Leu Gly Ser Gly Trp Ser Trp
 85 90 95

Leu Arg Ala Thr Glu Gly Thr Asp Gln Ala Ala Met Ala Ala Ala Gly
 100 105 110

Trp Ala His Val Arg Thr Leu Leu Ala Ala Gln Thr His Arg Leu Tyr
 115 120 125

Ile Leu Asp Glu Phe Ala His Val Leu Asn Lys Gly Trp Leu Asp Val
 130 135 140

Asp Glu Val Ala Asp Asp Leu Ala His Arg Pro Gly Thr Gln His Val

<211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工的序列

<220>
 <223> 引子

<400> 13

TCCAATTGGG ACTCAGTGGT CGCTG

25

<211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工的序列

<220>
 <223> 引子

<400> 14

CTGATATCAA TTGGAGGACA TCAGATGACC CGCATCGTC

39

<211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工的序列

<220>
 <223> 引子

<400> 15

CTGAATTCGG CCACGTCAGA TCGCGTCC

28

<211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工的序列

<220>
 <223> 引子

<400> 16

CTGATATCAA TTGGAGGACA TCAGATGACC CGCATCGTC

39

<211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工的序列

<220>
 <223> 引子

<400> 17

CTGAATTCGG GCGGCTCAGG CGAACAATG

29

伍、中文發明摘要

發明名稱：維生素 B₁₂ 之生物合成途徑中涉及之基因及其所編碼之多肽，含有該基因之載體及宿主細胞，及製造維生素 B₁₂ 之方法

本發明揭示存在於費氏丙酸桿菌中的四種新基因，以及彼編碼之酵素，以及在維生素 B₁₂ 生物合成途徑中與彼有關聯的至少五個步驟。該四種酵素為：

A：鈷啉胺酸 a，c-二醯胺合成酶；

B：雙功能酵素，其為鈷啉醇醯胺磷激酶以及鈷啉醇醯胺磷酸鹽甲脒基轉移酶；

C：氰鈷胺素 5-磷酸鹽合成酶；以及

D：腺苷基轉移酶。

編碼四種酵素之基因可置於丙酸桿菌穿梭載體並用以轉形丙酸桿菌宿主，以改良工業量級之發酵中產生維生素 12 或其前驅物。

98年10月8日修(更)正

陸、英文發明摘要

發明名稱：

GENES AND THEIR ENCODED POLYPEPTIDES INVOLVED IN THE BIOSYNTHETIC PATHWAY OF VITAMIN B₁₂, VECTORS AND HOST CELLS COMPRISING THE GENES, AND PROCESS FOR PRODUCING VITAMIN B₁₂

Four new genes, and the enzymes that they encode, are disclosed, which are present in *Propionibacterium freudenreichii*, and which are involved in at least five steps in the biosynthetic pathway of vitamin B₁₂. The four enzymes are:

- A: cobyrinic acid a, c-diamide synthase;
- B: a bifunctional enzyme, which is a cobinamide kinase and a cobinamide phosphate guanyl transferase;
- C: a cobalamin 5-phosphate synthase; and
- D: an adenosyl transferase.

Genes encoding the four enzymes can be placed in *Propionibacteria* shuttle vectors and used to transform *Propionibacteria* hosts, in order to improve the production of vitamin B₁₂ or a precursor thereof on an industrial scale during fermentation.

99. 5. 21

子 月 日 修(更)正本

拾、申請專利範圍

附件 4: 第 92120267 號 專利 申請 案

中文 申請 專利 範圍 替換 本

民國 99 年 5 月 21 日 修正

1. 一種可取得自細菌分歧桿菌科 (Mycobacteriaceae) 之多肽，其：

(i) 作用如磷基 -、核苷醯基 - 或芳基轉移酶；或

(ii) 具有 EC 2.7.7 - 或 EC 2.7.8 - 之活性；該多肽

係選自下列中：

(a) 依照序列識別號 4 或與其有至少 85% 相同序多的多肽，

(b) 依照序列識別號 6 或與其有至少 85% 相同序列的多肽，

(c) 由依照序列識別號 3 或在嚴格條件下雜交至彼之序列所編碼之多肽，且具有磷基 - 或核苷醯基轉移酶之活性，

(d) 由依照序列識別號 5 或在嚴格條件下雜交至彼之序列所編碼之多肽，且具有芳基轉移酶之活性，

(e) 多肽，其為具有至少 150 個胺基酸長度之片段

(a) 至 (d) ，

(f) 多肽，其為 [(a) 或 (c)] 與 [(b) 或 (d)] 之二多肽組合體。

2. 一種多核苷酸，其編碼如申請專利範圍第 1 項之多肽。

3. 一種載體，其係包含如申請專利範圍第 2 項中定義之一種或多種多核苷酸序列。

4. 如申請專利範圍第 3 項之載體，其另包含編碼 CobA 蛋白質之核酸序列。

5. 如申請專利範圍第 4 項之載體，其中編碼 CobA 蛋白質之核酸序列係取自費氏丙酸桿菌 (*P. freudenreichii*) 。

6. 一種可視需要為原核的宿主細胞，其係經如申請專利範圍第 2 項之多核苷酸序列之一或多種複本或如申請專利範圍第 3、4 或 5 項之載體所轉形。

7. 一種生產維生素 B₁₂ 或其前驅物之方法，該方法包含在製作或合成維生素 B₁₂ 或其前驅物之條件下培養或發酵如申請專利範圍第 6 項之宿主細胞。

8. 一種如申請專利範圍第 1 項之多肽、如申請專利範圍第 2 項之多核苷酸、如申請專利範圍第 3、4 或 5 項之載體或如申請專利範圍第 6 項之宿主細胞在製作或合成維生素 B₁₂ 或其前驅物方面的用途。

- 柒、(一)、本案指定代表圖為：無
(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

- 捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

