

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512502

(P2005-512502A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	4 B O 5 0
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 B O 6 4
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	4 B O 6 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 154 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-548104 (P2002-548104)	(71) 出願人	502427323
(86) (22) 出願日	平成13年10月26日 (2001.10.26)		ファルマシア・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月19日 (2003.6.19)		アメリカ合衆国ミズーリ州63017-1
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/051070		732, チェスターフィールド, チェスター
(87) 国際公開番号	W02002/046386		フィールド・パークウェイ・ウエスト
(87) 国際公開日	平成14年6月13日 (2002.6.13)		700
(31) 優先権主張番号	60/244,300	(74) 代理人	100089705
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000.10.30)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス・オクラセウス (*Aspergillus ochraceus*) 11アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素

(57) 【要約】

本発明は、アスペルギルス・オクラセウス胞子のmRNAから生成したcDNAライブラリーより単離した、新規チトクロムP450様酵素(アスペルギルス・オクラセウス)に関する。11アルファ水酸化酵素をコードするcDNAを、電子供与体としてヒト酸化還元酵素をコードするcDNAと、スポドプテラ・フルギベルダ(Sf-9)昆虫細胞で同時発現すると、該水酸化酵素は、HPLC解析で測定されるように、ステロイド基質4-アンドロステン-3,17-ジオン(AD)から11アルファ-ヒドロキシ-ADへの変換を触媒するのに成功した。本発明はまた、相補体、相同体および断片を含む、これらのcDNAに関連するか、またはこれらに由来する核酸分子、並びにこれらの核酸分子を用いて、例えばそのポリペプチドおよび断片を生成する方法にも関する。本発明はまた、A

. オクラセウス11アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素を認識する抗体の生成、並びにこれらの抗体を用いて、それぞれ非修飾および形質転換宿主細胞内の、これらの天然および組換えポリペプチドの存在を検出する方法にも関する。本発明はまた、異種宿主細胞において、ヒトまたはアスペルギルス酸化還元酵素と別個に、または該酵素と組み合わせ、アスペルギルス11アルファ水酸化酵素遺伝子を発現して、ステロイド基質の11アルファヒドロキシ対応物への生物変換を促進する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アスペルギルス・オクラセウス (*Aspergillus ochraceus*) 11 アルファ水酸化酵素をコードする単離精製核酸。

【請求項 2】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする単離 DNA。

【請求項 3】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする単離 cDNA。

【請求項 4】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする単離遺伝子。

10

【請求項 5】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項 6】

核酸配列が配列番号 1 に示すとおりである単離精製核酸。

【請求項 7】

DNA 配列が配列番号 1 に示すとおりである単離 DNA。

【請求項 8】

cDNA 配列が配列番号 1 に示すとおりである単離 cDNA。

【請求項 9】

遺伝子配列が配列番号 1 に示すとおりである単離遺伝子。

20

【請求項 10】

遺伝子配列が配列番号 1 に示すとおりである、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項 11】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列を有する単離タンパク質。

【請求項 12】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列を有する、タンパク質の単離変異体。

【請求項 13】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質。

30

【請求項 14】

タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 2 に示すとおりである単離タンパク質。

【請求項 15】

タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 2 に示すとおりである、タンパク質の単離変異体。

【請求項 16】

アミノ酸配列が、少なくとも 1 つの保守的アミノ酸置換を持つ配列番号 2 を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 17】

アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 99% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

40

【請求項 18】

アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 95% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 19】

アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 90% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 20】

アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 75% 同一である配列を含んでなる、精製ポリ

50

ペプチド。

【請求項 2 1】

アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 5 0 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 2 2】

アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ酸化還元酵素をコードする単離精製核酸。

【請求項 2 3】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離 D N A。

【請求項 2 4】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離 c D N A。

10

【請求項 2 5】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離遺伝子。

【請求項 2 6】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項 2 7】

核酸配列が配列番号 5 に示すとおりである単離精製核酸。

【請求項 2 8】

D N A 配列が配列番号 5 に示すとおりである単離 D N A。

【請求項 2 9】

c D N A 配列が配列番号 5 に示すとおりである単離 c D N A。

20

【請求項 3 0】

遺伝子配列が配列番号 5 に示すとおりである単離遺伝子。

【請求項 3 1】

遺伝子配列が配列番号 5 に示すとおりである、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項 3 2】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を有する単離タンパク質。

【請求項 3 3】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を有する、タンパク質の単離変異体。

【請求項 3 4】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質。

30

【請求項 3 5】

タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 6 に示すとおりである単離タンパク質。

【請求項 3 6】

タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 6 に示すとおりである、タンパク質の単離変異体。

【請求項 3 7】

アミノ酸配列が、少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を持つ配列番号 6 を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 3 8】

アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

40

【請求項 3 9】

アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 9 5 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 4 0】

アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 9 0 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 4 1】

アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 7 5 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリ

50

ペプチド。

【請求項 4 2】

アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 50% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 4 3】

3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド) ; または 3 ケトデルタ 1 , 2 デルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 1 1 アルファ水酸化を触媒可能な酵素をコードする、単離精製核酸。

10

【請求項 4 4】

前記酵素が、3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイドの 1 5 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 4 3 の単離精製核酸。

【請求項 4 5】

前記水酸化が :

(a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;

(b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;

(c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ;

(d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D ;

20

(e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン ;

(f) 6 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ;

(g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;

(h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン ;

(i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン ;

(j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン ;

(k) プロゲステロンから 1 1 アルファヒドロキシプロゲステロン ;

(l) メクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトン ; および

30

(m) メクスレノン 7 , 9 - ビスラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 7 , 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、請求項 4 3 または請求項 4 4 の単離精製核酸。

【請求項 4 6】

前記水酸化が :

(a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;

(b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;

(c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ; および

(d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D からなる群より選択される、請求項 4 5 の単離精製核酸。

40

【請求項 4 7】

前記水酸化が、カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノンである、請求項 4 6 の単離精製核酸。

【請求項 4 8】

3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 1 , 2 デルタ 4 , 5 ステロイドの 1 1 アルファ水酸化を触媒可能なタンパク質を発現する方法であって ;

(a) 前記タンパク質をコードする核酸に操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる発現カセットで、宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションし、そして

(b) 前記宿主細胞において、前記タンパク質を発現する

50

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 49】

前記タンパク質を回収する工程をさらに含んでなる、請求項 48 のタンパク質産生法。

【請求項 50】

前記タンパク質がアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素である、請求項 48 または請求項 49 の方法。

【請求項 51】

電子供与体タンパク質を発現することをさらに含んでなり、前記電子供与体タンパク質が、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 11 アルファ水酸化を触媒可能な前記タンパク質に、電子を供与することが可能である、請求項 50 の方法。 10

【請求項 52】

電子供与体タンパク質が、ヒト酸化還元酵素およびアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素からなる群より選択される、請求項 51 の方法。

【請求項 53】

前記電子供与体タンパク質がアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である、請求項 51 の方法。

【請求項 54】

前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素および前記電子供与体タンパク質をコードする核酸が、別個の発現カセット上にある、請求項 51 の方法。 20

【請求項 55】

前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素および前記電子供与体タンパク質をコードする核酸が、同一発現カセット上にある、請求項 51 の方法。

【請求項 56】

前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素がアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素であり、そして前記電子供与体タンパク質がヒト酸化還元酵素である、請求項 54 または請求項 55 の方法。

【請求項 57】

前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素がアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素であり、そして前記電子供与体タンパク質がアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である、請求項 54 または請求項 55 の方法。 30

【請求項 58】

前記発現カセットが発現ベクター上にある、請求項 48 の方法。

【請求項 59】

前記発現ベクターがバキュロウイルスである、請求項 58 の方法。

【請求項 60】

前記バキュロウイルスが、オートグラファ・カリフォルニカ (Autographa californica) 核多核体病ウイルスおよびカイコガ (Bombyx mori) 核多核体病ウイルスからなる群より選択される、核多核体病ウイルスである、請求項 59 の方法。 40

【請求項 61】

前記核多核体病ウイルスがオートグラファ・カリフォルニカ核多核体病ウイルスである、請求項 60 の方法。

【請求項 62】

前記宿主細胞が昆虫細胞である、請求項 58 の方法。

【請求項 63】

前記昆虫細胞がスポドプテラ・フルギベルダ (Spodoptera frugiperda)、トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni)、オートグラファ・カリフォルニカ、およびマンデュカ・セクスタ (Manduca sexta) 細胞からな 50

る群より選択される、請求項 6 2 の方法。

【請求項 6 4】

前記昆虫細胞がスポドブレラ・フルギベルダ細胞である、請求項 6 3 の方法。

【請求項 6 5】

前記アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素が配列番号 2 である、請求項 4 8 ~ 6 4 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 6 6】

前記ヒト酸化還元酵素が配列番号 4 である、請求項 4 8 ~ 6 4 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 6 7】

前記アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素が配列番号 6 である、請求項 4 8 ~ 6 4 のいずれか 1 項の方法。 10

【請求項 6 8】

3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド) ; または 3 ケトデルタ 1 , 2 デルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 1 1 アルファ水酸化を触媒可能である、単離精製ポリペプチド。

【請求項 6 9】

前記酵素が、3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイドの 1 5 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 6 8 の単離精製ポリペプチド。 20

【請求項 7 0】

前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;
- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ;
- (d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D ;

- (e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン ;

- (f) 6 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ; 30

- (g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;

- (h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン ;

- (i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン ;

- (j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン ;

- (k) プロゲステロンから 1 1 アルファヒドロキシプロゲステロン ;

- (l) メクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトン ; および

- (m) メクスレノン 7 , 9 - ビスラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 7 , 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、請求項 6 8 または請求項 6 9 の単離精製ポリペプチド。 40

【請求項 7 1】

前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;

- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;

- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ; および

(d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D からなる群より選択される、請求項 7 0 の単離精製ポリペプチド。

【請求項 7 2】

前記水酸化が、カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノンである、請求項 7 1 の単離精製酵素。

【請求項 7 3】

3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド) ; または 3 ケトデルタ 1 , 2 デルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 1 1 アルファ水酸化を触媒可能なポリペプチドをコードする単離精製核酸に、操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる、発現カセット。

【請求項 7 4】

前記ポリペプチドが、3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイドの 1 5 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 7 3 の発現カセット。

10

【請求項 7 5】

前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;
- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ;
- (d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D ;
- (e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン ;
- (f) 6 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ;
- (g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;
- (h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン ;
- (i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン ;
- (j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン ;
- (k) プロゲステロンから 1 1 アルファヒドロキシプロゲステロン ;
- (l) メクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトン ; および
- (m) メクスレノン 7 , 9 - ビスラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 7 , 9 - ビスラクトン

20

からなる群より選択される、請求項 7 3 または請求項 7 4 の発現カセット。

30

【請求項 7 6】

前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;
- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ; および
- (d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D

からなる群より選択される、請求項 7 5 の発現カセット。

【請求項 7 7】

前記水酸化が、カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノンである、請求項 7 6 の発現カセット。

40

【請求項 7 8】

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離精製核酸に、操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる、発現カセット。

【請求項 7 9】

前記核酸が配列番号 0 6 である、請求項 7 8 の発現カセット。

【請求項 8 0】

シトステロールからエブレレノンへの合成の代謝経路由来の酵素をコードする異種 D N A を含んでなる発現カセットであって、前記酵素が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;

50

- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ;
- (d) ADD (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ ADD ;
- (e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン ;
- (f) 6 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ;
- (g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;
- (h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン ;
- (i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン ;
- (j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン ;
- (k) プロゲステロンから 1 1 アルファヒドロキシプロゲステロン ;
- (l) メクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトン ; および
- (m) メクスレノン 7 , 9 - ビスラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 7 , 9 - ビスラクトン

10

からなる群より選択される、少なくとも 1 つの変換を触媒し、そして異種 DNA が、組換え宿主において、コードされる酵素を発現するのに必要な調節配列に、操作可能であるように連結されている、前記発現カセット。

【請求項 8 1】

異種 DNA コード配列が、以下の属および種：アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニダランス (*Aspergillus nidulans*)、リゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*)、リゾプス・ストロニファー (*Rhizopus stolonifer*)、ストレプトミセス・フラディエー (*Streptomyces fradiae*)、巨大菌 (*Bacillus megaterium*)、シュードモナス・クルシビエー (*Pseudomonas cruciviae*)、トリコテシウム・ロゼウム (*Trichothecium roseum*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、リゾプス・アーヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、アブシディア・コイルラ (*Absidia coerulea*)、アブシディア・グラウカ (*Absidia glauca*)、アクチノムコール・エレガンス (*Actinomucor elegans*)、アスペルギルス・フラビペス (*Aspergillus flavipes*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、ボーベリア・バシアナ (*Beauveria bassiana*)、ボトリオスフェーリア・オブツサ (*Botryosphaeria obtusa*)、カロネクトリア・デコラ (*Calonectria decorata*)、ケトミウム・コクリオデス (*Chaetomium cochliodes*)、コリネスボラ・カシコラ (*Corynespora cassiicola*)、カニングハメラ・ブラケスリーアナ (*Cunninghamella blakesleeana*)、カニングハメラ・エキヌラタ (*Cunninghamella echinulata*)、カニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*)、カーブラリア・クラバタ (*Curvularia clavata*)、カーブラリア・ルナタ (*Curvularia lunata*)、シリンドロカルポン・ラディシコラ (*Cylindrocarpum radicicola*)、エピコッカム・フミコラ (*Epicoccum humicola*)、ゴングロネラ・ブトレリ (*Gongronella butleri*)、ヒポミセス・クリソスペルマス (*Hypomyces chrysospermus*)、モノスポリウム・オリバセウム (*Monosporium olivaceum*)、モルティエレラ・イサベリナ (*Mortierella isabellina*)、ムコール・ムセド (*Mucor mucedo*)、ムコール・グリセオシアヌス (*Mucor griseocyanus*)、ミロテシウム・ベルカリヤ (*Myrothecium verrucaria*)、ノカルディア・コラリナ (*Nocardia corallina*)、パエシロミセス・カルネウス (*Paecilomyces*

20

30

40

50

carneus)、ペニシリウム・パツルム(Penicillium patulum)、
 ビトミセス・アトルーリバセウス(Pithomyces atroolivaceus)、
 ビトミセス・シノドンティス(Pithomyces cynodontis)、
 ピクノスポリウム種(Pycnosporium sp.)、サッカロポリスポラ・エリスレー(Saccharopolyspora erythrae)、セペドニウム・クリソスペルマム(Sepedonium chrysospermum)、スタキリディウム・ビコロール(Stachylidium bicolor)、ストレプトミセス・ヒクロスコピクス(Streptomyces hygroscopicus)、ストレプトミセス・パーブラセンズ(Streptomyces purpurascens)、
 シンセファラストラム・ラセモザム(Syncephalastrum racemosum)、
 タムノスティラム・ピリフォルメ(Thamnostylum piriforme)、
 シエラピア・テリコラ(Thielavia terricola)、およびバーティシリウム・テオブロメー(Verticillium theobromae)、
 セファロスポリウム・アフディコラ(Cephalosporium aphidicola)、
 コクリオボルス・ルナタス(Cochliobolus lunatas)、
 ティエグヘメラ・オルキディス(Tieghemella orchidis)、ティエグヘメラ・ヒアロスポラ(Tieghemella hyalospora)、
 モノスポリウム・オリバセウム、アスペルギルス・ウスツス(Aspergillus ustus)、
 フザリウム・グラミネアルム(Fusarium graminearum)、
 バーティシリウム・グラウカム(Verticillium glaucum)、およびリゾプス・ニグリカンス(Rhizopus nigricans)からなる群より選択されることで特徴付けられる、請求項80記載の発現カセット。

10

20

30

40

50

【請求項82】

属および種が、アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニダランス、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、ストレプトミセス・フラディエー、巨大菌、シュードモナス・クルシビエー、トリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム、リゾプス・アーヒズス、およびモノスポリウム・オリバセウムからなる群より選択される、請求項81記載の発現カセット。

【請求項83】

属種がアスペルギルス・オクラセウスである、請求項82記載の発現カセット。

【請求項84】

請求項80記載の少なくとも1つの発現カセットを含んでなる、組換え宿主細胞およびその子孫。

【請求項85】

宿主が微生物である、請求項84記載の組換え宿主細胞およびその子孫。

【請求項86】

宿主が細菌である、請求項85記載の組換え宿主細胞およびその子孫。

【請求項87】

シトステロールからエブレノンへの合成の代謝経路由来の1以上の酵素を作成する方法であって、異種DNAにコードされる1以上の酵素が発現され、そして集積する条件下、栄養培地中で、請求項86の組換え宿主細胞をインキュベーションすることを含んでなる、前記方法。

【請求項88】

化合物を水酸化産物に選択的に酸化する方法であって：(a)水酸化しようとする化合物を、該化合物が水酸化され、そして水酸化産物が集積する条件下、請求項86の組換え宿主細胞の存在下でインキュベーションし、そして(b)水酸化産物を回収する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項89】

in vitroで、化合物を水酸化産物に選択的に水酸化する方法であって：(a)水酸化しようとする化合物を、該化合物が水酸化され、そして水酸化産物が集積する条件下

、請求項 88 の方法で産生した酵素の存在下でインキュベーションし、そして (b) 水酸化産物を回収する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 90】

請求項 73 ～ 83 のいずれか 1 項の発現カセットを宿する宿主細胞。

【請求項 91】

前記発現カセットが、前記宿主細胞の染色体に組み込まれている、請求項 90 の宿主細胞。

【請求項 92】

前記発現カセットが発現ベクターに組み込まれている、請求項 90 の宿主細胞。

【請求項 93】

クローニングした 11 アルファ水酸化酵素の比活性を測定する方法であって；

(a) 前記 11 アルファ水酸化酵素をコードする核酸を含んでなる発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、

(b) 前記宿主細胞において、前記 11 アルファ水酸化酵素を発現し；

(c) 前記細胞から細胞成分膜分画を調製し、

(d) ステロイド基質と前記細胞成分膜分画ミクロソームをインキュベーションし、そして

(e) ステロイド基質の 11 アルファヒドロキシステロイド対応物への変換を監視する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 94】

酸化還元酵素をコードする発現ベクター核酸で宿主細胞を形質転換し、そして前記宿主細胞において、前記酸化還元酵素を発現することをさらに含んでなる、請求項 93 の方法。

【請求項 95】

前記酸化還元酵素がヒトまたはアスペルギルス・オクラセウスである、請求項 94 の方法。

【請求項 96】

前記酸化還元酵素がヒト酸化還元酵素である、請求項 95 の方法。

【請求項 97】

前記酸化還元酵素がアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である、請求項 95 の方法。

【請求項 98】

配列番号 2 に少なくとも 95 % 同一であり、そして 3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド； 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド； 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド；または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 11 アルファ水酸化を触媒し、前記水酸化が：

(a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；

(b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；

(c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；

(d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD

；

(e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン；

(f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン；

(g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン；

(h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン；

(i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン；

(j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン；

(k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン；

(l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン；および

(m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトン

10

20

30

40

50

からなる群より選択される、配列番号 2 を有するタンパク質およびその変異体。

【請求項 99】

3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイドの 15 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 98 のタンパク質。

【請求項 100】

アミノ酸配列が、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25 からなる群より選択される、精製ポリペプチド。

【請求項 101】

アミノ酸配列が配列番号 2 の少なくとも 10 の連続する残基を含んでなる、精製免疫原性ポリペプチド。 10

【請求項 102】

配列番号 2 に示すようなアミノ酸配列を有する 11 アルファ水酸化酵素に結合特異性を有する、単離精製抗体。

【請求項 103】

- (a) 配列番号 2 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 2 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ;
- (c) アミノ酸、配列番号 23 ;
- (d) アミノ酸、配列番号 24 ; および
- (e) アミノ酸、配列番号 25

20

からなる群より選択されるタンパク質領域に結合する、請求項 102 の抗体。

【請求項 104】

前記抗体がペプチドカラム上で精製され、前記ペプチドが :

- (a) 配列番号 2 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 2 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ;
- (c) アミノ酸、配列番号 23 ;
- (d) アミノ酸、配列番号 24 ; および
- (e) アミノ酸、配列番号 25

からなる群より選択される、請求項 102 または請求項 103 の抗体。

【請求項 105】

30

アミノ酸配列が配列番号 26 からなる群より選択される、精製ポリペプチド。

【請求項 106】

アミノ酸配列が配列番号 6 の少なくとも 10 の連続する残基を含んでなる、精製免疫原性ポリペプチド。

【請求項 107】

配列番号 6 に示すようなアミノ酸配列を有する 11 アルファ水酸化酵素に結合特異性を有する、単離精製抗体。

【請求項 108】

- (a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 6 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ; および
- (c) アミノ酸、配列番号 26

40

からなる群より選択されるタンパク質領域に結合する、請求項 107 の抗体。

【請求項 109】

前記抗体がペプチドカラム上で精製され、前記ペプチドが :

- (a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 6 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ; および
- (c) アミノ酸、配列番号 26

からなる群より選択される、請求項 107 または請求項 108 の抗体。

【請求項 110】

請求項 102、103、104、107、108、または 109 の抗体、および有効なキ 50

ャリアー、ビヒクル、または補助剤を含んでなる組成物。

【請求項 1 1 1】

請求項 1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 7、1 0 8、または 1 0 9 の抗体および溶液を含んでなる組成物。

【請求項 1 1 2】

ポリクローナル抗体である、請求項 1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 7、1 0 8、または 1 0 9 の抗体。

【請求項 1 1 3】

モノクローナル抗体である、請求項 1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 7、1 0 8、または 1 0 9 の抗体。

10

【請求項 1 1 4】

免疫親和性マトリックスにコンジュゲート化した、請求項 1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 7、1 0 8、または 1 0 9 の抗体。

【請求項 1 1 5】

請求項 1 1 4 の免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法。

【請求項 1 1 6】

前記免疫親和性マトリックスが S E P H A R O S E 4 B である、請求項 1 1 4 の抗体。

【請求項 1 1 7】

請求項 1 1 6 の免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法。

20

【請求項 1 1 8】

ペプチドカラムを用いて抗体を精製する方法であって、前記ペプチドが：

- (a) 配列番号 2 の N 末端アミノ酸 1 - 1 0 ；
- (b) 配列番号 2 の最後の 1 0 の C 末端アミノ酸 ；
- (c) アミノ酸、配列番号 2 3 ；
- (d) アミノ酸、配列番号 2 4 ；および
- (e) アミノ酸、配列番号 2 5

からなる群より選択される、前記方法。

【請求項 1 1 9】

30

ペプチドカラムを用いて抗体を精製する方法であって、前記ペプチドが：

- (a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 1 0 ；
- (b) 配列番号 6 の最後の 1 0 の C 末端アミノ酸 ；および
- (c) アミノ酸、配列番号 2 6

からなる群より選択される、前記方法。

【請求項 1 2 0】

生物学的液体において、第一のポリペプチドを検出する方法であって、前記の第一のポリペプチドが 1 1 アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素からなる群より選択され、以下の：

- (a) 前記液体を、前記の第一のポリペプチドに結合特異性を有する第二のポリペプチドと接触させ、そして
- (b) 前記の第二のポリペプチドの存在をアッセイして、前記の第一のポリペプチドのレベルを決定する

40

工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 1 2 1】

前記の第二のポリペプチドが抗体である、請求項 1 2 0 の方法。

【請求項 1 2 2】

前記の第二のポリペプチドが放射標識されている、請求項 1 2 0 または請求項 1 2 1 の方法。

【請求項 1 2 3】

50

6 × S S C および 6 5 中で、配列番号 1 をゲノム D N A にハイブリダイズさせ、そして配列番号 1 で検出した核酸を単離することを含んでなる、単離核酸を産生する方法。

【請求項 1 2 4】

請求項 1 2 3 の方法にしたがって調製した、単離 D N A 核酸。

【請求項 1 2 5】

配列番号 1 に示す配列の相補体に、非常にストリンジェントな条件下で、特異的にハイブリダイズする、単離核酸。

【請求項 1 2 3】

6 × S S C および 6 5 中で、配列番号 5 をゲノム D N A にハイブリダイズさせ、そして配列番号 5 で検出した核酸を単離することを含んでなる、単離核酸を産生する方法。

10

【請求項 1 2 4】

請求項 1 2 3 の方法にしたがって調製した、単離 D N A 核酸。

【請求項 1 2 5】

配列番号 5 に示す配列の相補体に、非常にストリンジェントな条件下で、特異的にハイブリダイズする、単離核酸。

【請求項 1 2 6】

細胞の染色体 D N A に挿入した際、通常は細胞で発現されないステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素遺伝子の発現を改変する、D N A 構築物であって：

a) ターゲティング配列；

b) 制御配列；および

c) ステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素の構造遺伝子

を含んでなる、前記 D N A 構築物。

20

【請求項 1 2 7】

請求項 1 2 6 の D N A 構築物を宿する宿主細胞。

【請求項 1 2 8】

心臓疾患、炎症、関節炎、または癌を治療する、療法適用の医薬品製造のための、クローニングした 1 1 アルファ水酸化酵素を宿する宿主細胞の使用。

【請求項 1 2 9】

約 0 . 5 - 5 0 0 g / l 糖蜜 (m o l a s s e s)、0 . 5 - 5 0 g / l トウモロコシ浸染 (c o r n s t e e p) 液、0 . 5 - 5 0 g / l $K H_2 P O_4$ 、2 . 5 - 2 5 0 g / l $N a C l$ 、2 . 5 - 2 5 0 g / l グルコース、および 0 . 0 4 - 4 g / l プロゲステロン、p H 3 . 5 - 7 を含んでなる組成物。

30

【請求項 1 3 0】

約 1 0 - 2 5 0 g / l 糖蜜、1 - 2 5 g / l トウモロコシ浸染液、1 - 2 5 g / l $K H_2 P O_4$ 、5 - 1 2 5 g / l $N a C l$ 、5 - 1 2 5 g / l グルコース、および 0 . 0 8 - 2 g / l プロゲステロン、p H 4 . 5 - 6 . 5 を含んでなる組成物。

【請求項 1 3 1】

約 2 5 - 1 0 0 g / l 糖蜜、2 . 5 - 1 0 g / l トウモロコシ浸染液、2 . 5 - 1 0 g / l $K H_2 P O_4$ 、1 2 . 5 - 5 0 g / l $N a C l$ 、1 2 . 5 - 5 0 g / l グルコース、および 0 . 2 - 0 . 8 g / l プロゲステロン、p H 5 . 5 - 6 . 0 を含んでなる組成物。

40

【請求項 1 3 2】

5 0 g / l 糖蜜、5 g / l トウモロコシ浸染液、5 g / l $K H_2 P O_4$ 、2 5 g / l $N a C l$ 、2 5 g / l グルコース、2 0 g / l 寒天、および 0 . 4 g / l プロゲステロン、p H 5 . 8 を含んでなる組成物。

【請求項 1 3 3】

約 4 - 1 0 0 g / l 寒天をさらに含んでなる、請求項 1 2 9 ~ 1 3 2 のいずれか 1 項の組成物。

【請求項 1 3 4】

約 1 0 - 4 0 g / l 寒天をさらに含んでなる、請求項 1 2 9 ~ 1 3 2 のいずれか 1 項の組成物。

50

【請求項 135】

約 20 g / l 寒天をさらに含んでなる、請求項 129 ~ 132 のいずれか 1 項の組成物。

【請求項 136】

アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニダランス、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、およびトリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム、リゾプス・アーヒズス、モノスポリウム・オリバセウム、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、およびアブシディア・コイルラからなる群より選択される微生物から胞子を産生する、請求項 129 ~ 135 のいずれか 1 項の組成物の使用。

【請求項 136】

アスペルギルス・オクラセウスから胞子を産生する、請求項 129 ~ 135 のいずれか 1 項の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

優先権

本出願は、米国特許法 § 119 に基づいて、米国仮出願第 60 / 244 , 300 号、2000 年 10 月 30 日出願の優先権を請求する。

【0002】

発明の分野

本発明は、アスペルギルス・オクラセウス (*Aspergillus ochraceus*) 胞子の mRNA から生成した cDNA ライブラリーより単離した、新規チトクロム P450 様酵素 (アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素) および酸化還元酵素 (アスペルギルス・オクラセウス 酸化還元酵素) に関する。11 アルファ水酸化酵素をコードする cDNA を、電子供与体としてヒト酸化還元酵素をコードする cDNA と、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf-9) 昆虫細胞で同時発現すると、該水酸化酵素は、HPLC 解析で測定されるように、ステロイド基質 4 - アンドロステン - 3 , 17 - ジオン (AD) から 11 アルファ - ヒドロキシ - AD への変換を触媒するのに成功した。本発明はまた、相補体、相同体 (homologue) および断片を含む、これらの cDNA に関連するか、またはこれらに由来する核酸分子、並びにこれらの核酸分子を用いて、例えばそのポリペプチドおよび断片を生成する方法にも関する。本発明はまた、A . オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素を認識する抗体の生成、並びにこれらの抗体を用いて、それぞれ非修飾および形質転換宿主細胞内の、これらの天然および組換えポリペプチドの存在を検出する方法にも関する。本発明はまた、異種宿主細胞において、ヒトまたはアスペルギルス 酸化還元酵素と別個に、または該酵素と組み合わせて、アスペルギルス 11 アルファ水酸化酵素遺伝子を発現して、ステロイド基質の 11 アルファヒドロキシ対応物への生物変換を促進する方法も提供する。

【0003】

発明の背景

微生物変換または生物変換反応は、非常に多様な薬剤製品の化学合成を促進するのに、長く使用されてきている。穏やかな酵素条件下で行う立体特異的反応は、しばしば、望ましくない副産物を生じる、同等の化学法に勝る利点を提供する。微生物はまた、基質分子に対して、同時に独立した、または連続する反応を行う能力も有し、合成における別個の工程数を最小限にし、そして望ましい中間産物および最終産物の総コストを減少させる。

【0004】

有機化合物の変換に、生体触媒として用いられる微生物系の一般的な特徴が概説されている (例えば Goodhue , Charles T . , Microb . Transf orm . Bioact . Compd . , 1 : 9 - 44 , 1982 を参照されたい)。生物変換は、例えば、連続培養またはバッチ培養中で行うことが可能である。微生物から分泌させた酵素を基質と反応させ、そして産物を培地から回収することが可能である

。基質が能動または受動拡散過程によって細胞に進入可能であるならば、細胞内酵素もまた、基質と反応することが可能である。固定、乾燥、透過性、および休止細胞、並びに孢子もまた、微生物変換に用いられてきている。細胞抽出物および溶液中の精製酵素、またはキャリアー上に固定されたものの使用は、最終的に、伝統的な発酵法に勝る、かなりのコストまたは管理上の利点を提供する可能性がある。

【0005】

生物変換反応は、ステロイドの分野で広く用いられてきている (Kieslich, K. ; Sebek, O.K. Annu. Rep. Ferment. Processes 3:275-304, 1979; Kieslich, Klaus. Econ. Microbiol., 5 (Microb. Enzymes Biocnvers.) :369-465, 1980)。水酸化、エポキシ化、酸化、脱水素、環および側鎖分解、還元、加水分解、および異性化反応を含む、多様な反応が性質決定されてきている。例えば、アクレモニウム属 (Acremonium)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、リゾプス属 (Rhizopus)、フザリウム属 (Fusarium)、ペニシリウム属 (Penicillium)、ストレプトミセス属 (Streptomyces)、放線菌属 (Actinomyces)、ノカルディア属 (Nocardia)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、ミコバクテリウム属 (Mycobacterium)、アルスロバクター属 (Arthrobacter) およびバチルス属 (Bacillus) のように広い種を含む、多様な種類の微生物もまた用いられてきている。

10

20

【0006】

商業的に重要なステロイド化合物の合成で用いる中間産物の水酸化を促進するのに、多様なアプローチが用いられてきている。米国特許第4,588,683号は、例えば、11ベータ水酸化を達成可能なカーブularia属 (Curvularia) の真菌培養を含んでなる培地中で、基質化合物をインキュベーションすることによって、11ベータ、17アルファ、20,21テトラヒドロキシステロイドを調製する方法を記載する。アスペルギルス・オクラセウス培養および菌糸体の調製はまた、プロゲステロンおよび他のステロイドを、対応する11アルファヒドロキシ型に変換するのにも用いられてきている (Tan, L. および Falardeau, P., 1970; Tan L., および Falardeau P., J. Steroid Biochem. 1:221-227, 1970; Samanta, T.B.ら, Biochem. J. 176, 593-594, 1978; Jayanthi, C.R.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 106:1262-1268, 1982)。

30

【0007】

非常に多様な障害の治療のため、ステロイドの新規のそして拡大された臨床的使用が出現したことで、商業規模でのステロイド化合物およびその中間産物の改善された産生法に関する必要性が生まれた。米国特許第4,559,332号は、例えば、エプレレノン、メチル水素9,11 α -エポキシ-17 α -ヒドロキシ-3-オキソプレゲン-4-エン-7 α ,21-ジカルボキシレート, γ ラクトン (エプレレノンまたはエポキシメクスレノンとも称される) および関連化合物の調製法を含む、ステロイド化合物の一連の20-スピロキサンの調製法をいくつか記載する。WO 98/25948 および米国出願09/319,673は、9,11-エポキシステロイド化合物の新規調製法、特に一連の20-スピロキサンおよびその類似体のもの、ステロイド化合物の調製に有用な新規中間産物、並びにこうした新規中間産物の調製法を記載する。米国特許第6,046,023号は、10g/lより高い濃度で、97%未満でそして90%を超える純度を有するステロイド基質を用い、アスペルギルス属、リゾプス属、およびペステロティア属 (Pestelotia) の微生物を用いて、カンレノンまたはエストル-4-エン-3,17-ジオンを11 α -ヒドロキシ類似体に微生物変換するための改善法を開示する。

40

【0008】

50

特定のステロイド中間産物の生物変換を最適にするのに必要な、多くの現代の系統的なアプローチは、しばしば、合成および分解に関与する酵素の生化学的な知識が不十分であるため、妨害されている。真核チトクロム P 450 は、小胞体 (ER) またはミトコンドリア膜と結合しているようである。ER 結合チトクロム P 450 酵素の電子供与体は、しばしば、FAD/FMN 依存 NADPH - チトクロム P 450 酸化還元酵素である。ミトコンドリアチトクロム P 450 における電子伝達は、通常、NADPH - フェレドキシン酸化還元酵素およびフェレドキシンによって仲介される。哺乳動物ステロイド生成に関与することが知られる特定の電子供与体はまた、それぞれ、アドレノドキシ還元酵素およびアドレノドキシと呼ばれる。

【0009】

真菌生物変換は、チトクロム P 450 酵素に仲介されることが知られるが、これらの酵素の多くは、酵素的に活性である型で精製するのが極端に困難である (van den Brink ら, *Fungal Genetics and Biology* 23, 1-17, 1998)。多くの真菌 P 450 酵素は、小胞体と結合しているようである (van den Brink ら, *Fungal Genetics and Biology* 23, 1-17, 1998)。酵母は、*in vitro* で、哺乳動物 11 ベータ水酸化酵素とカップリングすることが示されたアドレノドキシ還元酵素相同体を有する (Lacour ら, *Journal of Biological Chemistry* 273, 23984-23992, 1998)。対照的に、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素とカップリングする電子供与体は、NADPH - チトクロム P 450 酸化還元酵素であると予測された (Samanta および Ghosh, *J Steroid Biochem* 28, 327-32, 1987)。リゾプス・ニグリカンス (*Rhizopus nigricans*) におけるステロイド 11 アルファ水酸化複合体もまた、NADPH - チトクロム P 450 酸化還元酵素を必要とするようである (Makovec および Breskvar, *Arch Biochem Biophys* 357, 310-6, 1998)。プロゲステロン誘導真菌菌系体の調製における、チトクロム R・ニグリカンス P 450 および NADPH - チトクロム P 450 還元酵素活性の増幅は、両酵素の生化学的性質決定を容易にすることが可能である (Makovec および Breskvar, *Pflugers Arch-Eur J. Physiol* 439 (Suppl): R111-R112, 2000)。

【0010】

アスペルギルス・オクラセウス胞子は、プロゲステロンなどのステロイド基質の 11 アルファ水酸化を触媒することが示されている (Dutta TK, Datta J, Samanta TB, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 119-123, 1993)。A. フミガツス (*A. fumigatus*) もまた、ステロイド 11 アルファ水酸化酵素活性を示すことが知られる (Smith ら, *J Steroid Biochem Mol Biol* 49: 93-100, 1994)。A. フミガツス酵素は、非誘導性であるらしい A. オクラセウス水酸化酵素と異なり、11 アルファおよび 15 ベータ水酸化に二重の部位特異性を持つチトクロム P 450 であるらしい点で、A. オクラセウス酵素と区別される。

【0011】

配列決定技術の最近の進歩にもかかわらず、ヌクレオチド配列データから拾い集めた真菌チトクロム P 450 の構造的関係に関する詳細な知識は、初歩的なままである。Breskvar ら (*Biochem. Biophys. Res. Commun* 1991; 178, 1078-1083, 1991) は、プロゲステロンの 11 α 水酸化酵素をコードする、リゾプス・ニグリカンス由来の推定上の P - 450 のゲノム DNA 配列を記載している。しかし、この配列は、予測されるアミノ酸配列が、ほぼすべての既知のチトクロム P - 450 酵素に共通の標準的なヘム結合モチーフ FxxGxxxCG を欠くため、完全でない可能性がある (Nelson ら, *Pharmacogenetics* 6: 1-42, 1996)。

10

20

30

40

50

【0012】

クロコウジカビのNADPHチトクロムP450酸化還元酵素(cprA)遺伝子のクローニングおよび性質決定が記載されてきている(van den Brink, J.ら、Genbank寄託番号Z26938、CAA81550、1993、未公表)。サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)NADPH-チトクロムP450還元酵素の一次構造もまた、クローニングされた遺伝子のヌクレオチド配列から推定されてきている(Yabusakiら, J. Biochem. 103(6):1004-1010, 1988)。

【0013】

ステロイド酵素のクローニングおよび解析を容易にするのに、いくつかの他のアプローチが用いられてきている。例えば、米国特許第5,422,262号、第5,679,521号、および欧州特許第EP 0 528 906 B1号は、2型ステロイド5アルファ還元酵素の発現クローニングを記載する。米国特許第5,869,283号は、例えば、コレステロールのプレグネノロンへの変換；プレグネノロンのプロゲステロンへの変換；プロゲステロンの17 α -ヒドロキシ-プロゲステロンへの変換；17 α -ヒドロキシプロゲステロンのコルテキソロンへの変換；およびコルテキソロンのヒドロコルチゾンへの変換を含む、コレステロールのヒドロコルチゾンへの変換に関与する酸化工程を各々触媒する、2以上の酵素をコードする異種DNAを含んでなる発現カセットを記載する。

【0014】

アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素およびA.オクラセウス酸化還元酵素の配列は報告されてきていない。その配列に関する知識は、宿主株が部分的にしか性質決定されていないか、またはステロイド生成に関与する酵素の理解が不完全であることに関連する問題を伴わず、ステロイド中間産物のより効率的な生物変換および最終産物の商業規模での合成を実行可能な、発現ベクターおよび組換え宿主株の開発を非常に促進することが可能である。本発明は、ステロイドの11アルファ水酸化を実行可能な酵素を同定することによって、上に論じる限界の多くを克服する。このアプローチは、11アルファ水酸化の使用を非常に促進するだけでなく、他の真菌由来の類似酵素同定のための新規戦略の開発、アスペルギルス・オクラセウスおよび他の微生物由来の、ステロイド生成に関与する他の酵素のクローニング、並びに改善宿主株、あるいは生物変換反応において、遊離細胞または固定細胞または酵素を用いた改善法の開発も可能にする。類似のアプローチもまた、現在、大規模バイオリアクターにおける生物変換に通常用いられる野生型微生物より、増殖および管理がしやすい、発現ベクターおよび組換え宿主株の構築を補助するために、開発可能である。

【0015】

発明の概要

最も広い側面において、本発明は、ステロイド代謝に関与する酵素をクローニングする方法、並びに新規ステロイド中間産物および最終産物を産生するためのこれらの酵素の使用を提供する。請求する本発明の1つの側面は、新規酵素11アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素、並びにその核酸、タンパク質、ペプチド、断片、および相同体を提供することである。本発明はまた、ステロイド代謝に関与する他の酵素を同定し、そしてクローニングする方法にも関する。本発明はまた、新規ベクターおよび宿主細胞、上記ベクターを用いることによって異種タンパク質を作成する新規方法、並びにクローニングした酵素の基質特異性を同定する方法も含む。

【0016】

本発明は、クローニングした11アルファ水酸化酵素、その対立遺伝子変異体(variant)、突然変異タンパク質(mut ein)、および融合タンパク質の基質特異性を決定し、3ケトデルタ4,5ステロイド(3ケトデルタ4ステロイド)；3ケトデルタ4,5デルタ6,7ステロイド(3ケトデルタ4デルタ6ステロイド)；3ケトデルタ6,7ステロイド(3ケトデルタ6ステロイド)；または3ケトデルタ1,2デルタ4,5ステロイド(3ケトデルタ1デルタ4ステロイド)を含む、多数のステロイド基質の評価を

10

20

30

40

50

可能にする手段を提供する。試験のため好ましい基質には (a) カンレノン; (b) アンドロステンジオン; (c) アルドナ (aldona); (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン); (e) メクスレノン; (f) 6 ベータメクスレノン; (g) 9 アルファメクスレノン; (h) 12 ベータメクスレノン; (i) デルタ 12 メクスレノン; (j) テストステロン; (k) プロゲステロン; (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン; および (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンが含まれる。好ましくは、クローニングした 11 アルファ水酸化酵素、その対立遺伝子変異体、突然変異タンパク質、および融合タンパク質は、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドからなる群より選択される基質の、15 アルファまたはベータ水酸化、6 アルファまたはベータ水酸化、7 アルファまたはベータ水酸化、9 アルファまたはベータ水酸化、12 アルファまたはベータ水酸化、および 17 アルファまたはベータ水酸化からなる群より選択される第二の水酸化もまた触媒することはない。最も好ましくは、クローニングした 11 アルファ水酸化酵素、その対立遺伝子変異体、突然変異タンパク質、および融合タンパク質は、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドからなる群より選択される基質の 15 ベータ水酸化を触媒しない。

10

【0017】

本発明は、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする単離精製核酸を提供する。本発明はまた、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする単離 DNA、cDNA、遺伝子、および遺伝子の対立遺伝子もまた提供する。好ましくは、単離精製核酸は配列番号 01 に示すとおりである。好ましくは、単離 DNA、cDNA、遺伝子、および遺伝子の対立遺伝子は、配列番号 01 に示すとおりである。

20

【0018】

本発明は、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列を有する単離タンパク質を提供する。本発明はまた、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素の単離変異体 (variant)、およびこの水酸化酵素を含んでなる融合タンパク質もまた提供する。好ましくは、該タンパク質は配列番号 2 に示すとおりである。本発明はまた、配列番号 2 に示すタンパク質の変異体; 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を持つ配列番号 2 を含んでなるポリペプチド; 配列番号 2 に少なくとも 99%、95%、90%、75%、および 50% 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドも提供する。

30

【0019】

本発明は、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ酸化還元酵素をコードする単離精製核酸を提供する。本発明はまた、アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離 DNA、cDNA、遺伝子、および遺伝子の対立遺伝子も提供する。好ましくは、単離精製核酸は配列番号 5 に示すとおりである。本発明はまた、配列番号 5 に示す単離 DNA、cDNA、遺伝子、および遺伝子の単離対立遺伝子も提供する。

【0020】

本発明は、アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を有する単離タンパク質を提供する。本発明はまた、アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を有するタンパク質の単離変異体、およびアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質も提供する。好ましくは、単離タンパク質は配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有する。本発明はまた、配列番号 6 に示すタンパク質の単離変異体; アミノ酸配列が、少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を持つ配列番号 6 を含んでなる、精製ポリペプチド; およびアミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 99%、95%、90%、75%、および 50% 同一であるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドもまた提供する。

40

【0021】

本発明は、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド); 3 ケトデルタ

50

4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド); 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド); または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 1 1 アルファ水酸化を触媒可能な酵素をコードする、単離精製核酸を提供する。好ましくは、該酵素は、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドの 1 5 ベータ水酸化を触媒しない。より好ましくは、該水酸化は: (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン; (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン; (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ; (d) A D D (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D; (e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン; (f) 6 ベータ 10
メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン; (g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン; (h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン; (i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン; (j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン; (k) プロゲステロンから 1 1 アルファヒドロキシプロゲステロン; (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン; および (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトンからなる群より選択される。より好ましくは、該水酸化は: (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン; (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン; (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ; および (d) A D D (1, 4
20 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D からなる群より選択される。最も好ましくは、該水酸化は、カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノンである。

【0022】

本発明はまた、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 1 1 アルファ水酸化を触媒可能なタンパク質を発現する方法であって; (a) 前記タンパク質をコードする核酸に操作可能であるように (o p e r a b l y) 連結したプロモーターを含んでなる発現カセットで宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションし、
30
そして (b) 前記宿主細胞において、前記タンパク質を発現することを含んでなる、前記方法も提供する。本発明はまた、前記タンパク質を回収する工程をさらに含んでなる、タンパク質産生法も提供する。好ましくは、このタンパク質はアスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素である。より好ましくは、この方法は、電子供与体タンパク質を発現することをさらに含んでなり、前記電子供与体タンパク質は、3 ケトデルタ 4, 5
40 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 1 1 アルファ水酸化を触媒可能な前記タンパク質に、電子を供与することが可能である。好ましくは、電子供与体タンパク質は、ヒト酸化還元酵素およびアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素からなる群より選択される。より好ましくは、電子供与体タンパク質はアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である。より好ましくは、前記ステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素および前記電子供与体タンパク質をコードする核酸は、別個の発現カセット上にある。より好ましくは、前記ステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素および前記電子供与体タンパク質をコードする核酸は、同一発現カセット上にある。さらにより好ましくは、ステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素はアスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素であり、そして前記電子供与体タンパク質はヒト酸化還元酵素である。さらにより好ましくは、ステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素はアスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素であり、そして前記電子供与体タンパク質はアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である。好ましくは、発現カセットは発現ベクター上にある。より好ましくは、発現ベクターはバキュロウイルスである。さらにより好ましくは、バキュロウイルスは、オートグラフ
50

ア・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多核体病ウイルスおよびカイコガ (*Bombyx mori*) 核多核体病ウイルスからなる群より選択される、核多核体病ウイルスである。最も好ましくは、核多核体病ウイルスはオートグラファ・カリフォルニカ核多核体病ウイルスである。好ましくは、宿主細胞は昆虫細胞である。より好ましくは、昆虫細胞はスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*)、トリコプルシア・ニ (*Trichoplusia ni*)、オートグラファ・カリフォルニカ、およびマンデュカ・セクスタ (*Manduca sexta*) 細胞からなる群より選択される。最も好ましくは、昆虫細胞はスポドプテラ・フルギペルダ細胞である。本発明はまた、アスベルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素が配列番号 2 であり；ヒト酸化還元酵素が配列番号 4 であり；そしてアスベルギルス・オクラセウス酸化還元酵素が配列番号 6 である、タンパク質発現法も提供する。

10

【0023】

本発明はまた、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド)；3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド)；3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド)；または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 11 アルファ水酸化を触媒可能である、単離精製ポリペプチドも提供する。好ましくは、該ポリペプチドは、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド；3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド；または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドの 15 ベータ水酸化を触媒しない。より好ましくは、該水酸化は：(a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；(b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；(c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；(d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD；(e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン；(f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン；(g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン；(h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン；(i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン；(j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン；(k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン；(l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン；および (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトンからなる群より選択される。より好ましくは、該水酸化は：(a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；(b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；(c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；および (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD からなる群より選択される。最も好ましくは、該水酸化は、カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノンである。

20

30

【0024】

本発明はまた、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド)；3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド)；3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド)；または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 11 アルファ水酸化を触媒可能なポリペプチドをコードする単離精製核酸に、操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる、発現カセットも提供する。より好ましくは、該水酸化は：(a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；(b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；(c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；(d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD；(e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン；(f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン；(g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン；(h) 12 ベータメクス

40

50

レノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン; (i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン; (j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン; (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン; (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン; および (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトンからなる群より選択される。より好ましくは、該水酸化は: (a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン; (b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン; (c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ; および (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD からなる群より選択される。最も好ましくは、該水酸化は、カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノンである。

10

【0025】

本発明はまた、アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離精製核酸に、操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる、発現カセットも提供する。好ましくは、該核酸は配列番号 6 である。

【0026】

本発明はまた、シトステロールからエブレレノンへの合成の代謝経路由来の酵素をコードする異種 DNA を含んでなる発現カセットであって、前記酵素が: (a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン; (b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン; (c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ; (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD; (e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン; (f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン; (g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン; (h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン; (i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン; (j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン; および (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン; (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン; および (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトンからなる群より選択される、少なくとも 1 つの変換を触媒し、そして異種 DNA が、組換え宿主において、コードされる酵素を発現するのに必要な調節配列に、操作可能であるように連結されている、前記発現カセットも提供する。好ましくは、発現カセット中の異種 DNA コード配列は、以下の属および種: アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニダランス (*Aspergillus nidulans*)、リゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*)、リゾプス・ストロニファー (*Rhizopus stolonifer*)、ストレプトミセス・フラディエー (*Streptomyces fradiae*)、巨大菌 (*Bacillus megaterium*)、シュードモナス・クルシビエー (*Pseudomonas cruciviae*)、トリコテシウム・ロゼウム (*Trichothecium roseum*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、リゾプス・アーヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、アブシディア・コイルラ (*Absidia coerulea*)、アブシディア・グラウカ (*Absidia glauca*)、アクチノムコール・エレガンス (*Actinomucor elegans*)、アスペルギルス・フラビペス (*Aspergillus flavipes*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、ボーベリア・バシアナ (*Beauveria bassiana*)、ボトリオスフェーリア・オブツサ (*Botryosphaeria obtusa*)、カロネクトリア・デコラ (*Calonectria decora*)、ケトミウム・コクリ

20

30

40

50

オデス (*Chaetomium cochliodes*)、コリネスポラ・カシコラ (*Corynespora cassiicola*)、カニングハメラ・ブラケスリーアナ (*Cunninghamella blakesleeana*)、カニングハメラ・エキヌラタ (*Cunninghamella echinulata*)、カニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*)、カーブラリア・クラバタ (*Curvularia clavata*)、カーブラリア・ルナタ (*Curvularia lunata*)、シリンドロカルボン・ラディシコラ (*Cylindrocarpum radicicola*)、エピコッカム・フミコラ (*Epicoccum humicola*)、ゴングロネラ・ブトレリ (*Gongronella butleri*)、ヒボミケス・クリソスペルマス (*Hypomyces chrysospermus*)、モノスポリウム・オリバセウム (*Monosporium olivaceum*)、モルティエラ・イサベリナ (*Mortierella isabellina*)、ムコール・ムセド (*Mucor mucedo*)、ムコール・グリセオシアヌス (*Mucor griseocyaneus*)、ミロテシウム・ベルカリア (*Myrothecium verrucaria*)、ノカルディア・コラリナ (*Nocardia corallina*)、パエシロミセス・カルネウス (*Paecilomyces carneus*)、ペニシリウム・パツルム (*Penicillium patulum*)、ピトミセス・アトルーリバセウス (*Pithomyces atrolivaceus*)、ピトミセス・シノドンティス (*Pithomyces cynodontis*)、ピクノスポリウム種 (*Pycnosporium* sp.)、サッカロポリスपोラ・エリスレー (*Saccharopolyspora erythrae*)、セベドニウム・クリソスペルマム (*Sepeodonium chrysospermum*)、スタキリディウム・ビコロル (*Stachylidium bicolor*)、ストレプトミセス・ヒクロスコピクス (*Streptomyces hygroscopicus*)、ストレプトミセス・パーブラセン (*Streptomyces purpurascens*)、シンセファラストラム・ラセモザム (*Syncephalastrum racemosum*)、タムノスティルム・ピリフォルム (*Thamnostylum piriforme*)、シエラビア・テリコラ (*Thielavia terricola*)、およびパーティシリウム・テオブロマー (*Verticillium theobromae*)、セファロスポリウム・アフィディコラ (*Cephalosporium aphidicola*)、コクリオボルス・ルナタ (*Cochliobolus lunatas*)、ティエグヘメラ・オルキディス (*Tieghemella orchidis*)、ティエグヘメラ・ヒアロスポラ (*Tieghemella hyalospora*)、モノスポリウム・オリバセウム、アスペルギルス・ウスツス (*Aspergillus ustus*)、フザリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、パーティシリウム・グラウクム (*Verticillium glaucum*)、およびリゾプス・ニグリカンスからなる群より選択される。より好ましくは、属および種は、アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニダランス、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、ストレプトミセス・フラディエー、巨大菌、シュードモナス・クルシビエー、トリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム、リゾプス・アーヒズス、およびモノスポリウム・オリバセウムからなる群より選択される。最も好ましくは、属および種はアスペルギルス・オクラセウスである。

【0027】

好ましくは、組換え宿主細胞およびその子孫は、少なくとも1つの発現カセットを含んでなる。より好ましくは、宿主は微生物である。最も好ましくは、宿主は細菌である。本発明はまた、システロールからエブレノンへの変換の代謝経路由来の1以上の酵素を作成する方法であって、異種DNAにコードされる1以上の酵素が発現され、そして集積する条件下、栄養培地中で、組換え宿主細胞をインキュベーションすることを含んでなる、前記方法も提供する。より好ましくは、該方法は：(a) 水酸化しようとする化合物を、該化合物が水酸化され、そして水酸化産物が集積する条件下、組換え宿主細胞の存在下で

インキュベーションし、そして (b) 水酸化産物を回収する工程を含んでなる。最も好ましくは、該方法は：(a) 酸化しようとする化合物を、該化合物が水酸化され、そして水酸化産物が集積する条件下、産生した酵素の存在下でインキュベーションし、そして (b) 水酸化産物を回収する工程を含んでなる。本発明はまた、発現カセットを宿する宿主細胞も提供する。より好ましくは、該発現カセットは、前記宿主細胞の染色体に組み込まれている。より好ましくは、該発現カセットは発現ベクターに組み込まれている。

【0028】

本発明はまた、クローニングした 11 アルファ水酸化酵素の比活性を測定する方法であって；(a) 前記 11 アルファ水酸化酵素をコードする核酸を含んでなる発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、(b) 前記宿主細胞において、前記 11 アルファ水酸化酵素を発現し；(c) 前記細胞から細胞成分膜分画を調製し、(d) ステロイド基質と前記細胞成分膜分画をインキュベーションし、そして (e) ステロイド基質の 11 アルファヒドロキシステロイド対応物への変換を監視する工程を含んでなる、前記方法も提供する。好ましくは、さらなるものは、酸化還元酵素をコードする発現ベクター核酸で宿主細胞を形質転換し、そして前記宿主細胞において、前記酸化還元酵素を発現することを含んでなる。より好ましくは、該酸化還元酵素はヒトまたはアスペルギルス・オクラセウスである。最も好ましくは、該酸化還元酵素はヒト酸化還元酵素である。最も好ましくは、該酸化還元酵素はアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である。

10

【0029】

本発明はまた、配列番号 2 に少なくとも 95% 同一であり、そして 3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド；3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド；3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド；または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 11 アルファ水酸化を触媒し、前記水酸化が：(a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；(b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；(c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；(d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD；(e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン；(f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン；(g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン；(h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン；(i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン；(j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン；および (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロンからなる群より選択される、配列番号 2 を有するタンパク質およびその変異体も提供する。好ましくは、該酵素は、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド；3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド；または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドの 15 ベータ水酸化を触媒しない。

20

30

【0030】

本発明は、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド)；3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド)；3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド)；または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 11 アルファ水酸化を触媒可能であり、該水酸化が：(a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；(b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；(c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；(d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD；(e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン；(f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン；(g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン；(h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン；(i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン；(j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン；および (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロンからなる群より選択される、酵素

40

50

をコードする単離精製核酸も提供する。好ましくは、該酵素は、3ケトデルタ4,5ステロイド;3ケトデルタ4,5デルタ6,7ステロイド;または3ケトデルタ6,7ステロイドの15ベータ水酸化を触媒しない。

【0031】

本発明はまた、アミノ酸配列が、配列番号23、配列番号24、配列番号25からなる群より選択される、精製ポリペプチドも提供する。

【0032】

本発明は、アミノ酸配列が配列番号2の少なくとも10の連続する残基を含んでなる、精製免疫原性ポリペプチドを提供する。

【0033】

本発明は、配列番号2に示すようなアミノ酸配列を有する11アルファ水酸化酵素に結合特異性を有する、単離精製抗体を提供する。好ましくは、該抗体は、(a)配列番号2のN末端アミノ酸1-10;(b)配列番号2の最後の10のC末端アミノ酸;(c)アミノ酸、配列番号23;(d)アミノ酸、配列番号24;および(e)アミノ酸、配列番号25からなる群より選択されるタンパク質領域に結合する。好ましくは、該抗体はペプチドカラム上で精製され、前記ペプチドは:(a)配列番号2のN末端アミノ酸1-10;(b)配列番号2の最後の10のC末端アミノ酸;(c)アミノ酸、配列番号23;(d)アミノ酸、配列番号24;および(e)アミノ酸、配列番号25からなる群より選択される。

10

【0034】

本発明はまた、アミノ酸配列が配列番号26からなる群より選択される、精製ポリペプチドも提供する。

20

【0035】

本発明はまた、アミノ酸配列が配列番号6の少なくとも10の連続する残基を含んでなる、精製免疫原性ポリペプチドも提供する。

【0036】

本発明はまた、配列番号6に示すようなアミノ酸配列を有する11アルファ水酸化酵素に結合特異性を有する、単離精製抗体も提供する。好ましくは、該抗体は(a)配列番号6のN末端アミノ酸1-10;(b)配列番号6の最後の10のC末端アミノ酸;および(c)アミノ酸、配列番号26からなる群より選択されるタンパク質領域に結合する。より好ましくは、抗体はペプチドカラム上で精製され、前記ペプチドは:(a)配列番号6のN末端アミノ酸1-10;(b)配列番号6の最後の10のC末端アミノ酸;および(c)アミノ酸、配列番号26からなる群より選択される。

30

【0037】

本発明はまた、有効なキャリアー、ビヒクル、または補助剤中、上述の抗体を含んでなる組成物も提供する。本発明はまた、こうした抗体および溶液を含んでなる組成物も提供する。抗体はポリクローナル抗体であることが可能である。抗体はまた、モノクローナル抗体であることも可能である。抗体は、免疫親和性マトリックスにコンジュゲート化することが可能である。本発明はまた、免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法も提供する。好ましくは、免疫親和性マトリックスはSEPHAROSE 4Bである。より好ましくは、免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法は、免疫親和性マトリックスとしてSEPHAROSE 4Bを用いる。より好ましくは、免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法は、免疫親和性マトリックスとしてSEPHAROSE 4Bを用いる。

40

【0038】

本発明はまた、ペプチドカラムを用いて抗体を精製する方法であって、前記ペプチドが:(a)配列番号2のN末端アミノ酸1-10;(b)配列番号2の最後の10のC末端アミノ酸;(c)アミノ酸、配列番号23;(d)アミノ酸、配列番号24;および(e)アミノ酸、配列番号25からなる群より選択される、前記方法も提供する。

50

【 0 0 3 9 】

本発明はまた、ペプチドカラムを用いて抗体を精製する方法であって、前記ペプチドが：(a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 10；(b) 配列番号 6 の最後の 10 の C 末端アミノ酸；および(c) アミノ酸、配列番号 26 からなる群より選択される、前記方法も提供する。

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、生物学的液体において、第一のポリペプチドを検出する方法であって、前記の第一のポリペプチドが 11 アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素からなる群より選択され、以下の：(a) 前記液体を、前記の第一のポリペプチドに結合特異性を有する第二のポリペプチドと接触させ、そして(b) 前記の第二のポリペプチドの存在をアッセイして、前記の第一のポリペプチドのレベルを決定する工程を含んでなる、前記方法を提供する。好ましくは、第二のポリペプチドは抗体である。より好ましくは、第二のポリペプチドは放射標識されている。

10

【 0 0 4 1 】

本発明はまた、 $6 \times \text{SSC}$ および 65°C 中で、配列番号 1 をゲノム DNA にハイブリダイズさせ、そして配列番号 1 で検出した核酸を単離することを含んでなる、単離核酸を産生する方法も提供する。本発明はまた、この方法にしたがって調製した単離 DNA 核酸も提供する。

【 0 0 4 2 】

本発明はまた、配列番号 1 に示す配列の相補体に、非常にストリンジェントな条件下で、特異的にハイブリダイズする単離核酸も提供する。

20

【 0 0 4 3 】

本発明はまた、 $6 \times \text{SSC}$ および 65°C 中で、配列番号 5 をゲノム DNA にハイブリダイズさせ、そして配列番号 5 で検出した核酸を単離することを含んでなる、単離核酸を産生する方法も提供する。本発明はまた、この方法にしたがって調製した単離 DNA 核酸も提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、配列番号 5 に示す配列の相補体に、非常にストリンジェントな条件下で、特異的にハイブリダイズする単離核酸も提供する。

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、細胞の染色体 DNA に挿入した際、通常は細胞で発現されない 11 アルファ水酸化酵素遺伝子の発現を改変する、DNA 構築物であって：(a) ターゲティング配列；(b) 制御配列；および(c) ステロイド 11 アルファ水酸化酵素の構造遺伝子を含んでなる、前記 DNA 構築物も提供する。本発明はまた、この DNA 構築物を宿する宿主細胞も提供する。

30

【 0 0 4 6 】

本発明はまた、細胞の染色体 DNA に挿入した際、通常は細胞で発現されない 11 アルファ水酸化酵素遺伝子の発現を改変する、DNA 構築物であって：(a) ターゲティング配列；(b) 制御配列；および(c) ステロイド酸化還元酵素の構造遺伝子を含んでなる、前記 DNA 構築物も提供する。本発明はまた、この DNA 構築物を宿する宿主細胞も提供する。

40

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、心臓疾患、炎症、関節炎、または癌を治療する、療法適用の医薬品製造のための、クローニングした 11 アルファ水酸化酵素を宿する宿主細胞の使用も提供する。

【 0 0 4 8 】

本発明はまた、約 $0.5 - 500 \text{ g/l}$ 糖蜜 (molasses)、 $0.5 - 50 \text{ g/l}$ トウモロコシ浸染 (corn steep) 液、 $0.5 - 50 \text{ g/l}$ KH_2PO_4 、 $2.5 - 250 \text{ g/l}$ NaCl 、 $2.5 - 250 \text{ g/l}$ グルコース、および $0.04 - 4 \text{ g/l}$ プロゲステロン、 $\text{pH } 3.5 - 7$ を含んでなる組成物も提供する。好ましくは、この組成物は、約 $10 - 250 \text{ g/l}$ 糖蜜、 $1 - 25 \text{ g/l}$ トウモロコシ浸染液、 $1 - 25 \text{ g}$

50

/ l KH_2PO_4 、5 - 125 g / l NaCl 、5 - 125 g / l グルコース、および 0.08 - 2 g / l プロゲステロン、pH 4.5 - 6.5 で構成される。より好ましくは、該組成物は、約 25 - 100 g / l 糖蜜、2.5 - 10 g / l トウモロコシ浸染液、2.5 - 10 g / l KH_2PO_4 、12.5 - 50 g / l NaCl 、12.5 - 50 g / l グルコース、および 0.2 - 0.8 g / l プロゲステロン、pH 5.5 - 6.0 で構成される。最も好ましくは、該組成物は、約 50 g / l 糖蜜、5 g / l トウモロコシ浸染液、5 g / l KH_2PO_4 、25 g / l NaCl 、25 g / l グルコース、20 g / l 寒天および 0.4 g / l プロゲステロン、pH 5.8 を含んでなる。

【0049】

本発明はまた、約 4 - 100 g / l 寒天をさらに含んでなる、上述のいずれかの組成物の半固形処方も提供する。好ましくは、寒天は約 10 - 40 g / l 寒天の濃度である。より好ましくは、寒天は約 20 g / l 寒天である。

10

【0050】

本発明はまた、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニダランス、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、およびトリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム、リゾプス・アーヒズス、モノスポリウム・オリバセウム、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、およびアブシディア・コイルラからなる群より選択される微生物から胞子を産生する、上述の組成物いずれかの使用も提供する。好ましくは、該組成物は、アスペルギルス・オクラセウスから胞子を産生するのに用いる。

20

【0051】

定義

以下は、本明細書において交換可能に用いられるような、略語および対応する意味のリストである：

11 アルファヒドロキシカンレノン = 11 アルファヒドロキシ - 4 - アンドロステン - 3 , 17 - ジオン ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 、MW 356.46)

AcNPV = オートグラファ・カリフォルニカ核多核体病ウイルス、昆虫ウイルスのバキュロウイルス科 (*Baculoviridae*) のメンバー

AD = アンドロステンジオンまたは 4 - アンドロステン - 3 , 17 - ジオン ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 、MW 340.46)

30

アルダジエン = カンレノン

Amp = アンピシリン

attTn7 = Tn7 の付着部位 (細菌染色体への Tn7 挿入の優先部位)

バクミド = 大腸菌 (*E. coli*) から単離した組換えバキュロウイルスシャトルベクター

Bluo - gal = ハロゲン化インドリル - β - D - ガラクトシド

bp = 塩基対

Cam = クロラムフェニコール

cDNA = 相補 DNA

DMF = N, N - ジメチルホルムアミド

40

ds = 二本鎖

エブレノンまたはエポキシメクスレノン = メチル水素 9 , 11 α - エポキシ - 17 α - ヒドロキシ - 3 - オキソプレゲン - 4 - エン - 7 α , 21 - ジカルボキシレート , γ - ラクトン (MW 414.5)

g = グラム

Gen = ゲンタマイシン

hoxr = ヒト酸化還元酵素

HPLC = 高性能液体クロマトグラフィー

ヒドロキシカンレノン = 11 アルファ - または 11 ベータ - ヒドロキシカンレノン

IPTG = イソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド

50

K a n = カナマイシン

k b = キロ塩基、1 0 0 0 b p

m b = メガ塩基

M e = メチル

m g = ミリグラム

m l または m L = ミリリットル

m m = ミリメートル

m M = ミリモル

N M R = 核磁気共鳴

o x r = 酸化還元酵素

P C R = ポリメラーゼ連鎖反応

r = 耐性のまたは耐性

R P - H P L C = 逆相高性能液体クロマトグラフィー

R T = 室温

R T - P C R = 逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応

s = 感受性

S D S - P A G E = ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動

S p c / S t r = スペクチノマイシン / ストレプトマイシン

T e t = テトラサイクリン

T n = トランスポゾン

t s = 温度感受性

U = 単位

u g または μ g = マイクログラム

u l または μ l = マイクロリットル

X - g a l = 5 - ブロモ - 3 - クロロ - インドリル - β - D - ガラクトピラノシド

X - g l u c = 5 - ブロモ - 3 - クロロ - インドリル - β - D - グルコピラノシド

以下は、本明細書に用いる多様な用語の定義のリストである：

種「アスペルギルス・オクラセウス N R R L 4 0 5」は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) から得た、糸状真菌アスペルギルス・オクラセウス N R R L 4 0 5、寄託番号 1 8 5 0 0 を意味する。A . オクラセウス N R R L 4 0 5 および A . オクラセウス A T C C 1 8 5 0 0 は、カタログに異なって記載されているが、同一株である。

【0 0 5 2】

用語「アミノ酸」は、ノルロイシン、ノルバリン、ホモシステイン、およびオルニチンを含む、すべての天然存在 L アミノ酸を意味する。

【0 0 5 3】

用語「縮重」は、2 つの核酸分子が、同一のアミノ酸配列をコードするが、異なるヌクレオチド配列を含んでなることを意味する。

【0 0 5 4】

用語「断片」は、配列が標的または同定される核酸分子より短く、そして標的または同定される核酸分子の少なくとも 1 0 の隣接するヌクレオチドと同一の実質的な相補体、または実質的な相同体を有する核酸分子を意味する。

【0 0 5 5】

用語「融合タンパク質」は、タンパク質またはその断片であって、そのタンパク質に由来しない 1 以上のさらなるペプチド領域を含んでなるものを意味する。

【0 0 5 6】

用語「プローブ」は、分子、細胞、組織、または生物の特質または特徴（例えば存在または非存在、位置、相関など）を決定するのに利用される剤を意味する。

【0 0 5 7】

用語「プロモーター」は、m R N A 産生を調節する制御配列を指す、拡大した意味で用い

10

20

30

40

50

る。こうした配列には、RNAポリメラーゼ結合部位、エンハンサーなどが含まれる。

【0058】

用語「タンパク質断片」は、ペプチドまたはポリペプチド分子であって、そのアミノ酸配列が、そのタンパク質のアミノ酸配列のサブセットを含んでなるものを意味する。

【0059】

用語「組換え体」は、核酸分子のヒト操作であるかまたは該操作から生じるが、それが間接的である剤（例えばDNA、ペプチドなど）いずれかを意味する。

【0060】

用語「選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子」は、形質転換細胞を同定するかまたは選択する手段としてのプローブによって、発現が検出可能な遺伝子を意味する。

10

【0061】

用語「特異的に結合する」は、抗体またはペプチドの結合が、関連しない分子の存在によって競合的に阻害されないことを意味する。

【0062】

用語「特異的にハイブリダイズする」は、2つの核酸分子が、逆平行二本鎖核酸構造を形成可能であることを意味する。

【0063】

用語「実質的な相補体」は、核酸配列が相補体と少なくとも80%の配列同一性を共有することを意味する。

【0064】

用語「実質的な断片」は、少なくとも100ヌクレオチドを含んでなる核酸断片を意味する。

20

【0065】

用語「実質的な相同体」は、核酸分子が別のものと少なくとも80%配列同一性を共有することを意味する。

【0066】

用語「実質的にハイブリダイズしている」は、2つの核酸分子が、互いに90%以上の配列同一性を示し、そして核酸分子の少なくとも隣接する約50ヌクレオチドに関して、この同一性を示す配列のハイブリダイゼーションを可能にする条件（例えば塩および温度）下で、逆平行二本鎖核酸構造を形成可能であることを意味する。

30

【0067】

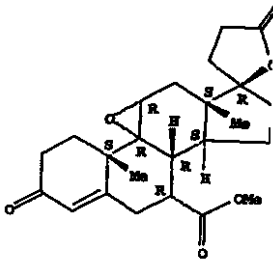
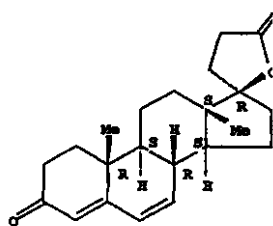
用語「実質的に精製された」は、標的分子を含有する天然存在調製に存在するかまたは存在することが可能である1以上の分子が、除去されているかまたはその濃度が減少しているであろうことを意味する。

【0068】

以下は、本明細書において交換可能に用いられるような、ステロイド、対応する用語、およびその構造のリストである：

【0069】

【表1】

#	名称	CA 索引名	他の名称	式	構造
1	エブレレノン	プレグナン-4- エン-7, 21- ジカルボン酸, 9, 11-エポキシ -17-ヒドロキ シ-3-オキシ -, γ-ラクト ン, メチルエス テル, (7α, 11 α, 17α) - (9CI)	スピロ [9, 11-エポキ シ-9H-シクロペンタ [a] フェナントレン -17(2H), 2' (3' H) -フラン], プレグナン -4-エン-7, 21-ジ カルボン酸誘導体 ; CGP30083 ; エブレレノ ン ; SC66110	C24 H30 06	
2	アルダジエン ; カンレノン	プレグナン-4, 6- ジェン-21- カルボン酸, 17-ヒドロキシ -3-オキソ-, γ- -3-オキソ-, γ-ラクトン, (17α) - (9CI)	17α-プレグナン-4, 6 -ジェン-21-カルボ ン酸, 17-ヒドロキシ -3-オキソ-, γ- ラクトン (6CI, 7CI, 8CI) ; スピロ [17H- シクロペンタ [a] フェナントレン-17, 2' (5' H)-フラン], プレグナン-4, 6- ジェン-21-カルボン 酸誘導体 ; 11614R. P. ; 17β-ヒドロキシ-3 -オキソプレグナン 4, 6-ジェン-21- カルボン酸 ; 20-スピロキサ-4, 6 -ジェン-3, 21- ジオン ; アルダジエン ; カンレノン ; ファヌラン ; SC9376 ; スピロラクトン ; SC14266	C22 H28 03	

10

20

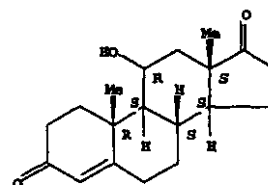
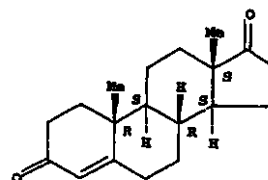
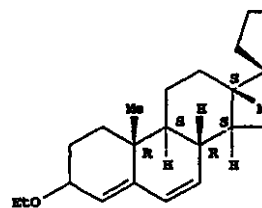
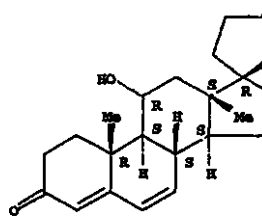
30

40

【 0 0 7 0 】

【 表 2 】

3	11 α -ヒドロキシカンレノン	プレグナ-4,6-	11 α -ヒドロキシカン	C22
		ジエン-21-カルボン酸, 11,17-ジヒドロキシ-3-オキソ-, γ -ラクトン, (11 α , 17 α)-(9CI)	レノン	H28 04
5	アルドナエチルエノールエーテル	プレグナ-4,6-	スピロ [17H-シクロ	C24
		ジエン-21-カルボン酸, 3-エポキシ-17-ヒドロキシ-, γ -ラクトン (9CI)	ペンタ [a] フェナン トレン-17, 2' (5' H)-フラン], プレグナ-4,6-ジエン-21-カルボン酸誘導体; アルドナエチルエノールエーテル	H26 03
6	アンドロステジオン	アンドロスト-4-エン-3,17-ジオン (8CI, 9CI)	Δ^4 -アンドロステ-3,17-ジオン; 17-ケトテストステロン; 3,17-ジオキソアンドロスト-4-エン; アンドロステンジオン; フェクンディン; SKF2170	C19 H26 02
		アンドロスト-4-エン-3,17-ジオン, 11-ヒドロキシ-, (11 α)-(9CI)	アンドロスト-4-エン-3,17-ジオン, 11 α -ヒドロキシ- (8CI); 11 α -ヒドロキシアンドロステジオン; 11 α -ヒドロキシアンドロステンジオン	C19 H26 03



10

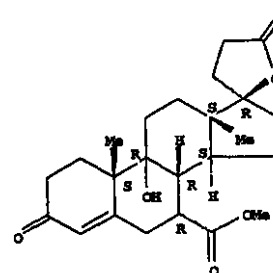
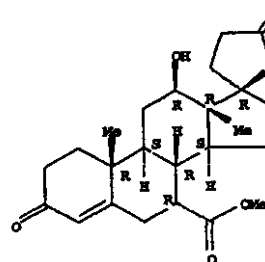
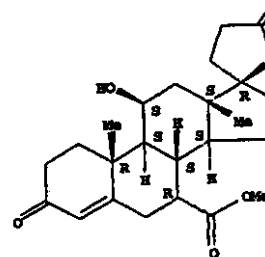
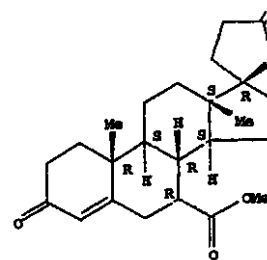
20

30

【 0 0 7 1 】

【 表 3 】

8	メクスレノン	プレグン-4-	スピロ [17H-シクロ C24
		エン-7, 21-	ペンタ [a] フェナン H32
		ジカルボン酸,	トレン-17, 05
		17-ヒドロキシ	2' (5' H)-フラン],
		-3-オキソ-,	プレグン-4-エン-
		γ-ラクトン,	7, 21-ジカルボン酸誘
		メチルエステル	導体; メクスレノン;
		(7α, 17α)	SC25152; ZK32055
		- (9CI)	
9	11β-ヒドロキシ シメクスレノン	プレグン-4-	11β-ヒドロキシメク C24
		エン-7, 21-	スレノン H32
		ジカルボン酸,	06
		11, 17-ジヒドロ	
		キシ-3-オキソ	
		- , γ-ラクト	
		ン, メチルエス	
		テル, (7α, 11	
		β, 17α) -	
		(9CI)	
10	12β-ヒドロキシ シメクスレノン	プレグン-4-	12β-ヒドロキシメク C24
		エン-7, 21-	スレノン H32
		ジカルボン酸,	06
		12, 17-ジヒドロ	
		キシ-3-オキソ	
		- , γ-ラクト	
		ン, メチルエス	
		テル, (7α, 12	
		β, 17α) -	
		(9CI)	
11	9α-ヒドロキシ メクスレノン	プレグン-4-	9α-ヒドロキシメク C24
		エン-7, 21-	スレノン H32
		ジカルボン酸,	06
		9, 17-ジヒドロ	
		キシ-3-オキソ	
		- , 21, 17-ラク	
		トン, 7-メチル エステル,	
		(7α, 17α) - (9CI)	



10

20

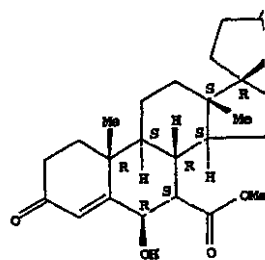
30

40

【 0 0 7 2 】

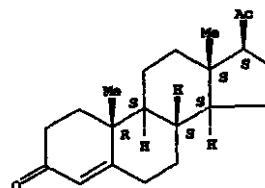
【 表 4 】

1 2	6β-ヒドロキシ メクスレノン	プレグン-4- エン-7, 21- ジカルボン酸, 6, 17-ジヒドロ キシ-3-オキシ ン, γ-ラクト ン, メチルエス テル, (6β, 7 α, 17α) - (9CI)	スピロ [17H-シクロ ペンタ [a] フェナン トレン-17, 2' (3' H)-フラン], プレグン-4-エン- 7, 21-ジカルボン酸誘 導体; 6β-ヒドロキシ シメクスレノン	C24 H32 O6
-----	--------------------	---	--	------------------

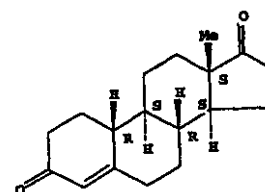


10

1 3	プロゲステロン	プレグン-4- エン-3, 20- ジオン (9CI)	プロゲステロン (8CI); Δ4- プレグネン-3, 20- ジオン; および>70 の他の名称	C21 H30 O2
-----	---------	--------------------------------------	---	------------------

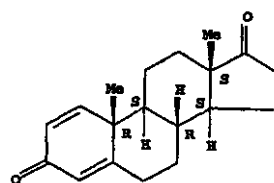


1 4	エストル-4- エン-3, 17- ジオン	エストル-4- エン-3, 17- ジオン (6CI, 8CI, 9CI)	(+) -19- ノルアンドロスト-4 -エン-3, 17- ジオン; Δ4- エストレン-3, 17- ジオン; 19- ノルアンドロスト-4 -エン-3, 17-ジオン	C18 H24 O2
-----	-----------------------------	--	---	------------------



20

1 5	デルタ 1, 4-アン ドロスタジエン -3, 17-ジオン (ADD)	アンドロスター 1, 4-ジエン- 3, 17-ジオン (7CI, 8CI, 9CI)	Δ1, 4-アンドロスタ ジエン-3, 17- ジオン; 1-デヒドロ アンドロステンジオン ; アンドロスタジエン ジオン; アンドロスタ ン-1, 4-ジエン- 3, 17-ジオン	C19 H24 O2
-----	---	---	---	------------------

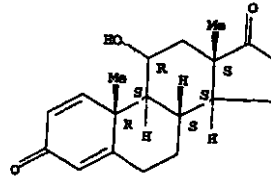


30

【 0 0 7 3 】

【 表 5 】

16	11 α -ヒドロキシアンドロスター	アンドロスター-1,4-ジエン-3,17-ジオン, 11 α -ヒドロキシ	アンドロスター-1,4-ジエン-3,17-ジオン, 11 α -ヒドロキシ; (6CI, 7CI, 8CI); 11 α -ヒドロキシアンドロスター-1,4-ジエン-3,17-ジオン; カーチニン (Kurchinin)	C19 H24 O3
----	---------------------------	--	--	------------------



10

17	アルドナ	化合物 5 (位で EtO- の代わりに O= を持つ、アルドナエチルエノールエーテル)	
18	メクスレノン 6,7-ビスラクトン	6 および 7 位の炭素の間に形成される環状ビスラクトン環 (-O-C=O-) を持つ化合物 12 (同様のラクトン環に関する議論には、米国特許第 5,981,744 号を参照されたい)	
19	11 アルファヒドロキシメクスレノン 6,7-ビスラクトン	化合物 18 の 11 アルファヒドロキシ型	20
20	メクスレノン 7,9-ビスラクトン	7 および 9 位の炭素の間に形成される環状ビスラクトン環 (-O-C=O-) を持つ化合物 11 (同様のラクトン環に関する議論には、米国特許第 5,981,744 号を参照されたい)	
21	11 アルファヒドロキシメクスレノン 7,9-ビスラクトン	化合物 20 の 11 アルファヒドロキシ型	30

30

【0074】

発明の詳細な説明

本発明は、ステロイド分子の生合成を促進する酵素、特に、チトクロム P 450 または酸化還元酵素活性を持つ酵素を含む。本発明は、部分的に、チトクロム P 450 酵素に対応する、非常に保存された残基に配列相同性を示す、アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする核酸の単離に関する。本発明はまた、ヒトおよびアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする核酸の単離にも関する。本発明のクローニングした水酸化酵素および酸化還元酵素の生物学的活性は、組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞から調製したミクロソームの存在下で、ステロイド基質をインキュベーションし、そして高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) によって、11 アルファヒドロキシ対応物への変換を監視することを含む、多様なアッセイによって決定可能である。新規 11 アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素核酸、タンパク質、ペプチド、相同体、およびいずれかの断片を含んでなる本発明は、ステロイド中間産物を 11 アルファヒドロキシ対応物に変換する、新規でそして有利な方法を提供する。

40

【0075】

本発明はまた、11 アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素をコードする DNA 配列、実質的に類似であり、そして実質的に同一の機能を実行する DNA 配列、並びに遺伝暗号の

50

縮重によってのみ、本発明の水酸化酵素および酸化還元酵素をコードするDNAと異なるDNA配列も含む。本発明にやはり含まれるのは、これらのDNAの突然変異型を構築するのに用いるオリゴヌクレオチド中間産物、並びにこれらのオリゴヌクレオチドおよび突然変異体DNAにコードされるポリペプチドである。

【0076】

本発明はまた、抗ペプチド抗体を含む、A. オクラセウス11アルファ水酸化酵素またはA. オクラセウス酸化還元酵素に特異的に結合する抗体、これらの抗ペプチド抗体を用いて、これらのおよび他の関連ポリペプチドを精製する方法、精製ポリペプチドを用いて、全長ポリペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成する方法、並びに全長ポリペプチドに対する抗体を用いて、組換えおよび非組換え宿主細胞におけるポリペプチドの存在を評価する方法も含む。抗体は、これらのポリペプチドと関連する生物学的活性を持つ、多様な宿主生物のいずれかにおいて、関連ポリペプチドを同定するのに使用可能である。

10

【0077】

この水酸化工程で使用可能な好ましい生物の中には、アスペルギルス・オクラセウスNRRL 405、アスペルギルス・オクラセウスATCC 18500、クロコウジカピATCC 16888およびATCC 26693、アスペルギルス・ニダランスATCC 11267、リゾプス・オリゼーATCC 11145、リゾプス・ストロニファーATCC 6227b、ストレプトミセス・フラディエーATCC 10745、巨大菌ATCC 14945、シュードモナス・クルシビエーATCC 13262、およびトリコテシウム・ロゼウムATCC 12543がある。他の好ましい生物には、フザリウム・オキシスポルムf. sp. セペー (*Fusarium oxysporum f. sp. cepae*) ATCC 11171およびリゾプス・アーヒズスATCC 11145が含まれる。

20

【0078】

この反応の活性を示した他の生物には、アブシディア・コイルラATCC 6647、アブシディア・グラウカATCC 22752、アクチノムコール・エレガンサATCC 6476、アスペルギルス・フラビベスATCC 1030、アスペルギルス・フミガツスATCC 26934、ボーベリア・バシアナATCC 7159およびATCC 13144、ボトリオスフェーリア・オブツサIMI 038560、カロネクトリア・デコラATCC 14767、ケトミウム・コクリオデスATCC 10195、コリネスボラ・カシコラATCC 16718、カニングハメラ・ブラケスリーアナATCC 8688a、カニングハメラ・エキヌラタATCC 3655、カニングハメラ・エレガンサATCC 9245、カーブラリア・クラバタATCC 22921、カーブラリア・ルナタACTT 12071、シリンドロカルボン・ラディシコラATCC 1011、エピコッカム・フミコラATCC 12722、ゴングロネラ・ブトレリATCC 22822、ヒボミケス・クリソスペルマス、モルティエレラ・イサベリナATCC 42613、ムコール・ムセドATCC 4605、ムコール・グリセオシアヌスATCC 1207A、ミロテシウム・ベルカリアATCC 9095、ノカルディア・コラリナ、パエシロミセス・カルネウスATCC 46579、ペニシリウム・パツルムATCC 24550、ピトミセス・アトルーリバセウスIFO 6651、ピトミセス・シノドンテイスATCC 26150、ピクノスポリウム種ATCC 12231、サッカロポリスボラ・エリスレーATCC 11635、セバドニウム・クリソスペルマムATCC 13378、スタキリディウム・ピコロールATCC 12672、ストレプトミセス・ヒクロスコピクスATCC 27438、ストレプトミセス・パーブラセンサATCC 25489、シンセファラストラム・ラセモザムATCC 18192、タムノスティルム・ピリフォルムATCC 8992、シエラピア・テリコラATCC 13807、およびバーティシリウム・テオプロメーATCC 12474が含まれる。

30

40

【0079】

11α水酸化の活性を示すと予期することが可能なさらなる生物には、セファロスポリウ

50

ム・アフィディコラ (Phytochemistry (1996), 42(2), 411-415)、コクリオボルス・ルナタス (J. Biotechnol. (1995), 42(2), 145-150)、ティエグヘメラ・オルキディス (Khim. - Farm. Zh. (1986), 20(7), 871-876)、ティエグヘメラ・ヒアロスボラ (Khim. - Farm. Zh. (1986), 20(7), 871-876)、モノスポリウム・オリバセウム (Acta Microbiol. Pol., Ser. B. (1973), 5(2), 103-110)、アスペルギルス・ウスツス (Acta Microbiol. Pol., Ser. B. (1973), 5(2), 103-110)、フザリウム・グラミネアルム (Acta Microbiol. Pol., Ser. B. (1973), 5(2), 103-110)、パーティシリウム・グラウクム (Acta Microbiol. Pol., Ser. B. (1973), 5(2), 103-110)、およびリゾプス・ニグリカンス (J. Steroid Biochem. (1987), 28(2), 197-201) が含まれる。

10

20

30

40

50

【0080】

図1は、アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列（それぞれ配列番号1、配列番号2）を示す。図2は、ヒト酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列（それぞれ配列番号3、配列番号4）を示す。図3は、アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列（それぞれ配列番号5、配列番号6）を示す。

【0081】

図4は、pMON45624にクローニングし、そしてBLASTを用いてGenBankに見られる関連酵素と並列させたA. オクラセウス11アルファ水酸化酵素のアミノ酸相同性アラインメントを示す。図5は、この関係を図式的に示す系統樹である。図6は、Clustal WおよびBoxshadeを用いて計算した、アスペルギルス・オクラセウス、ステロイド11アルファ水酸化酵素およびBLASTを用いてGenBankに見られる上位10酵素の間のパーセント相同性を示す。

【0082】

図7は、クロコウジカビ、マウス、およびS. セレビシエ（酵母）由来のNADPHチトクロムP450還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素のアミノ酸相同性を示す。図8は、A. オクラセウス、クロコウジカビ、およびS. セレビシエ酸化還元酵素のアミノ酸アラインメントを示す。図9は、クロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素の関連性を示す系統樹である。図10は、Clustal WおよびBoxshadeを用いて計算した、アスペルギルス・オクラセウス、ステロイド11アルファ水酸化酵素、並びにクロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の酸化還元酵素の間のパーセント相同性を示す。

【0083】

図11は、SwissProt由来の上位4ヒットとヒト酸化還元酵素のアラインメントである。図12は、これらのヒットに対する、ヒト酸化還元酵素の遺伝的関連性を示す系統樹を示す。図13は、ヒト酸化還元酵素およびSwissProt由来の上位4ヒットの間のパーセント同一性を示す。

【0084】

図14は、感染25および48時間後に採取したバキュロウイルス感染昆虫細胞における、アスペルギルス・オクラセウスP450 11アルファ水酸化酵素の発現を例示する免疫プロットを示す。ニトロセルロース膜は、コンジュゲート化合成ペプチド、11aOHペプチド2（配列番号24）で免疫した2匹のウサギから調製した抗体の1:1混合物で探査した。

【0085】

図15は、感染25および48時間後に採取したバキュロウイルス感染昆虫細胞における

、アスペルギルス・オクラセウス P 4 5 0 酸化還元酵素の発現を例示する免疫プロットを示す。ニトロセルロース膜は、コンジュゲート化合成ペプチド、oxr ペプチド 1 (配列番号 2 6) で免疫した 2 匹のウサギから調製した抗体の 1 : 1 混合物で探査した。

【0086】

図 1 6 は、アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素およびヒト酸化還元酵素を発現するバキュロウイルス感染昆虫細胞から調製した細胞成分分画と AD をインキュベーションした後の、1 1 アルファヒドロキシ対応物へのアンドロステンジオン (AD) の変換を例示する、HPLC 追跡を示す。

【0087】

クローニング技術

現在、当該技術分野で標準的な遺伝子操作技術 (米国特許第 4, 935, 233 号および Sambrook ら, "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) が、本発明の DNA 配列の構築に使用可能である。こうした方法の 1 つは、プラスミド中のコード配列の一部を、2 つの制限部位の間の遺伝子部分で、望ましいアミノ酸置換をコードする合成オリゴヌクレオチドと交換する、カセット突然変異誘発 (Wells ら, Gene 34: 315 - 323, 1985) である。

【0088】

望ましい遺伝子をコードする相補合成オリゴヌクレオチド対を作成し、そして互いにアニーリングさせることが可能である。オリゴヌクレオチドの DNA 配列は、配列から置換され、そして / または欠失されるものを除いて、望ましい遺伝子のアミノ酸の配列をコードするであろう。

【0089】

選択した制限エンドヌクレアーゼでプラスミド DNA を処理し、その後、アニーリングしたオリゴヌクレオチドに連結することが可能である。適切な抗生物質に耐性を与えるであろう、連結した混合物を用いて、コンピテント大腸菌細胞を形質転換することが可能である。単一コロニーを摘み取り、そして制限解析または DNA 配列決定によってプラスミド DNA を調べ、望ましい遺伝子を持つプラスミドを同定することが可能である。

【0090】

新規タンパク質および融合タンパク質をコードする DNA 配列のクローニングは、中間産物ベクターの使用によって達成可能である。リンカーおよびアダプターを用いて、DNA 配列を連結し、そして失われた配列を交換することが可能であり、この場合、制限部位が目的の領域の内部にある。単一タンパク質または融合タンパク質 (第一のポリペプチド、ペプチドリナー、および第二のポリペプチドを含んでなる) をコードする DNA を、適切な発現ベクターに挿入し、これをその後、適切な細菌、真菌、昆虫、または哺乳動物宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションする。標準的技術によって、形質転換生物または宿主細胞株を増殖させ、そして組換えタンパク質を単離する。組換え融合タンパク質は、リンカー領域によって、第二のタンパク質のすべてまたは部分に連結した、第一のタンパク質のすべてまたは部分を有する。

【0091】

ハイブリダイゼーション

1 1 アルファ水酸化酵素または酸化還元酵素をコードする核酸分子および核酸分子断片は、他の核酸分子と特異的にハイブリダイズすることが可能である。2 つの核酸分子は、逆平行二本鎖核酸構造を形成可能である場合、互いに特異的にハイブリダイズ可能であると言う。核酸分子は、完全相補性を示す場合、別の核酸分子の「相補体」であると言う。分子は、一方の分子のヌクレオチドがすべて、他方の分子のヌクレオチドに相補的である場合、「完全相補性」を示す。2 つの分子は、少なくとも慣用的な「低ストリンジェンシー」条件下で、互いにアニーリングしつづけることを可能にするのに十分な安定性で、互いにハイブリダイズ可能であるならば、「最小限に相補的」である。同様に、分子は、慣用的な「高ストリンジェンシー」条件下で、互いにアニーリングしつづけることを可能にす

10

20

30

40

50

るのに十分な安定性で、互いにハイブリダイズ可能であるならば、「相補的」である。慣用的なストリンジェンシー条件は、Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1989)、およびHaymesら, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, ワシントンDC, 1985に記載される。したがって、分子が二本鎖構造を形成する能力が、こうした逸脱によって完全に妨げられない限り、完全相補性からの逸脱は許容しうる。

【0092】

DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件は、当業者に公知であるか、またはCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨーク, 6.3.1-6.3.6, (1989)に見出すことが可能である。基本的条件には、例えば、約45の6Xクエン酸ナトリウム塩溶液(SSC)、その後、50、2XSSCでの洗浄が含まれるであろう。ストリンジェンシーは、例えば、洗浄工程の塩濃度を、50、約2XSSC(中程度に低いストリンジェンシー)から50、約0.2XSSC(高ストリンジェンシー)に改変することによって、変化させることが可能である。ストリンジェンシーはまた、洗浄工程の温度を、室温、約22(低ストリンジェンシー条件)から約65(高ストリンジェンシー条件)に変化させることによって、改変可能である。温度および塩を両方変化させることが可能であるし、あるいは温度または塩濃度を一定に保持させつつ、他方の変数を変化させることが可能である。

【0093】

発現ベクター

本発明の別の側面は、これらの新規水酸化酵素および酸化還元酵素の発現に使用するためのプラスミドDNAベクターを含む。これらのベクターは、本発明の新規のポリペプチドをコードする上述の新規DNA配列を含有する。水酸化酵素および酸化還元酵素を発現可能な微生物または細胞株を形質転換することが可能な適切なベクターには、用いる宿主細胞に応じて選択される、転写および翻訳制御配列に連結された、水酸化酵素および酸化還元酵素をコードするヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターが含まれる。

【0094】

上述のような修飾配列を取り込んだベクターが本発明に含まれ、そしてこうしたベクターは、水酸化酵素および酸化還元酵素の産生に有用である。該方法に使用するベクターはまた、本発明のDNAコード配列と操作可能な関連にあり、そして選択した宿主細胞における複製および発現を指示することが可能な、選択した制御配列も含有する。

【0095】

水酸化酵素および酸化還元酵素を産生する方法が、本発明の別の側面である。本発明の方法は、新規水酸化酵素および酸化還元酵素をコードするDNA配列を含有するベクターで形質転換されている、適切な細胞または細胞株を培養することを伴う。適切な細胞または細胞株は、細菌細胞であることが可能である。例えば、バイオテクノロジーの分野で、大腸菌の多様な株が宿主細胞として公知である。こうした株の例には、大腸菌株DH5アルファ、DH10BおよびMON105(Obukowiczら, Applied Environmental Microbiology 58:1511-1523, 1992)が含まれる。本発明にやはり含まれるのは、バクテリオファージMuに基づく、大腸菌の染色体発現ベクターを利用した、水酸化酵素および酸化還元酵素の発現である(Weinbergら, Gene 126:25-33, 1993)。腸内細菌(例えばサルモネラ属(Salmonella)種)および枯草菌(B. subtilis)を含む、細菌の多様な他の株もまた、本方法で使用可能である。

【0096】

大腸菌細胞質で発現した際、本発明のタンパク質をコードする遺伝子はまた、タンパク質のN末端で、Met⁻²-Ala⁻¹、Met⁻²-Ser⁻¹、Met⁻²-Cys⁻¹、またはM

e t⁻¹をコードするため、遺伝子の5'端でコドンが付加されるように構築可能である。大腸菌の細胞質で作成されるタンパク質のN末端は、メチオニンアミノペプチダーゼ (Ben Bassatら, J. Bacteriol. 169:751-757, 1987)、およびおそらく他のペプチダーゼによって翻訳後プロセッシングされることによって影響を受け、したがって発現に際して、メチオニンはN末端から切断される。本発明のタンパク質は、N末端に、Met⁻¹、Ala⁻¹、Ser⁻¹、Cys⁻¹、Met⁻²-Ala⁻¹、Met⁻²-Ser⁻¹、またはMet⁻²-Cys⁻¹を有するポリペプチドを含むことが可能である。これらの突然変異タンパク質はまた、N末端に分泌シグナルペプチドを融合することによって、大腸菌で発現することも可能である。このシグナルペプチドは、分泌過程の一部としてポリペプチドから切断される。

10

【0097】

酵母

当業者に知られる酵母細胞の多くの株もまた、本発明のポリペプチドを発現するための宿主細胞として利用可能である。別の態様下で、本発明のタンパク質またはその断片は、酵母細胞、好ましくはサッカロミセス・セレビシエで発現される。本発明のタンパク質またはその断片は、URA3、CYC1またはARG3遺伝子 (GuarenteおよびPtashne, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78:2199-2203 (1981); Roseら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78:2460-2464 (1981); およびCrabeleら, EMBO J. 2:205-212 (1983)) のN末端に該タンパク質を融合させることによって、S.セレビシエで発現することが可能である。あるいは、本発明のタンパク質またはその断片は、PGKまたはTRP1遺伝子 (Tuiteら, EMBO J. 1:603-608 (1982); およびDobsonら, Nucleic Acids Res. 11:2287-2302 (1983)) いずれかに融合させることが可能である。より好ましくは、本発明のタンパク質またはその断片は、成熟タンパク質として発現させる (Hitzemanら, Nature 293:717-722 (1981); Valenzuelaら, Nature 298:347-350 (1982); およびDerynckら, Nucleic Acids Res. 11:1819-1837 (1983))。

20

【0098】

本発明で使用するのに適した天然および操作酵母プロモーターがRomanosら, Yeast 8:423-488 (1992) に概説されている。最も好ましくは、本発明のタンパク質またはその断片は、酵母細胞によって分泌される (BlobelおよびDobberstein, J. Cell Biol. 67:835-851 (1975); KurjanおよびHerskowitz, Cell 30:933-943 (1982); Bostianら, Cell 36:741-751 (1984); RothmanおよびOrici, Nature 355:409-415 (1992); Juliusら, Cell 32:839-852 (1983); およびJuliusら, Cell 36:309-318 (1984))。

30

【0099】

哺乳動物

哺乳動物細胞において、外来性の (foreign) 遺伝子を発現させる一般的な方法が概説されてきている (Kaufman, R.J., 1987, "Genetic Engineering, Principles and Methods", Vol. 9, J.K. Setlow監修, Plenum Press, ニューヨーク; Colosimoら, Biotechniques 29:314-331, 2000)。組換えタンパク質は、一般的に、宿主細胞内の天然の位置 (例えば細胞質、核、または多様な膜区画) にターゲティングされるか、またはシグナルペプチドが存在する場合、分泌される。哺乳動物細胞で操作可能な強いプロモーターが、望ましいタンパク質のコード領域に翻訳的に連結される、真核分泌シグナルペプチドコード領域の転写を駆動す

40

50

る発現ベクターを構築する。例えば、p c D N A、I / N e o、p R c / R S V、および p R c / C M V (I n v i t r o g e n C o r p .、カリフォルニア州サンディエゴから得る)などのプラスミドが使用可能である。真核分泌シグナルペプチドコード領域は、遺伝子自体に由来してもよいし、または別の分泌される哺乳動物タンパク質に由来してもよい (B a y n e , M . L . ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 84 : 2638 - 2642 , 1987)。該遺伝子を含むベクターを構築した後、ベクターDNAは、C O S 7、H e L a、B H K、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O)、またはマウスL株などの哺乳動物細胞にトランスフェクションする。細胞は、例えばD M E M 培地 (J R H S c i e n t i f i c) 中で培養することが可能である。細胞のトランスフェクション後、24 - 72時間、一過性発現させた後、または抗生物質耐性に関する選択後に安定細胞株を樹立した後、培地に分泌されたポリペプチドは、標準的生化学的アプローチによって回収可能である。適切な哺乳動物宿主細胞の選択、並びに形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび産物産生および精製法が当該技術分野に知られる。例えば、G e t h i n g および S a m b r o o k , N a t u r e , 293 : 620 - 625 , 1981、またはあるいは、K a u f m a n ら , M o l . C e l l . B i o l . , 5 (7) : 1750 - 1759 , 1985 または H o w l e y ら および米国特許第4,419,446号を参照されたい。他の適切な哺乳動物細胞株はサルC O S - 1細胞株およびC V - 1細胞株である。

10

20

【0100】

哺乳動物細胞はまた、本発明の核酸分子を発現するのにも使用可能である。本発明の核酸分子は、適切なレトロウイルスベクター (例えばD u n b a r ら , B l o o d 85 : 3048 - 3057 (1995); B a u m ら , J . H e m a t o t h e r . 5 : 323 - 329 (1996); B r e g n i ら , B l o o d 80 : 1418 - 1422 (1992); B o r i s - L a w r i e および T e m i n , C u r r . O p i n . G e n e t . D e v . 3 : 102 - 109 (1993); B o r i s - L a w r i e および T e m i n , A n n a l . N e w Y o r k A c a d . S c i . 716 : 59 - 71 (1994); M i l l e r , C u r r e n t T o p . M i c r o b i o l . I m m u n o l . 158 : 1 - 24 (1992)を参照されたい)、アデノウイルスベクター (B e r k n e r , B i o T e c h n i q u e s 6 : 616 - 629 (1988); B e r k n e r , C u r r e n t T o p . M i c r o b i o l . I m m u n o l . 158 : 39 - 66 (1992); B r o d y および C r y s t a l , A n n a l . N e w Y o r k A c a d . S c i . 716 : 90 - 103 (1994); B a l d w i n ら , G e n e T h e r . 4 : 1142 - 1149 (1997))、R S V、M u S V、S S V、M u L V (B a u m ら , J . H e m a t o t h e r . 5 : 323 - 329 (1996))、A A V (C h e n ら , G e n e T h e r . 5 : 50 - 58 (1998); H a l l e k ら , C y t o k i n e s M o l . T h e r . 2 : 69 - 79 (1996))、A E V、A M V、またはC M V (G r i f f i t h s ら , B i o c h e m . J . 241 : 313 - 324 (1987))にクローニング可能である。

30

40

【0101】

形質転換およびトランスフェクション

別の側面において、本発明は、細胞中で、m R N A 分子の産生を引き起こすよう機能する外因性プロモーター領域であって、構造核酸分子に連結した前記領域を含んでなる核酸分子を有する形質転換細胞を提供し、ここで構造核酸分子は11アルファ水酸化酵素または酸化還元遺伝子あるいはその断片をコードする。この核酸分子は、細胞中で、転写の終結およびm R N A 分子の3'端へのポリアデニル化リボヌクレオチドの付加を引き起こすよう作用する、3'非翻訳配列に連結される。

【0102】

真核細胞、細菌および他の微生物を形質転換するための方法および組成物が当該技術分野に知られる (例えば、S a m b r o o k ら , M o l e c u l a r C l o n i n g : A

50

Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1989); Colosimoら, Biotechniques 29:314-331, 2000を参照されたい)。

【0103】

細胞にDNAを導入するための技術は、当業者に公知である。細胞に遺伝子を搬送する4つの一般的な方法が記載されてきている：(1)化学的方法(Grahamおよびvan der Eb, Virology 54:536-539(1973));(2)マイクロインジェクション(Capeocchi, Cell 22:479-488(1980))、エレクトロポレーション(WongおよびNeumann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:584-587(1982)); Frommら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:5824-5828(1985); 米国特許第5,384,253号); および遺伝子銃(JohnstonおよびTang, Methods Cell Biol. 43:353-365(1994)などの物理的方法;(3)ウイルスベクター(Clapp, Clin. Perinatol. 20:155-168(1993); Lura, J. Exp. Med. 178:2089-2096(1993); EgliitisおよびAnderson, Biotechniques, 6:608-614(1988)); 並びに(4)受容体仲介機構(Curielら, Hum. Gen. Ther. 3:147-154(1992), Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:6099-6103(1992))。当該技術分野に公知の他の方法もまた、使用可能である。

【0104】

形質転換は、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション、およびこれらの処理の組み合わせに基づく方法を用いて、達成可能である(例えば、Potrykusら, Mol. Gen. Genet. 205:193-200(1986); Lorzら, Mol. Gen. Genet. 199:178(1985); Frommら, Nature 319:791(1986); Uchimiyaら, Mol. Gen. Genet. 204:204(1986); Marcotteら, Nature 335:454-457(1988)を参照されたい)。

【0105】

クローニングした核酸構築物の一過性発現に基づく遺伝子発現のアッセイは、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション、または粒子銃によって細胞に核酸分子を導入することにより、発展してきている(Marcotteら, Nature 335:454-457(1988); McCartyら, Cell 66:895-905(1991); Hattoriら, Genes Dev. 6:609-618(1992); Goffら, EMBO J. 9:2517-2522(1990))。一過性発現系を用いて、操作可能であるように連結した遺伝子要素を含んでなる発現カセットの制御および構造的特徴を機能的に分析することが可能である。

【0106】

昆虫細胞発現

昆虫細胞を宿主細胞として用いて、本発明の組換えタンパク質を発現することが可能である(例えば、Luckow, V.A., Protein Eng. J. L. Clelland, Wiley-Liss, ニューヨーク州ニューヨーク:183-218, 1996、および該文献に引用される文献を参照されたい)。バキュロウイルスベクターを用いて、昆虫細胞において、外来性の遺伝子を発現するための一般的な方法が記載されてきている(O'Reilly, D.R., L.K. Millerら, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, ニューヨーク, W.H. Freeman and Company, 1992; 並びにKing, L.A.およびR.D. Possee,

10

20

30

40

50

The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, ロンドン, Chapman & Hall)。

【0107】

バキュロウイルス発現ベクターは、相同組換えによってバキュロウイルスゲノムに組換え可能であるバキュロウイルストランスファーベクターに、望ましい遺伝子（例えば11アルファ水酸化酵素または酸化還元酵素）を挿入することによって、構築可能である。多くのトランスファーベクターは、望ましい遺伝子の転写を駆動するのに、強いバキュロウイルスプロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）を用いる。いくつかのベクターは、融合タンパク質の発現を可能にするか、または望ましい遺伝子のコード領域に真核分泌シグナルペプチドコード領域を融合させることによって、細胞からのタンパク質の分泌を指示する。プラスミドpVL1393（Invitrogen Corp.、カリフォルニア州サンディエゴから得る）を用いて、例えば、バキュロウイルス感染昆虫細胞において、融合していない外来性の遺伝子の転写を指示することが可能である。望ましい遺伝子を含むバキュロウイルストランスファーベクターを、環状または直線化ゲノムバキュロウイルスDNAと共に、スポドプテラ・フルギペルダ（Sf9）昆虫細胞にトランスフェクションし、そして組換えバキュロウイルスを精製し、そして1以上のブランクアッセイ後に増幅する。

10

【0108】

組換えバキュロウイルスはまた、現在、Bac-To-BacTM発現系（Life Technologies, Inc.、メリーランド州ロックビル）として販売されている、バキュロウイルスシャトルベクター系（Luckow, V.A.ら, J. Virol. 67(8):4566-4579, 1993; 米国特許第5,348,886号）を用いて生成可能である。ミニTn7カセットにおいて、望ましい遺伝子をポリヘドリンプロモーターの下流に挿入し、このミニTnカセットを、大腸菌で増殖させたバキュロウイルスシャトルベクターゲノムにin vivoで置き換える。相同組換えに頼る方法に共通の、多数周期の単調なブランク精製の必要を伴わず、複合（composite）ウイルスDNAを大腸菌から単離し、そしてSf9細胞にトランスフェクションして、そして組換えバキュロウイルスのストックを迅速に調製する。

20

【0109】

組換えバキュロウイルスはまた、バクテリオファージラムダの部位特異的組換えおよび切除に関与する、修飾遺伝子要素（付着部位）および修飾タンパク質（例えばint、INF、xis）を用いて、ベクターからベクターへ遺伝子をシャトルする、Gateway組換えクロニング系（Life Technologies）を用いても生成可能である。

30

【0110】

11アルファ水酸化酵素または酸化還元酵素遺伝子を持つ、純粋な組換えバキュロウイルスを用いて、例えばExcell 401血清不含培地（JRH Biosciences、カンザス州レネクス）またはSf900-II（Life Technologies）中で培養した細胞を感染させる。膜に局在する水酸化酵素または酸化還元酵素は、ミトコンドリアまたはミクロソーム分画中の酵素を分画し、そして濃縮する標準的プロトコル（EngelおよびWhite, Dev Biol. 140:196-208, 1990）を用いて調製可能である。培地中に分泌されるかまたは漏洩する水酸化酵素または酸化還元酵素もまた、標準的生化学的アプローチによって、回収可能である。

40

【0111】

バキュロウイルス感染昆虫細胞における2以上の組換えタンパク質の同時発現は、2つの一般的なアプローチによって実行可能である。最も単純なアプローチは、ポリヘドリンまたはp10プロモーターなどの、強いバキュロウイルスプロモーターの調節下にある単一の異種遺伝子を宿する組換えバキュロウイルスの力価測定した（titrated）ストックで、昆虫細胞を同時感染させることである。これらのプロモーターは、大部分の宿主細胞タンパク質合成が停止している、感染後期中に、高く転写される。より初期のバキュ

50

ロウイルスプロモーターあるいは他の昆虫または真核細胞プロモーターもまた、他の時点での合成を指示するのに使用可能であるが、これは一般的により低い発現レベルを生じる。同時感染に用いる2以上の組換えウイルスの比を変化させるか、または組換えタンパク質の発現を駆動するのに異なるプロモーターを用いるウイルスを選択すると、当業者が望ましい組換えタンパク質の最適発現に適した条件を選択するのが可能になるであろう。

【0112】

二重または多重発現ベクターの構築もまた、バキュロウイルス感染昆虫細胞における2以上の組換えタンパク質の発現を可能にするであろう。一般的に、これらのベクターは、バキュロウイルスゲノムにおける単一遺伝子座に、2以上の遺伝子カセットを導入することを可能にする。多様な二重発現ベクターの構造が記載されてきている(O'Reilly, D.R., L.K. Millerら, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, ニューヨーク, W.H. Freeman and Company, 1992; 並びに King, L.A. および R.D. Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, ロンドン, Chapman & Hall)。

10

【0113】

材料および方法

一般的な方法

タンパク質をクローニングし、発現し、そして性質決定する一般的な方法は、本明細書に援用される、T. Maniatisら, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 および該文献に引用される参考文献; 並びに本明細書に援用される、J. Sambrookら, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 および該文献に引用される参考文献に見出される。多様なクローニングおよび発現ベクターの一般的な特徴およびマップもまた、公表されてきている(Gacesa, P および Ramji, D.P., *Vectors: Essential Data*, John Wiley & Sons, 1994)。哺乳動物細胞において遺伝子をクローニングし、そして発現するための一般的な方法もまた、Colosimoら, *Biotechniques* 29:314-331, 2000に見られる。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の構築、操作および単離のための、一般的なおよび特定の条件および方法は、当該技術分野に公知である(例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 1988を参照されたい)。

20

30

【0114】

別に記載しない限り、すべての特殊化学薬品は、Sigma (ミズーリ州セントルイス) から得た。制限エンドヌクレアーゼおよびT4 DNAリガーゼは、Life Technologies (メリーランド州ロックビル)、New England Biolabs (マサチューセッツ州ビバリー)、Roche Molecular Biochemicals (インディアナ州インディアナポリス)、またはPromega (ウィスコンシン州マディソン) から得た。別に記載しない限り、すべての部分は重量により、そして温度はセ氏温度()である。

40

【0115】

株、プラスミドおよび配列クロス表

これらの研究に用いる細菌株は、表1に列挙する。本研究のために用いるかまたは構築したプラスミドは、表2に列挙する。適切なオリゴヌクレオチド配列、遺伝子またはタンパク質の簡単な説明は、表3に列挙する。

【0116】

50

表 1 : 株

【 0 1 1 7 】

【 表 6 】

名称	説明または遺伝子型	参考文献／供給源
DH5 α^{TM}	F ⁻ , phi80 dlacZ デルタ M15, デルタ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk ⁻ ,mk ⁺),phoA, supE44, lambda ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies, メリーランド州ロックビ ル
DH10B TM	F ⁻ , mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) phi80 dlacZDM15 DlacX74 endA1 recA1 deoR D(ara, leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL	Life Technologies, メリーランド州ロックビ ル
DH10Bac TM	バキュロウイルスシャトル ベクターbMON14272(Kan ^R) およびヘルパープラスミド pMON7124(Tet ^R)を宿する DH10B	Life Technologies, メリーランド州ロックビ ル ; Luckow ら , J. Virol. 67:4566-4579 (1993) もまた参照された い

10

20

【 0 1 1 8 】

表 2 : プラスミド

【 0 1 1 9 】

【 表 7 】

プラスミド	配列番号	マーカ	説明	供給源
pFastBac1		Amp ^R Gent ^R	バキュロウイルスシャトルベクターに置き換え可能なミニ Tn7 置換可能要素内に、AcNPV ポリヘドリンプロモーター下流のマルチクロニングサイトを含有する、バキュロウイルスドナープラスミド	Life Technologies Inc. (メリーランド州ロックビル); Luckow ら, J. Virol. 67:4566-4579 (1993)もまた参照されたい
pBluescriptII SK		Amp ^R	pUC19 由来の多機能ファージミドクロニングベクター	Stratagene、カリフォルニア州ラホヤ
pCRII-TOPO		Amp ^R Kan ^R	T オーバーハングを用いた、ポリメラーゼ連鎖反応産物の直接クロニングのための多機能クロニングベクター	Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド
pSport1		Amp ^R	クロニング、および SP6 または T7 プロモーターを用いた、どちらかの鎖からの in vitro 転写のための多機能クロニングベクター	Life Technologies、メリーランド州ロックビル
pGEM-T		Amp ^R	PCR 産物連結の効率を改善するため、挿入部位で単一の 5' T オーバーハングを持つ、pGEM-5Zf(+)の誘導体	Promega、ウィスコンシン州マディソン
pMON45624	#1	Amp ^R Gent ^R	pFastBac1 EcoRI/XbaI + アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードする PCR 断片 EcoRI/XbaI	本研究
【 0 1 2 0 】				30
【 表 8 】				
pMON45603		Amp ^R	pBluescriptII SK BamHI/HincII + ヒト酸化還元酵素の BamHI/HincII 5'セグメント	本研究
pMON45604		Amp ^R	pBluescriptII SK HincII/KpnI + ヒト酸化還元酵素の HincII/KpnI 3'セグメント	本研究
pMON45605	#3	Amp ^R Gent ^R	pFastBac1 BamHI/KpnI + ヒト酸化還元酵素 cDNA の BamHI/KpnI 完全コード領域	本研究
pMON45630		Amp ^R Kan ^R	pCRII-TOPO SalI/BamHI + A.オクラセウス酸化還元酵素 cDNA の SalI/BamHI 5'セグメント	本研究
pMON45631		Amp ^R Kan ^R	pCRII-TOPO BamHI/XhoI + イントロンを欠く A.オクラセウス酸化還元酵素 cDNA の BamHI/XhoI 3'セグメント	本研究
pMON45632	#5	Amp ^R Gent ^R	pFastBac1 SalI/XhoI + アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素の組み立てコード領域を含有するもの	本研究

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

表 3 : 配列表

【 0 1 2 2 】

【 表 9 】

配列番号	説明	長さ／配列	種類
配列番号 01	pMON45624 由来のアスペルギ ルス・オクラセウス 11 アル ファ OH 遺伝子のヌクレオチ ド配列	1776	DNA
配列番号 02	pMON45624 由来のアスペルギ ルス・オクラセウス 11 アル ファ OH タンパク質配列	514	タンパク質
配列番号 03	pMON45605 由来のヒト酸化還 元酵素遺伝子のヌクレオチド 配列	2031	DNA
配列番号 04	pMON45605 由来のヒト酸化還 元酵素タンパク質配列	677	タンパク質
配列番号 05	pMON45632 由来のアスペルギ ルス・オクラセウス酸化還元 酵素遺伝子のヌクレオチド配 列	2322	DNA
配列番号 06	pMON45632 由来のアスペルギ ルス・オクラセウス酸化還元 酵素タンパク質配列	705	タンパク質
配列番号 07	プライマーH.oxred 1A	gattcggtccaatATGG GAGACTCCACGTGGAC AC	DNA
配列番号 08	プライマーH.oxred 1B	CAGCTGTTGACGAGAG CAGAG	DNA
配列番号 09	プライマーH.oxred 2A	CTCTGCTCTCGTCAACC AGCTG	DNA
配列番号 10	プライマーH.oxred 2B	gattcggtaccttAGCTC CACACGTCCAGGGAGTA G	DNA
配列番号 11	プライマーA.oxred-for1	GACGGIGCIGGTACAAT GGA	DNA
配列番号 12	プライマーA.oxred-rev1	TTAIGACCAIACATCIT CCTGGTAGC	DNA
配列番号 13	プライマーpSport-for1	CAAGCTCTAATACGACT CACTATAGGGA	DNA

10

20

30

【 0 1 2 3 】

40

【 表 1 0 】

配列番号 14	プライマーA. oxred-rev2	CAGGAACCGATCGACCT CGGAA	DNA
配列番号 15	プライマーA. oxred-rev3	GTACCCCTCACCAGCAG AGCCAAATG	DNA
配列番号 16	プライマーA. oxred-rev4	CCACATTGGGAACCATTA GCCTTGTAAGTG	DNA
配列番号 17	プライマーpSporti-for2	GCCAAGCTCTAATACGA CTCACTATAGGGAAGC	DNA
配列番号 18	プライマーA. oxred-for2	gtcgacATGGCGCAACT CGATACTCTC	DNA
配列番号 19	プライマーA. oxred-rev5	ctcgagttAGGACCAGA CATCGTCCTGGTAG	DNA
配列番号 20	プライマーA. oxred-for3	GGATCCCTCGCGACCTG TGATCAT	DNA
配列番号 21	プライマーA. oxred-for4	CGAAGATTCTTTGTACA AGGATGAATGGAAGACT TTTC	DNA
配列番号 22	プライマーA. oxred-rev6	CTGAAAAGTCTTCCATT CATCCTTGTACAAGAAA TC	DNA
配列番号 23	11a0H ペプチド 1	AAAYMLATLQPSDLPEL N	タンパク質
配列番号 24	11a0H ペプチド 2	CRQILTPIYIHGRKSLKG TTDE	タンパク質
配列番号 25	11a0H ペプチド 3	HMGFGHGVHACPGRRFFA SNEI	タンパク質
配列番号 26	oxr ペプチド 1	CTYWAVAKDFYASAGPA MNG	タンパク質
配列番号 27	CAA75565 ; チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [ジベレ ラ・フジクロイ]		タンパク質
配列番号 28	CAB91316 ; おそらくチトクロ ム P450 モノオキシゲナーゼ (lovA) [アカパンカビ]		タンパク質
配列番号 29	CAB66503 ; チトクロム P450 [ニチニチソウ]		タンパク質
配列番号 30	AAB94588 ; CYP71D10p [ダイ ズ]		タンパク質

10

20

30

【 0 1 2 4 】

【 表 1 1 】

配列番号 31	CAA75566 ; チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [ジベレ ラ・フジクロイ]	タンパク質	
配列番号 32	AAD34552 ; チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [アスベ ルギルス・テレウス]	タンパク質	
配列番号 33	CAA75567 ; チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [ジベレ ラ・フジクロイ]	タンパク質	
配列番号 34	CAA76703 ; チトクロム P450 [ジベレラ・フジクロイ]	タンパク質	10
配列番号 35	CAA57874 ; 未命名タンパク質 産物 [フザリウム・オキシス ボルム]	タンパク質	
配列番号 36	CAA91268 ; チトクロム P450- cDNA に類似 EST yk423b11.3 がこの遺伝子から得られる ; [線虫]	タンパク質	
配列番号 37	BAA02936 NADPH-チトクロム P450 還元酵素前駆体 [サッカ ロミセス・セレビシエ]	タンパク質	20
配列番号 38	CAA81550 NADPH チトクロム P450 酸化還元酵素 [クロコウ ジカビ]	タンパク質	
配列番号 39	BAA04496 ; NADPH-チトクロ ム P450 酸化還元酵素 [マウ ス]	タンパク質	
配列番号 40	ユニバーサルバクテリオファ ージ M13 逆方向プライマー	CAG GAA ACA GCT ATG AC	DNA
配列番号 41	ユニバーサルバクテリオファ ージ T7 プロモータープライ マー	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	DNA
配列番号 42	アスペルギルス・オクラセウ スプライマー11 アルファ OH- for	gatcgaattcATGCCCT TCTTCACTGGGCT	DNA

【 0 1 2 5 】

【 表 1 2 】

配列番号 43	アスペルギルス・オクラセウ スプライマー11 アルファ OH- rev	gctctctagattacaca gttaactcgccatATC GAT	DNA
配列番号 44	pFastBac1 プライマー-Bacfwd	CTGTTTTCGTAAACAGTT TTG	DNA
配列番号 45	pFastBac1 プライマー ポリ A	CCTCTACAAATGTGGTA TG	DNA
配列番号 46	アスペルギルス・オクラセウ ス・プライマー45624-for1	GAGATCAAGATTGCCTT	DNA
配列番号 47	アスペルギルス・オクラセウ ス・プライマー45624-for2	CTTCGACGCTCTCAA	DNA
配列番号 48	アスペルギルス・オクラセウ ス・プライマー45624-rev1	GCAATCTTGATCTCGTT	DNA
配列番号 49	S90469 ヒトチトクロム P450 還元酵素 [胎盤、mRNA 部分 的、2403nt]	2403	DNA
配列番号 50	AAB21814 ヒトチトクロム P450 還元酵素、胎盤、部分的	676	タンパク質
配列番号 51	A60557 ヒト NADPH-フェリヘ モタンパク質還元酵素	677	タンパク質
配列番号 52	P16435 ヒト NADPH-チトクロ ム P450 還元酵素	677	タンパク質
配列番号 53	P00389 ウサギ NADPH-チトク ロム P450 還元酵素	679	タンパク質
配列番号 54	P00388 ラット NADPH-チトク ロム P450 還元酵素	678	タンパク質
配列番号 55	P37040 マウス NADPH-チトク ロム P450 還元酵素	678	タンパク質
配列番号 56	P04175 ブタ NADPH-チトクロ ム P450 還元酵素	678	タンパク質
配列番号 57	ユニバーサルバクテリオフア ージ SP6 プライマー	gatttaggtgacactat ag	DNA
配列番号 58	NotI-ポリ dT アダプター	5' - <u>pgactagat</u> <u>tctaga tgcgga</u> <u>ggggccgc</u> CC (T) - 3'	DNA

10

20

30

【 0 1 2 6 】

【 表 1 3 】

配列番号 59	SallI アダプター、上部鎖	5' - TCGACCCACGCGTCCG - 3'	DNA
配列番号 60	SallI アダプター、下部鎖	3' - GGGTGCGCAGGC - 5'	DNA
配列番号 61	プライマー-oxred 1C	GTCGACCAAGCTCGT ACTG	DNA
配列番号 62	プライマー-oxred 2C	CATCGACCACCTGTGTG AGCTG	DNA
配列番号 63	プライマー-oxred 2D	GTACAGGTAGTCTCAT CCGAG	DNA
配列番号 64	クロコウジカビ NADP CYP450 酸化還元酵素 Z26838	3710	DNA
配列番号 65	クロコウジカビ NADP CYP450 酸化還元酵素 CAA81550	693	タンパク質

10

【 0 1 2 7 】

具体的方法大腸菌株の形質転換

20

DH5 アルファおよび DH10B (Life Technologies、メリーランド州ロックビル) などの大腸菌株は、連結反応の形質転換に日常的に用い、そして哺乳動物細胞をトランスフェクションするためのプラスミド DNA 調製に用いる宿主である。DH10B および MON105 (Obukowicz ら, Appl. and Envir. Micro., 58:1511-1523, 1992) などの大腸菌株は、細胞質または細胞膜周辺腔において、本発明のタンパク質を発現するのに使用可能である。

【 0 1 2 8 】

DH10B および DH5 アルファサブクロニング効率細胞は、コンピテント細胞として購入し、そして製造者のプロトコルを用いた形質転換にすぐ使用可能である。他の大腸菌株は、CaCl₂ 法を用いて、DNA を取り込むのに適格にする。典型的には、20 から 50 ml の細胞を、LB 培地 (1% バクトトリプトン、0.5% バクト酵母エキス、150 mM NaCl) 中で、Bausch & Lomb Spectronic 分光光度計 (ニューヨーク州ロチェスター) で測定した際、600 ナノメートルでおよそ 1.0 吸光度単位の密度 (OD₆₀₀) まで、増殖させる。細胞は遠心分離によって収集し、そして培養体積の 5 分の 1 の CaCl₂ 溶液 [50 mM CaCl₂、10 mM Tris-Cl (10 mM 2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル) 1,3-プロパンジオール塩酸)、pH 7.4] に再懸濁し、そして 4 に 30 分間保持する。細胞を再び遠心分離によって収集し、そして培養体積の 10 分の 1 の CaCl₂ 溶液に再懸濁する。連結した DNA をこれらの細胞 0.1 ml に添加し、そして試料を 4 で 30-60 分間保持する。試料を 42 に 45 秒間移し、そして試料を 37 で 1 時間震盪する前に、1.0 ml の LB を 40 添加する。これらの試料由来の細胞を、アンピシリン耐性形質転換体に関して選択する際にはアンピシリン (100 マイクログラム/ml、ug/ml)、またはスペクチノマイシン耐性形質転換体に関して選択する際にはスペクチノマイシン (75 ug/ml) いずれかを含有するプレート (LB 培地に 1.5% バクト寒天を加えたもの) 上に延展する。プレートを 37 で一晩インキュベーションする。コロニーを摘み取り、そして適切な抗生物質 (100 ug/ml アンピシリンまたは 75 ug/ml スペクチノマイシン) を加えた LB に接種し、そして震盪しながら 37 で増殖させる。

【 0 1 2 9 】

DNA 単離および性質決定

プラスミド DNA は、いくつかの異なる方法によって、そして当業者に知られる商業的に

50

入手可能なキットを用いて、単離可能である。プラスミドDNAは、Promega WizardTM Miniprepキット（ウィスコンシン州マディソン）、Qiagen QIAwellプラスミド単離キット（カリフォルニア州チャツワース）またはQiagenプラスミドMidikitまたはMinikitを用いて単離する。これらのキットは、プラスミドDNA単離のための同一の一般的な方法にしたがう。簡潔には、細胞を遠心分離（5000×g）によってペレットにし、連続NaOH/酸処理でプラスミドDNAを遊離させ、そして遠心分離（10000×g）によって細胞破片を除去する。上清（プラスミドDNAを含有）を、DNA結合樹脂を含有するカラム上に装填し、カラムを洗浄し、そしてプラスミドDNAを溶出させる。目的のプラスミドを含むコロニーに関してスクリーニングした後、適切な抗生物質を加えたLB 50 - 100 ml中に大腸菌細胞を接種し、震盪しながら、空気インキュベーター中で、37℃で一晩増殖させる。精製プラスミドDNAは、DNA配列決定、さらなる制限酵素消化、DNA断片のさらなるサブクローニング、および大腸菌、哺乳動物細胞、または他の細胞種へのトランスフェクションに用いる。

10

【0130】

DNA配列決定プロトコル

精製プラスミドDNAは、dH₂Oに再懸濁し、そしてその濃度は、Baush and Lomb Spectronic 601 UV分光計で260/280 nmの吸光度を測定することによって決定する。DNA試料は、製造者が示唆するプロトコルにしたがって、ABI PRISMTM DyeDeoxyTMターミネーター配列決定化学反応（Applied Biosystems Division of Perkin Elmer Corporation、カリフォルニア州リンカーンシティー）キット（部品番号401388または402078）を用いて配列決定する。場合によって、反復実験において、混合物に5% DMSOを添加して、困難なテンプレートの配列決定を容易にする。

20

【0131】

配列決定反応は、推奨される増幅条件にしたがって、DNAサーマルサイクラー（Perkin Elmer Corporation、コネティカット州ノーウォーク）中で行う。典型的には、薄壁0.2 ml PCR試験管に、テンプレートDNA 500 ngおよび選択したプライマー100 ngを含有し、Millipore milli-Q（mQ）品質の水で12 μlにしたDNA試料を調製した。2 μlの2 mM Mg⁺⁺を各試験管に添加した。試験管は、Perkin-Elmer System 9700サーマルサイクラー中で96℃で5分間変性した。変性後、サーマルサイクラーによって、試験管を4℃の温度に冷却した。6 μlのABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット6 μlを各試験管に添加した。試料をサーマルサイクラーに戻し、そして以下のプログラムを用いて周期配列決定した：（1）96℃ 30秒間；（2）50℃ 5秒間；（3）60℃ 4分間、その後、工程（1）に戻ってさらに24周期、そしてその後、4℃に保持。周期配列決定は、約2.5時間後に完了した。

30

【0132】

Centri-SepTM スピンカラム（Princeton Separations、ニュージャージー州アデルフィア）を用いて試料を精製して、過剰な色素ターミネーターを除去するか、またはSephadex G-50極細樹脂25 μlおよびmQ水300 μlを充填した、Millipore MAHV N45 50 Multiscreen-HVろ過プレートを通じて精製する。ろ過プレート上に試料を装填する前に、遠心分離装置中、プレートを750×gで2分間プレ回転させ、過剰な水を除去した。試料を樹脂上に装填し、そしてプレートを再び750×gで4分間回転させた。回転中、Sephadex充填プレートの直下に置いた96ウェルプレート中に、精製試料を収集した。96ウェルプレート中の液体は、Speed Vac中、室温で乾燥させた。45 - 60分後、DNAは乾燥し、そしてプレート底部でペレットとなっていた。3 μlのホルムアミ

40

50

ド/ブルーデキストラン装填色素に試料を再懸濁し、そして2分間加熱した(装填緩衝液レシピに関しては、Perkin-Elmer Big Dyeマニュアルのp.33を参照されたい)。試料を、ウェルから読み取りの長さが48cmの4.5%アクリルアミドゲル上に装填し、そしてABI自動化DNA配列決定装置を用いて、7時間、配列決定した(典型的には、ランモジュールSeq Run 48E-1200および色素セットDT、Program BD、Set Any-Primer)。

【0133】

重複するDNA配列断片を解析し、そしてSequencher DNA解析ソフトウェア(Gene Codes Corporation、ミシガン州アナーバー)またはPerkin-Elmerデータ収集および配列解析プログラムを用いて、収集したデータに塩基を割り当て、マスターDNAコンティグに組み立てる。

10

【0134】

Blast、ClustalW、およびBoxshade 相同性並列ツール 多様なプログラムを用いて、ヌクレオチドまたはペプチド配列を互いに並列し、そして大きな配列データベースにおいて、相同性検索を容易にすることが可能である。KarlinおよびAltschul(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)による統計的マッチング理論を実行するBLAST(基本的局所並列検索ツール(Basic Local Alignment Search Tool))は、既定のクエリー配列とマッチする、ギャップのないヌクレオチドまたはペプチド下位配列を迅速に検出するため、広く用いられるプログラムである(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>より入手可能)。BLASTは、全体的なアラインメントでなく、局所を探し、そしてしたがって分離された領域でしか類似性を共有しない配列間で関連を検出することが可能である(Altschulら, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。

20

【0135】

BLAST検索結果の感度および量を改変する2つのパラメーターを変化させることが可能である。パラメーターB(デフォルト値10)は、結果に報告される高スコアセグメント対(アラインメント)の数を制御する。パラメーターV(デフォルト値10)は、1行の説明が報告されるであろう、データベース配列(ヒット)の最大数である。マッチは、高スコアセグメント対(HSP)に基づく。2つの配列は、HSPがギャップによって分離されているならば、1より多いHSPを共有する可能性がある。BLASTアルゴリズムは、配列中のあいまいさに感受性であり、そして多くのギャップを含有する配列には適していない。

30

【0136】

プログラムblastpは、タンパク質配列データベースに対して、アミノ酸クエリー配列を比較する。blastnはヌクレオチド配列データベースに対して、ヌクレオチドクエリー配列を比較する。blastxはタンパク質配列データベースに対して、すべての読み枠で翻訳したヌクレオチドクエリー配列を比較する。未知のヌクレオチド配列の潜在的な翻訳産物を見出すのに、このオプションが使用可能である。tblastnは、すべての読み枠で動的に翻訳されるヌクレオチド配列データベースに対して、タンパク質クエリー配列を比較する。tblastxは、ヌクレオチド配列データベースの6フレーム翻訳に対して、ヌクレオチドクエリー配列の6フレーム翻訳を比較する(BLAST、関連プログラム、およびパターンマッチングアルゴリズムに関するさらなる情報には、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/education/BLASTinfo/>を参照されたい)。

40

【0137】

BLAST、スコア=98-557、ワード長514文字を用いて行うヌクレオチド検索

50

を用いて、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得た。タンパク質検索は、BLASTP、スコア = 50、ワード長 3 で行い、参照ポリペプチド（例えば配列番号 2）に相同なアミノ酸配列を得る。

【0138】

多数の DNA またはタンパク質配列のアラインメント用の異なるアルゴリズムを実行する Clustal W、バージョン 1.74 もまた用いて、異なる配列間のアラインメントを用意し、そしてパーセント同一性を割り当てた。このプログラムは、配列加重、位特異的ギャップペナルティおよび加重マトリックス選択を通じて、進行性多数配列アラインメントの感度を改善する (Thompson ら, Nucleic Acids Research, 22 (22): 4673-4680, 1994)。バージョン 1.74 のデフォルトパラメーターを用いて、2つの配列間のアラインメントを容易にし、そしてパーセント同一性を割り当てた。入力、FASTA 形式での配列からなり、そして出力は、図に示すアラインメントである。核酸配列に関しては、iub DNA 加重マトリックスを用いた。アミノ酸配列に関しては、blossum タンパク質加重マトリックスを用いた (BLAST、関連プログラム、およびパターンマッチングアルゴリズムに関するさらなる情報には、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/> を参照されたい)。

10

【0139】

Boxshade v 3.31 は、多数アラインメントタンパク質または DNA 配列からよく形式を整えたプリントアウトを生成するためのパブリックドメインプログラムである。Boxshade はそれ自体ではアラインメントを生成しないが、他の配列アラインメントプログラムによってあらかじめ用意されたファイルにシェーディングまたはカラーリングを適用する。Boxshade への入力は、Clustal W によって生成したアラインメントおよびカラーリングまたはシェーディングしようとする残基の閾値である。明記した場合を除き、大部分の場合では、50% 同一性値を用いた。この設定では、位が、同一残基を共有する配列を半分以上有すれば、シェーディングされる。Boxshade は、ftp から ftp によって、あるいは Kay Hofmann (khofmann@isrec-sun1-unil.ch) または Michael D. Baron (michael.baron@bbsrc.ac.uk) から電子メールによって、入手可能である。

20

30

【0140】

タンパク質精製および性質決定

タンパク質精製は：イオン交換、ゲルろ過または疎水性クロマトグラフィーまたは逆相 HPLC などの多様なクロマトグラフィー法のいずれかを用いて、達成可能である。ある場合、適切にフォールディングしたタンパク質は、適切なマトリックスに付着したモノクローナル抗体または受容体サブユニットなどの親和性試薬を用いて、アフィニティー精製することが可能である。これらのおよび他のタンパク質精製法は、Methods in Enzymology, 第 182 巻, "Guide to Protein Purification" Murray Deutscher 監修, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ, 1990 に詳細に記載される。

40

【0141】

精製タンパク質は、RP-HPLC、エレクトロスプレー質量分析、および SDS-PAGE によって解析可能である。タンパク質定量化は、アミノ酸組成、RP-HPLC、および / またはブラッドフォードタンパク質色素結合アッセイによって行う。ある場合、エレクトロスプレー質量分析と組み合わせてトリプシンペプチドマッピングを行って、タンパク質の同一性を確認する。

【0142】

【実施例】

以下の実施例は、本発明をより詳細に例示するであろうが、本発明はこれらの特定の実施例に限定されないことが理解されるであろう。本開示を読んだ後、当業者には、本発明の

50

精神および範囲から逸脱しない、多様な他の例が明らかであろう。すべてのこうした他の例を、付随する請求項の範囲内に含むと意図する。

【0143】

実施例1 - RNA抽出用のA. オクラセウス孢子の調製

アスペルギルス・オクラセウスATCC 18500ストック培養(50ul)は、孢子形成培地: 50g/l糖蜜、5g/lトウモロコシ浸染液、5g/l KH_2PO_4 、25g/l NaCl 、25g/lグルコース、20g/l寒天、および0.4g/lプロゲステロン、pH5.8を含有するプレート上で、3-4日間増殖させた。ステロイド11 α 水酸化酵素を誘導するため、培地にプロゲステロンを含んだ。5から7mlの生理食塩水中に、孢子をプレートから掻き取り、生理食塩水中で洗浄し、遠心分離によって収集し、そして15%グリセロールを含有する生理食塩水中に懸濁した。孢子をドライアイス上で凍結し、そして-80で保存した。400mlの1%グルコース、50mM KH_2PO_4 、および0.1gカンレノン、pH7.0を含有する1リットルフラスコ中で、およそ0.8gの孢子を30でインキュベーションした。孢子破壊前にこの処理を行うのには、3つの利点がある: (1)カンレノンでのインキュベーションによって、ステロイド11 α 水酸化酵素を誘導し; (2)孢子がカンレノンの11 α 水酸化を触媒したかどうか決定し; (3)そして孢子壁をやわらかくする。よりよい通気を提供するため、30で震盪しながらおよそ26時間インキュベーションした後、遠心分離によって孢子を収集した。顕微鏡の補助での視覚的検査によって、非常にわずかしが発芽し始めていないことが示された。孢子ペレットを液体窒素中で瞬間凍結し、そして-80で保存した。HPLCによって11アルファヒドロキシカンレノンの存在に関して培地を解析して、ライブラリー構築に用いた孢子が望ましい活性を示したかどうかを決定した。

【0144】

実施例2 - A. オクラセウス孢子はカンレノンの11 α 水酸化を触媒する

孢子誘導からおよそ160mlの培地を70ml酢酸エチルで3回抽出し、ステロイド基質および産物を収集した。有機相を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、ろ過し、そして蒸発乾固した。残渣を8mlのメタノールに溶解し、したがって、カンレノンの最終濃度はおよそ15mM(定量的回収と仮定して)であった。HPLC解析のため、培地抽出物は、50%メタノールで10から15倍に希釈した。カンレノンおよび11 α -ヒドロキシカンレノンのストック溶液は、メタノール中で調製した。HPLC解析の標準は、50%メタノールで、750uMの最終濃度に希釈することによって、これらのストック溶液から調製した。培地抽出物および標準は、C-4逆相HPLCカラム上でクロマトグラフィーした。培地は、254nmで監視すると、11 α -ヒドロキシカンレノン標準と同じ保持時間で、構成要素を示した(データ未提示)。

【0145】

実施例3 - RNA抽出用のA. オクラセウス菌糸体の増殖

アスペルギルス・オクラセウス菌糸体の液体培養は、20g/lカンレノンを含む、10g/lペプトン、10g/l酵母エキスおよび10g/lグルコース中、160mlの体積で、28で24から72時間、増殖させた。細胞10ml試料をろ過し、冷水で洗浄し、凍結し、そして-80で保存した。

【0146】

実施例4 - 誘導孢子からの総RNAの抽出

およそ0.4gの孢子を、Mini-BeadbeaterTMモデル3110(Biospec Products、オクラホマ州バートルズビル)を用いて、40ml Trizol試薬(Life Technologies、メリーランド州ロックビル)中で破壊した。簡潔には、孢子-Trizol混合物は、低速で4回の30秒パルスに供した。パルス間では、孢子を含む試験管を氷上で冷却した。顕微鏡の補助での視覚的検査によって、孢子の大部分がこの処理によって破壊されたことが示された。破片を低速遠心分離によってペレットとし、そしてTrizolと共に使用するのに製造者が推奨するプロトコルにしたがって、上清中の総RNAを抽出した。簡潔には、11mlのポリプロピレ

ン遠心分離試験管中の各10ml Trizolに、2mlのクロロホルムを添加した。3分間タンパク質を抽出した後、遠心分離によって相分離を行い、そして等体積のイソプロパノールで沈殿させるため、RNAを含有する水性相をきれいな試験管に移した。沈殿したRNAは、遠心分離によって回収し、そして70%エタノールで洗浄した。RNAは、10mlの水に再懸濁し、クロロホルムで再抽出し、そしてエタノールで、-20で一晩沈殿させた。総RNA(3mg)を遠心分離によって回収し、そして2mlの水中で再水和し、そして等体積の冷4M塩化リチウムを添加することによって、氷上で沈殿させた。この沈殿は、DNA、炭水化物、ヘム、およびグアニジン法から持ち越した可能性がある他の不純物を除去するために行った。RNAは25分間の遠心分離によって回収した。

10

【0147】

実施例5 - 誘導菌系体からの総RNA抽出

およそ0.5g湿重量細胞は、液体窒素下、ドライアイス中であらかじめ冷却した乳鉢および乳棒を用いて微粉碎して細かい粉末にした。この粉末を10ml Trizol試薬(Life Technologies)に添加し、そしてKinematicaポリトロロン(Kinematica AG、スイス・ルツェルン)を設定#4で用いてホモジナイズした。クロロホルム抽出前に、細胞破片を遠心分離によって除去した。核酸を含有する水性相は、室温で10分間、イソプロパノールで沈殿させた。沈殿物を遠心分離によって収集し、そして70%エタノールで洗浄した。RNAを水で再水和し、そしてクロロホルムで再抽出していかなる残渣タンパク質も除去した。水性相を、1/10体積の3M酢酸ナトリウムおよび2.5体積の無水エタノールで、-20で沈殿させた。最終収量は424ugであった。およそ4ugおよび16ugの総RNAは、1.2%アガロースゲルを通じた遠心分離によって分離し、そしてエチジウムブロミド中での染色によって視覚化した。染色体DNAが、少量の混入物質として存在した。

20

【0148】

実施例6 - HepG2細胞からの総RNAの抽出

肝細胞性ヒト肝臓癌腫細胞(HepG2)、ATCC HB-8065は、Penstrep、グルタメート、および10%ウシ胎児血清(Life Technologies、メリーランド州ロックビル)を補ったDMEM高グルコース培地中で維持した。細胞は、0.05%エタノールで一晩誘導し、そしてトリプシン処理によってRNA抽出用に採取した。簡潔には、細胞ペレットは、>10X体積の4Mグアニジンイソチオシアネート、50mM Tris-HCl、pH7.5、25mM EDTA(溶液D、Life Technologies)に再懸濁し、そしてその後、ボルテックスした。酢酸ナトリウムの最終濃度が0.1Mであるように、水および酢酸ナトリウム、pH4.1を添加した。RNA溶液を1/2体積のクロロホルムで抽出し、そして氷上に15分間置いた。水性相をクロロホルムで再抽出し、そしてイソプロパノールで一晩沈殿させた。総RNAを溶液Dに再懸濁し、そしてイソプロパノールで再沈殿させ、その後、0.3M酢酸ナトリウムpH5.5を含有する水および2.5体積のエタノールで2回沈殿させた。ポリA⁺選択は、以下に記載するように、2回行った。

30

【0149】

実施例7 - mRNAのポリA⁺選択

ポリA⁺ RNAは、Eppendorf 5Prime, Inc.キット(コロラド州ボールダー)を用いて、総RNAから選択した。簡潔には、各1mgの総RNAを、オリゴdTセルロースを含有するカラム上で、2回選択した。カラムスラリーは、穏やかに遠心分離し、そして0.5M NaClで平衡化することによって、充填した。RNAは、室温で15分間、dTセルロースに結合させた。カラムは、0.5M NaClで1回、そして0.1M NaClで2回、洗浄した。ポリA⁺ RNAは、0.5mlの10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH7.5中で溶出させた。オリゴdTセルロースによる選択は、2回行った。mRNAは、キャリアーとして添加したグリコーゲンを含む、50%エタノール中の0.3M酢酸ナトリウムを用いて-20で沈殿させた

40

50

。

【0150】

実施例8 - cDNA合成およびライブラリー構築

cDNA合成およびライブラリー構築のため、cDNA合成およびプラスミドクローニング用 SuperscriptTM プラスミド系キット (Life Technologies) を用いた。Superscript II 逆転写酵素は、20 μ l 反応中、42 で 1 時間、cDNA の第一鎖を触媒した。最終組成は、50 mM Tris-HCl、pH 8.3、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM DTT、各 50 μ M の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、50 μ g/ml の 5' 端でリン酸化されたオリゴdT-NotI プライマー-アダプター (Life Technologies) および 50,000 単位/ml Superscript II 逆転写酵素であった。

【0151】

【化1】

オリゴdT-NotI プライマー-アダプター

5' - PGACTAGT TCTAGA TCGCGA GCGGCCGC CC (T)₁₂ - 3' (配列番号58)

SpeI XbaI NruI NotI

【0152】

放射標識トレーサー ([α -³²P] dCTP) は添加しなかった。cDNA の第二鎖は、150 μ l の反応体積中で合成した。第一鎖反応を含む、この混合物の最終組成は、25 mM Tris-HCl、pH 7.5、100 mM KCl、5 mM (NH₄)₂SO₄、0.15 mM B-BAD⁺、各 250 μ M の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、1.2 mM DTT、65 単位/ml 大腸菌 DNA リガーゼ、250 単位/ml 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I、並びに 13 単位/ml 大腸菌 RNアーゼ H であった。16 で 2 時間インキュベーションした後、10 単位の T4 DNA ポリメラーゼを添加し、そして 16 で 5 分間インキュベーションした。反応は、10 μ l の 0.5 M EDTA で停止し、そして GENE CLEAN II (BIO 101 Inc、カリフォルニア州ラホヤ) を用いて、300 塩基対より小さい cDNA、プライマー-アダプターおよびデオキシヌクレオチドから、cDNA を分離した。5' 平滑端でリン酸化し、アニーリングした SalI アダプター (Life Technologies) を、16 で一晩、cDNA に連結した。

【0153】

【化2】

SalI アダプター

5' - TCGACCCACGCTCCG - 3' (配列番号59)

3' - GGTGCGCAGGCG - 5' (配列番号60)

【0154】

GENE CLEAN II を用いて、アダプターを除去した。その後、cDNA を NotI で消化した。QIAquick カラム (QIAGEN、カリフォルニア州バレンシア) を用いて、cDNA から小さい DNA 断片を除去し、cDNA をエタノール沈殿した。

【0155】

実施例9 - cDNA のサイズ分画

TAE 緩衝液中、0.8% Sea-Plaque アガロース (FMC BioProducts、メイン州ロックランド) を通したゲル電気泳動によって、およそ 1.5 kb 以上の種に関して cDNA を濃縮した。分離用ゲルは、DNA サイズマーカーのレーンを有し、電気泳動後、このレーンをゲルから切除し、そして適切な領域の cDNA をゲルから回収することが可能であるように、定規に並べて紫外光下で可視化するため、エチジウムブロミドで染色した。GENE CLEAN II を用いて、cDNA を抽出し、これを 20 μ l の水中に溶出した。

【0156】

実施例10 - ベクター pSprot1 におけるライブラリー構築および大腸菌へのエレクト

トロボレーション

50 mM Tris-HCl、pH 7.6、10 mM MgCl₂、1 mM ATP、5 % (w/v) PEG 8000、1 mM DTT、2.5 µg/ml pSport1、およそ0.5 µg/mlのcDNA、および50単位/ml T4 DNAリガーゼを含む20 µl反応中で、NotIおよびSalIであらかじめ消化したpSport1 (Life Technologies, Inc.、メリーランド州ロックビル)と、サイズ選択したcDNAのアリコットを4 で一晩連結した。連結混合物は、12.5 µl 7.5 M 酢酸アンモニウム、5 µl 酵母tRNAキャリアーおよび70 µl 無水エタノールを添加することによって沈殿させた。連結cDNAは、室温で20分間遠心分離することによって回収し、そして5 µlの滅菌水中で再水和した。1 µlの連結cDNAは、10 10
 、エレクトロボレーションによって、ElectroMAX DH10B大腸菌 (Life Technologies) に導入した。1 ml SOC培地 (Life Technologies) 中で、37 で1時間、細胞を回復させた後、100 µg/ml アンピシリンを含むLB上にアリコットを蒔いた。アスペルギルス・オクラセウス孢子ライブラリー (LIB3025と命名) の力価は、SOC中で細胞懸濁物の連続希釈を調製することによって、決定した。細胞懸濁物の1 µl、0.1 µlおよび0.01 µl試料の同等物を蒔き、そしてその結果、力価は、 1.75×10^6 / ml コロニー形成単位であると計算された。

【0157】

実施例 11 - DNA 配列解析によるチトクロム P 450 酵素をコードするクローンの同定 およびアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素をコードするプラスミド p MON 45624 の構築 20

アスペルギルス・オクラセウスからの 11 アルファ水酸化酵素のクローニング

100 µg/ml アンピシリンを含む LB 寒天プレート上でおよそ2,000のコロニーを選択し、そして配列決定用にミニプレッププラスミドDNA試料を調製した。cDNA合成に用いたポリdTプライマーの一部を含むNotI部位から始めて、発現配列タグ (EST) の3'端から、一方向性配列決定を行った。2つのユニバーサルプライマーを用いて、配列決定を容易にした。

【0158】

【化3】

M13逆方向: CAG GAA ACA GCT ATG AC (配列番号40)
 T7プロモーター: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG (配列番号41)

30

【0159】

大部分の既知のチトクロム P 450 は、停止コドンのおよそ50アミノ酸残基 (150ヌクレオチド) 上流の保存されるヘム結合領域を含む (Nelsonら, Pharmacogenetics 6:1-42, 1996)。標準的ヘム結合モチーフに関して水酸化酵素であるとスコア付けされた配列のBLASTXおよび視覚的検査を用いて、適切な領域に、標準的ヘム結合モチーフ (FXGXG、¹「X」はいかなるアミノ酸でもよい) をコードする配列に関して、2,000のESTをスクリーニングした。15のESTのみがヘム結合モチーフを有した。1つのESTがユニークであり、そして40
 他の14は、重複配列であるようであった。その後、推定上のチトクロム P 450 酵素をコードする7つのクローン由来のcDNA挿入物を完全に配列決定した。7つすべてが同一の酵素をコードした。

【0160】

アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素の遺伝子増幅

11 アルファ水酸化酵素のコード領域は、テンプレートとして、A. オクラセウス cDNA 孢子ライブラリー (LIB3025) 由来のユニーククローンをを用いたPCRによって増幅した。プライマーは、pFastbac1に方向性クローニングするため、EcoRI (順方向) およびXbaI (逆方向) の認識部位を含んだ。増幅は、PCRコアキット (Roche) および各50 pmolのプライマーを用いて、32周期行った。1周期は 50

、 9 4 4 5 秒間の変性工程、 6 0 4 5 秒間のアニーリング工程、および 7 2 6 0 秒間の伸長工程からなった。

【 0 1 6 1 】

【化 4】

プライマー 11 アルファ OH-for: gatcgaattcATGCCCTTCTTCACTGGGCT (配列番号 42)

プライマー 11 アルファ OH-rev: gatctctagattACACAGTTAAACTCGCCATATCGAT (配列番号 43)

【 0 1 6 2 】

p M O N 4 5 6 2 4 の構築

上述の増幅断片は、Q I A q u i c k カラム (Q i a g e n、カリフォルニア州バレンシア) を通じて精製し、そして E c o R I および X b a I で切断した p F a s t B a c 1 に連結する前に、E c o R I および X b a I で消化した。生じたプラスミドは、p M O N 4 5 6 2 4 と名づけ、そしてベクター配列に基づくプライマーおよび 11 アルファ水酸化酵素配列に基づく内部プライマー (以下に示す) を用いて、D N A 配列を確認した。

【 0 1 6 3 】

【化 5】

プライマー Bacfw: CTGTTTTCGTAACAGTTTTC (配列番号 44)

プライマーポリ A: CCTCTACAAATGTGGTATG (配列番号 45)

プライマー 45624-for1: GAGATCAAGATTGCCTT (配列番号 46)

プライマー 45624-for2: CTTTCGACGCTCTCAA (配列番号 47)

プライマー 45624-rev1: GCAATCTTGTATCTCGTT (配列番号 48)

【 0 1 6 4 】

クローニングした 11 アルファ水酸化酵素のヌクレオチドおよび予測されるアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 1 および配列番号 2 として、図 1 に示す。

【 0 1 6 5 】

図 4 は、p M O N 4 5 6 2 4 にクローニングし、そして B L A S T を用いて G e n B a n k に見出される関連酵素と並列した、A . オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素のアミノ酸相同性アラインメントを示す。図 5 は、この関連を図式的に示す系統樹である。図 6 は、C l u s t a l W および B o x s h a d e を用いて計算した、アスペルギルス・オクラセウス、ステロイド 11 アルファ水酸化酵素、および B L A S T を用いて G e n B a n k に見出される上位 10 酵素の間のパーセント相同性を示す。

【 0 1 6 6 】

実施例 12 - ヒト N A D P H チトクロム P 4 5 0 還元酵素をコードする c D N A の増幅、並びにプラスミド p M O N 4 5 6 0 3、p M O N 4 5 6 0 4、および p M O N 4 5 6 0 5 へのクローニング

ヒト酸化還元酵素の遺伝子増幅

H e p G 2 細胞由来のおよそ 1 u g のポリ A⁺ m R N A を、11 u l 反応中、100 n g ランダム六量体 (I n v i t r o g e n、カリフォルニア州カールスバッド) と共に、65 で 10 分間加熱した。混合物を氷上で冷却し、その後、1 u l R N アーゼ阻害剤 (P r o m e g a、ウィスコンシン州マディソン)、0.01 M D T T、5 m M d N T P、50 m M T r i s - H C l、p H 8.3、75 m M K C l、3 m M M g C l₂ および 1 u l S u p e r S c r i p t I I 酵素 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を含有する 20 u l 反応中、42 で 75 分間インキュベーションした。逆転写酵素は、95 で 2 分間加熱することによって不活性化した。第一鎖 c D N A は、-20 で保存した。順方向および逆方向プライマーは、寄託番号 S 9 0 4 6 9 (チトクロム P 4 5 0 還元酵素をコードするヒト胎盤部分的 m R N A (配列番号 49)) のヌクレオチド配列に基づいた。対応するタンパク質配列の寄託番号は A A B 2 1 8 1 4 (配列番号 50) である。ヒト酸化還元酵素は、2 つの断片でクローニングし、これを内部 H i n c I I 部位での連結によって、p F a s t B a c 1 (L i f e T e c h n o l o g i e s) 中で組み立てた。プライマーは、p F a s t B a c 1 に方向性サブクローニングするための制限部位を含んだ。

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

【化6】

プライマー H. oxred 1A: gatcggatccaatATGGGAGACTCCCACGTGGACAC (配列番号07)
 プライマー H. oxred 1B: CAGCTGGTTGACGAGAGCAGAG (配列番号08)
 プライマー H. oxred 2A: CTCTGCTCTCGTCAACCAGCTG (配列番号09)
 プライマー H. oxred 2B: gatcggatccttaGCTCCACACGTCCAGGGAGTAG (配列番号10)

【0168】

第二鎖は、150ul 反応あたり、400uM dNTPおよび各167nMのプライマーを用いて合成した。増幅は、Deep Ventポリメラーゼ(New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー)を用いて行った。セグメント2(酸化還元酵素cDNAの3'半分)用の反応は、5% DMSOに調整した。増幅は、94 90秒間の变性、その後、62 2分間のアニーリング、および72 2分間の伸長の最初の周期を含んだ。この後、45秒間の变性工程、45秒間のアニーリング工程、および60秒間の伸長工程からなる30周期が続いた。伸長工程は、最終周期で5分間に延長した。

10

【0169】

pMON45603、pMON45604、pMON45605の構築

酸化還元酵素cDNAの5'半分のPCR断片は、BamHIおよびHincIIで消化した。酸化還元酵素cDNAの3'半分のPCR断片は、HincIIおよびKpnIで消化し、そして配列決定のため、pBluescript II(Stratagene、カリフォルニア州ラホヤ)に連結した。生じたプラスミドは、pMON45603(5'セグメント)およびpMON45604(3'セグメント)と命名した。pMON45603由来のBamHI/HincII断片およびpMON45604由来のHincII/KpnI断片を、BamHIおよびKpnIで切断したpFastbac1に連結して、pMON45605を生成した。

20

【0170】

配列決定プライマーは、チトクロムP450還元酵素をコードするcDNA[ヒト、胎盤、mRNA部分的、2403nt]である、GenBank寄託番号S90469(配列番号49)の配列に基づいた。同族(cognate)タンパク質配列は: AAB21814(配列番号50)チトクロムP450還元酵素{EC 1.6.2.4}[ヒト、胎盤、ペプチド部分的、676aa][ホモ・サピエンス(Homo sapiens)]である。pMON45603のcDNA挿入物は、プライマーoxred1Cを用いて配列決定し、そしてpMON45604のcDNA挿入物は、プライマーoxred2Cおよび2Dを用いて配列決定した。cDNA挿入物に隣接するベクター配列にアニーリングする、ユニバーサルT7(配列番号41)およびM13逆方向(配列番号40)プライマーもまた、配列決定に用いた。

30

【0171】

【化7】

プライマー oxred 1C: GTGGACCACAAGCTCGTACTG (配列番号61)
 プライマー oxred 2C: CATCGACCACCTGTGTGAGCTG (配列番号62)
 プライマー oxred 2D: GTACAGGTAGTCCTCATCCGAG (配列番号63)

【0172】

クローニングしたヒト酸化還元酵素のヌクレオチドおよび予測されるアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号3および配列番号4として、図2に示す。図11は、ヒト酸化還元酵素とSwissProt由来の上位4ヒットのアラインメントを示す。図12は、これらのヒットに対するヒト酸化還元酵素の遺伝的関連性を示す系統樹を示す。図13は、ヒト酸化還元酵素およびSwissProt由来の上位4ヒットの間のパーセント同一性を示す。

40

【0173】

実施例13-A. オクラセウス由来のNADPHチトクロムP450還元酵素をコードするcDNAの増幅、並びにプラスミドpMON45630、pMON45631、およびpMON45632へのクローニング

50

アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素の遺伝子増幅

クロコウジカビ *cprA* 遺伝子、寄託番号 Z26938 由来の配列（配列番号 65）およびアスペルギルス・フミガツス由来の部分的 cDNA クローン 804561639F1（PathoSeq Database、Incyte Pharmaceuticals）のアラインメントを視覚的にスキャンして、PCR 用のプライマーの設計のため、高い相同性の領域を選択した。*cprA* 遺伝子産物のコード領域、アミノ酸 203 から 693 に渡る、プライマー組を選択した。

【0174】

プライマーは、アミノ酸配列が両方の間で同一であり、そして核酸配列が第三のコドン位で 2 位異なる、最も 5' の重複する領域から選択した。3' プライマーに関しては、核酸は、停止コドン、最後の 7 アミノ酸残基、およびクロコウジカビでは ARG、そして A. フミガツスでは SER をコードする（CGC 対 AGC）、停止コドンからアミノ酸残基 8 位のコードの第二および第三の位に対応する 2 つのさらなる塩基をコードした。クロコウジカビおよび A. フミガツス配列間に相違があるコドンの第三の塩基をイノシンと交換した。

10

【0175】

【化 8】

プライマー A.oxred-for1: GACGGIGCIGGTACAATGGA (配列番号 11)

プライマー A.oxred-rev1: TTAIGACCAIACATCTTCCTGGTAGC (配列番号 12)

(I の箇所=イノシン)

20

【0176】

A. オクラセウス菌系体から抽出した総 RNA およそ 5 μ g から部分的 cDNA クローンを増幅した。第一鎖合成前に、RNA を、11 μ l 反応混合物中、100 ng ランダム六量体（Promega、ウィスコンシン州マディソン）と共に、65℃ で 10 分間加熱した。混合物を氷上で冷却し、その後、1 μ l RNA ーゼ阻害剤（Promega）、0.01 M DTT、5 mM dNTP、50 mM Tris-HCl、pH 8.3、75 mM KCl、3 mM MgCl₂ および 1 μ l SuperScript II (LTI) を含有する 20 μ l 反応中、42℃ で 75 分間インキュベーションした。逆転写酵素は、95℃ で 2 分間加熱することによって不活性化した。第一鎖 cDNA は、-20℃ で保存した。第二鎖は、テンプレートとして第一鎖 5 μ l を用いて合成した。該反応は、500 nM プライマー、各 200 μ M の dNTP、並びに PCR コアキット（Roche Molecular Biochemicals、インディアナ州インディアナポリス）に供給されるような Taq ポリメラーゼおよび緩衝液を含んだ。増幅は、94℃ 30 秒間の変性工程、60℃ 30 秒間のアニーリング工程、および 72℃ 60 秒間の伸長工程の 32 周期を用いて行った。増幅した DNA 産物を pGEM-T（Promega、ウィスコンシン州マディソン）にクローニングし、そしてユニバーサル T7（配列番号 41）および SP6（配列番号 57）プライマーを用いて配列決定した。

30

【0177】

【化 9】

プライマー SP6 GATTTAGGTGACACTATAG (配列番号 57)

40

【0178】

クロコウジカビ *cprA* 遺伝子との配列のアラインメントによって、A. オクラセウスクローンが、クロコウジカビ遺伝子のイントロンと同じ位置にイントロンを有することが明らかになった。これは、A. オクラセウス PCR 産物が、総 RNA のゲノム DNA 混入物質から増幅されている可能性があることを示した。A. オクラセウス配列に基づく逆プライマーを設計して、開始メチオニンを含むおよそ 600 の欠けている bp を増幅した。その後、A. オクラセウス cDNA ライブラリーは、PCR のテンプレートとして用いた。順方向プライマーは、ベクター pSport1（Life Technologies）の塩基 299 から 326 の逆相補体に基づいた。他方のプライマー、A.oxred-rev2 は、残基 326 - 333 をコードする A. オクラセウス配列に基づいた。

50

【 0 1 7 9 】

【 化 1 0 】

プライマー pSport-for1: CAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGA (配列番号13)

プライマー A.oxred-rev2: CAGGAACCGATCGACCTCGGAA (配列番号14)

【 0 1 8 0 】

その後、サイズ > 1.5 kb のゲル精製断片から作成した A. オクラセウス孢子ライブラリーを、コード領域の最後の 200 塩基を増幅するためのテンプレートとして用いた。A. oxred 配列から 2 つの新規逆方向プライマーを設計し、そして pSport1 (塩基 295 - 328) に基づく新規順方向プライマーもまた、用いた。

【 0 1 8 1 】

【 化 1 1 】

プライマー A.oxred-rev3: GTCACCCCTCACCAGCAGAGCCAATG (配列番号15)

プライマー A.oxred-rev4: CCACATTGCGAACCATAGCGTTGTAGTG (配列番号16)

プライマー pSport-for2: GCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGC (配列番号17)

【 0 1 8 2 】

増幅は、伸長酵素ポリメラーゼキット (Life Technologies、メリーランド州ロックビル) を用いて、94 30 秒間の变性工程、63 30 秒間のアニーリング工程、および 68 5 分間の伸長工程からなる 35 周期、行った。PCR 産物を、pCRII-TOPO (Invitrogen) に直接クローニングした。12 のクローンを配列決定し、そして複合配列は、最初のメチオニンの 232 塩基上流に伸長し、そして 2 つのインフレーム停止コドンを含んだ (データ未提示)。

【 0 1 8 3 】

発現ベクター pFastBac1 への連結用に、5' SalI 部位および 3' XhoI 部位を含む、A. oxred の完全コード領域を取り込むプライマーを設計した。

【 0 1 8 4 】

【 化 1 2 】

プライマー A.oxred-for2: gtcgacATGGCGCAACTCGATACTCTC (配列番号18)

プライマー A.oxred-rev5: ctcgagttAGGACCAGACATCGTCTGGTAG (配列番号19)

【 0 1 8 5 】

これらのプライマーおよび伸長酵素キットと共に、PCR のテンプレートとして A. オクラセウス総 RNA を用いた。増幅は、94 30 秒間の变性工程、64 30 秒間のアニーリング工程、および 68 5 分間の伸長工程を含む、35 周期からなった。反応由来の cDNA アリコットは、およそ 2.1 kb の単一バンドとして泳動された。

【 0 1 8 6 】

pMON45630 の構築

PCR 産物は、pCRII-TOPO (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド) に直接クローニングした。すべてのクローンは、先に記した内部イントロンを含有した。1 つのクローンは、pMON45630 と称した。

【 0 1 8 7 】

pMON45631 および pMON45632 の構築

5' スプライシング部位からおよそ 170 bp 上流の内部 BamHI 部位からの 2 工程 PCR に基づく戦略を使用して、イントロンを欠くクローンを生成した。

【 0 1 8 8 】

【 化 1 3 】

プライマー A.oxred-for3: GGATCCCTCGCGACCTGTGATCAT (配列番号20)

プライマー A.oxred-for4: CGAAGATTCTTGTACAAGGATGAATGGAAGACTTTTC (配列番号21)

プライマー A.oxred-rev6: CTGAAAAGTCTTCCATTCATCCTTGTACAAGAAATC (配列番号22)

【 0 1 8 9 】

プライマー A.oxred-for4 および rev6 は、相補的であり、そしてイントロンに隣接した。第一の PCR 反応は、テンプレートとして、内部 BamHI 部位で直線化

10

20

30

40

50

した A . o x r e d クローンを用いた。ポリメラーゼおよび緩衝液は、P C R コアキット (R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s 、インディアナ州インディアナポリス) によって供給された。プライマーおよび d N T P 濃度は、それぞれ、5 0 0 n M および 2 0 0 u M であった。A . o x r e d - f o r 3 と A . o x r e d - r e v 6 、および A . o x r e d - f o r 4 と A . o x r e d - r e v 5 の組み合わせを用いて、2 つの反応を行った。2 分間の最初の変性後、2 8 周期の P C R 増幅を行った。1 周期は、9 4 4 5 秒間の変性、6 2 4 5 秒間の変性工程および 7 2 4 5 秒間の伸長工程を含んだ。各反応 1 u l は、プライマー A . o x r e d - f o r 3 および A . o x r e d - r e v 5 と共に伸長酵素および緩衝液を用いた第二の P C R 増幅のテンプレートとして働いた。増幅は、9 4 3 0 秒間の変性工程、6 2 3 0 秒間のアニーリング工程、および 6 8 5 分間の伸長工程を含む 3 0 周期からなった。P C R 産物は、p C R I I - T O P O に直接クローニングした。D N A 配列決定は、イントロンが除去されていることを立証した。このクローンは、p M O N 4 5 6 3 1 と命名した。

10

【0190】

プラスミド p M O N 4 5 6 3 2 は、p M O N 4 5 6 3 0 由来の S a l I / B a m H I 断片と p M O N 4 5 6 3 1 由来の B a m H I / X h o I 断片、並びに S a l I および X h o I で切断し、そして望ましい挿入物を含むベクターの回収を増進するために脱リン酸化した、ベクター p F a s t B a c 1 を連結することによって、三方向連結で構築した。

【0191】

クローニングしたアスペルギルス・オクラセウス 1 1 酸化還元酵素のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号 5 および配列番号 6 として、図 3 に示す。図 7 は、クロコウジカビ、マウス、および S . セレピシエ由来の N A D P H チトクロム P 4 5 0 還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素のアミノ酸相同性を示す。図 8 は、A . オクラセウス、クロコウジカビ、および S . セレピシエ酸化還元酵素に関するアミノ酸アラインメントを示す。図 9 は、クロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素の関連性を示す系統樹である。図 1 0 は、C l u s t a l W および B o x s h a d e を用いて計算した、アスペルギルス・オクラセウス、ステロイド 1 1 アルファ水酸化酵素、並びにクロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の酸化還元酵素の間のパーセント相同性を示す。

20

30

【0192】

実施例 1 5 : アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素およびアスペルギルス・オクラセウス N A D P H チトクロム P 4 5 0 還元酵素を認識するポリクローナル抗体の生成

抗 1 1 α 水酸化酵素抗体の生成

アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素および N A D P H チトクロム P 4 5 0 還元酵素に対するポリクローナル抗体は、以下の予測されるタンパク質配列のいくつかの領域に対応する合成ペプチド (S i g m a / G e n o s i s 、テキサス州ウッドランズにより調製) に対して、ウサギにおいて作成した：

【0193】

【化 1 4】

11aOH ペプチド 1:	AAAYWLATLQPSDLPELN	(配列番号 2 3)
11aOH ペプチド 2:	CRQILTFYIHKRSLKGTED	(配列番号 2 4)
11aOH ペプチド 3:	HMGFGHGVHACPGRRFFASNEI	(配列番号 2 5)
oxr ペプチド 1:	CTYWAVAKDPYASAGFAMNG	(配列番号 2 6)

40

【0194】

1 1 a O H ペプチド 2 (配列番号 2 4) は、W a n g および L u (D r u g M e t a b . D i s p o s . 2 5 (6) , 7 6 2 - 7 6 7 , 1 9 9 7) に記載される C Y P 3 A 4 に対応する配列を含む、1 1 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列のアラインメントに存在する、G らせん、G / H ループ、および H らせん領域に対応する。1 1 a O H ペプチド 3 (配列番号 2 5) は、ヘム結合ドメイン由来のペプチド断片に対応した。

50

【0195】

免疫学的等級ペプチドは、逆相高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて、純度に関して監視した。各ペプチドは、キーホールリンペット（keyhole limpet）ヘモシアニン（KLH）にコンジュゲート化し、そして完全フロイトアジュバントに懸濁した。その後、コンジュゲート化ペプチドを、ウサギの多数の部位に皮下注射した。各コンジュゲート化ペプチドは、2匹のウサギに注射した。続くすべての免疫は、不完全フロイトアジュバント中で投与した。一般的に、続く5回の注射は、最初の免疫後、2週間間隔で投与した。IgG分画は、Sepharose-プロテインAカラムを用いてアフィニティー精製した。各ペプチドを注射した2匹のウサギ由来の分画を1:1比で合わせた。プールした抗11アルファ水酸化酵素（ウサギGN1187/1188）は、0.34 mg/ml IgGであった。プールした抗oxred（ウサギGN2023/2024）は、0.26 mg/ml IgGであった。合わせたIgGは、どの希釈がウェスタンブロットを探索するのに最適であるかを決定するパイロット実験用に、各々、1:10、1:100および1:1,000に希釈した。1:10希釈が最も優れた結果を生じ、そして続くウェスタンブロットを探索するのに用いた。

10

【0196】

実施例16 - 昆虫細胞感染および異種発現

タンパク質は、バキュロウイルスシャトルベクター（Luckowら, J. Virol. 67:4566-4579, 1993）を用いてSF9昆虫細胞中で発現した。バキュロウイルスシャトルベクター（バクミド）は、細菌細胞中で発現するためのミニ-Fレプリコン、選択用のカナマイシン耐性マーカー、およびlacZα配列内のattTn7（細菌Tn7トランスポゾンの標的部位）を含有する。これらの要素は各々、オートグラファ・カリフォルニカ核多核体病ウイルス（AcNPV、天然バキュロウイルス）ゲノムのポリヘドリン遺伝子座に挿入する。ドナープラスミド（pFastBac1、Life Technologies）を用いて、発現しようとする遺伝子を搬送し、そして細菌Tn7遺伝子転位要素を介して、バクミドに挿入した。pFastBac1は、ポリヘドリンプロモーターに隣接するTn7左および右端、ポリリンカークローニング配列、SV40ポリA転写終結配列、および選択用のゲンタマイシン耐性遺伝子を含有する。組換えウイルスは、単一11アルファ水酸化酵素または酸化還元酵素cDNAを含有するpFastBac1プラスミドの、バクミドおよびヘルパープラスミドを含有するDH10Bac大腸菌細胞（Life Technologies）への形質転換後、生成した。

20

30

【0197】

トランスフェクションは、スポドプテラ・フルギベルダ（SF9）細胞用の製造者のプロトコルにしたがって、CellfectinTM試薬（Life Technologies）を用いて行った。細胞は、6ウェル組織培養プレートに、SF-900血清不含培地（Life Technologies）中、ウェルあたり 9×10^5 細胞で蒔き、そして少なくとも1時間付着させた。トランスフェクション混合物は、200 μ lのSF-900培地を含有するポリスチレン試験管に、5 μ lミニプレップDNAおよび5 μ l Cellfectinを添加して作成した。混合物を室温で15-30分間インキュベーションさせた。トランスフェクション前に、800 μ lのSF-900培地を各試験管に添加した。細胞を2 mlのSF-900培地で1回洗浄し、そしてDNA混合物を細胞に添加した。培養を27°Cで5時間インキュベーションさせた。5時間のインキュベーション期間後、トランスフェクション混合物を除去し、そして培養に、10%ウシ胎児血清を補充したIPL-41培地（Life Technologies）を、ウェルあたり3 ml補充した。3日間のインキュベーション期間後、細胞を採取し、遠心分離し、そして組換えウイルスを含有する上清（継代1またはP1ストックと命名）を除去して、そして4°Cで保存した。より大きいウイルスストックは、0.5 mlのP1培地を用いて、mlあたり 5×10^5 細胞の新鮮なSF9細胞100 mlを感染させることによって、作成した。その後、このより大きい（P2）ストックは、ブランクアッセイプロトコル（O'Reillyら、1992）を用いて力価測定し、そして別個に、または互いに組み合わせて

40

50

、11アルファ水酸化酵素または酸化還元酵素の産生に用いた。

【0198】

図14は、感染25および48時間後に採取したバキュロウイルス感染昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウスP450 11アルファ水酸化酵素の発現を例示するイムノブロットを示す。ニトロセルロース膜は、コンジュゲート化合成ペプチド11aOHペプチド2（配列番号24）で免疫した2匹のウサギから調製した抗体の1：1混合物で探査した。

【0199】

図15は、感染25および48時間後に採取したバキュロウイルス感染昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウスP450酸化還元酵素の発現を例示するイムノブロットを示す。ニトロセルロース膜は、コンジュゲート化合成ペプチドoxrペプチド1（配列番号26）で免疫した2匹のウサギから調製した抗体の1：1混合物で探査した。

10

【0200】

実施例17：アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素およびヒト酸化還元酵素を発現するバキュロウイルスの同時感染

Sf9細胞は、ステロイド11アルファ水酸化酵素cDNAを含有するウイルス粒子およびヒトNADPH P450酸化還元酵素を含有する別個のウイルスに同時感染させた。両ウイルスは、感染効率(MOI)比0.1：0.01(11aOH対oxr)で添加した。感染1日後、0.9μg/ml塩化ヘミンを培養に添加した。細胞は、感染3日後、遠心分離によって採取し（異なって明記しない限り）、そして洗浄した細胞ペレットを細胞成分分画用にプロセッシングするまで、凍結した。

20

【0201】

実施例18：アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素およびアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素を発現するバキュロウイルスの同時感染

Sf9細胞は、ステロイド11アルファ水酸化酵素cDNAを含有するウイルス粒子およびA.オクラセウスNADPH P450酸化還元酵素を含有する別個のウイルスに同時感染させる。両ウイルスは、感染効率(MOI)比0.1：0.01(11aOH対oxr)で添加する。感染1日後、0.9μg/ml塩化ヘミンを培養に添加する。細胞は、感染3日後、遠心分離によって採取し（異なって明記しない限り）、そして洗浄した細胞ペレットを細胞成分分画用にプロセッシングすることを要する、続く実験で必要になるまで、凍結する。

30

【0202】

実施例19：バキュロウイルス感染昆虫細胞からの細胞成分分画の調製

感染sf9細胞および未感染対照細胞由来の細胞ペースト1/2グラムを融解し、そしてpH7.4に調整した10mM K₂HPO₄を含む0.25Mスクロース40mlに懸濁した。懸濁物は、Fisher Sonic Dismembrator、モデル300プローブ超音波処理装置(Fisher Scientific、ミズーリ州セントルイス)を用いてホモジナイズした。試料を円錐状遠心分離試験管(Corning Costar Corporation、マサチューセッツ州ケンブリッジ)に移し、そして5で15分間、500×gの遠心分離に供した。ペレットを同体積の新鮮な緩衝液に再懸濁し、そして顕微鏡下で可視化して、完全な溶解を確認した。全細胞は、ほとんどまたはまったく観察されなかった。その後、上清を5で30分間、10,000×gの遠心分離に供して、ミトコンドリア、ゴルジおよび他の細胞下器官を収集した。ペレットを新鮮な緩衝液に再懸濁し、そして5で30分間、7,800×gの遠心分離に供して、ミトコンドリアを収集した。

40

【0203】

ミトコンドリアペレットを、上述のように緩衝液に再懸濁し、そして遠心分離を反復した。ミトコンドリアペレットを2mlの緩衝スクロース溶液に再懸濁し、そして100ulアリコット中、-80で保存した。

【0204】

50

最初のミトコンドリア分画由来の上清を、5 で1時間、200,000 × g の遠心分離に供した。ミクロソームペレットを2 ml の緩衝スクロース溶液に再懸濁し、そして100 μl アリコット中、-80 で保存した。

【0205】

ミクロソームインキュベーション

インキュベーション混合物は、100 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.4 または 150 mM HEPES 緩衝液、pH 7.4 中の、Sf9 ミクロソーム (1.0 mg タンパク質/ml 最終濃度)、NADPH 生成系および 250 μM 基質 (AD) からなった。NADPH 生成系は、示した最終濃度の以下で構成された: MgCl₂ (7.5 mM)、D-グルコース-6-リン酸 (7.5 mM)、NADP (0.80 mM)、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (1.0 単位/ml)。インキュベーションは、水槽中、37 で示した時間行った。インキュベーション後、反応は、0.3 ml メタノールの添加によって終結させた。試料を2秒間3回ボルテックスし、そして氷上に置くか、または後の解析のため、-70 で保存した。

10

【0206】

実施例 20: 水酸化対応物へのステロイド基質の変換を測定する HPLC アッセイ

高性能液体クロマトグラフィー (HPLC)

アンドロステンジオンから 11α-ヒドロキシアンドロステンジオンのように、ステロイド基質から水酸化ステロイド化合物を分離するのに用いる HPLC 法は、Sonderf an r, Arch. Biochem. Biophys. 255:27-41, 1987 に記載される、テストステロン水酸化酵素アッセイの修飾型である。アンドロステンジオンおよび 11-ベータ-ヒドロキシアンドロステンジオンの標準は、Sigma から得た。11-アルファ-ヒドロキシアンドロステンジオン (89.5% 純粋、主要な不純物はアンドロステンジオン) は、Searle Medicinal Chemistry に提供された。HPLC 等級の水およびメタノールは、Burdick & Jackson から得た。

20

【0207】

HPLC 系は、モデル 1050 シリーズのポンプ、自動注入装置および可変波長検出装置 (Hewlett-Packard、イリノイ州ネーパービル) およびモデル TC-50 温度調節装置およびモデル CH-30 カラム加熱装置 (どちらも Eppendorf、ウイコンシン州マディソン) からなった。

30

【0208】

11 水酸化酵素および相補的電子輸送タンパク質を発現する組換えバキュロウイルスでトランスフェクションした昆虫細胞由来の細胞膜分画は、最終体積 200 μl 中に、80 mM リン酸緩衝液、pH 7.4、8 mM MgCl₂、および 0.9 mM NADP⁺ を含有する反応混合物中で、11 水酸化酵素活性に関して解析した。同等物が減少する適切な供給源を保証するため、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (1.5 U/ml) および 8 mM グルコース-6-リン酸を添加することによって、NADPH 再生系を提供した。ステロイド基質 (例えばアンドロステンジオン) は、最終濃度 0.3 mM で提供した。反応混合物は、37 で30分間インキュベーションした。反応は、200 μl メタノールの添加によって終結させ、そしてその後、氷上に置いた。試料は、遠心分離によってペレットにして、沈殿したタンパク質を除去した。

40

【0209】

ある場合、インキュベーションは、シリコン処理ポリプロピレン 1.5 ml 微量遠心分離試験管中、0.5 ml の体積で、37 で120分間行った。ミクロソームまたはミトコンドリア分画から調製した酵素を添加し、そして基質を 250 μM (例えば AD の 25 mM メタノールストック溶液) の濃度で添加した。補助因子緩衝液は、100 mM リン酸カリウム、pH 7.4、7.5 mM MgCl₂、7.5 mM グルコース-6-リン酸、0.80 mM NADP、および 1.0 単位/ml グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼであった。HPLC 試料は、0.3 ml メタノールの添加によって、0.5 ml 反応混

50

合物を終結させ、2秒間3回ボルテックスして、そして氷上に保存することによって調製した。試験管は、微量遠心分離装置中、 $\sim 20,000 \times g$ で5分間回転させ、そして自動試料収集バイアルに試料を移し、そしてふたをした。

【0210】

反応混合物および培地抽出物に存在するステロイド構成要素は、 $250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ Vydac分析C-4カラムを用いた逆相HPLCによって、分離してそして解析した。クロマトグラムは、10分間の期間に渡る、40%から100%メタノールの溶媒勾配を用い、そして最初の条件に再平衡化する前に、100%メタノールで5分間維持して、展開した。カラム溶出物は、254および220nm両方でUV吸光度に関して監視した。

10

【0211】

アンドロステンジオン、テストステロンおよび水酸化アンドロステンジオン代謝産物は、40および1.0mlの移動相/分で、0.22ミクロンRheodyneプレカラムフィルターを備えた、Nova-pak C18カラム、4ミクロン、 $3.9 \times 150 \text{ mm}$ (Waters Chromatography、マサチューセッツ州ミルフォード)上で分離した。移動相溶媒Aとして水を、そして溶媒Bとしてメタノールを用いる、段階的勾配を利用した。溶媒Bの最初の濃度は、42%で6分間であった。Bの割合は、4分間に渡って、直線的に45%に増加させ、そしてその後、3分間保持した。その後、Bの割合は、10分間に渡って、直線的に80%に増加させ、そしてそこでさらに2分間保持し、総運転時間は25分間であった。紫外検出波長は247nmであり、そして注入体

20

【0212】

「ミトコンドリア」試料および「ミクロソーム」試料はどちらも、 11α -ヒドロキシアンドロステンジオン標準のHPLC保持時間と一致するピークを生じ、一方、他の分画は、該ピークを生じなかった。これらの「ミトコンドリア」および「ミクロソーム」ピークは、それぞれ、247nmで定量化した総ピーク面積の3.2および2.3%であった。また、 11α -ヒドロキシアンドロステンジオン標準を、 $5.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、ブランクミクロソームインキュベーション試料にスパイクした。「ミトコンドリア」および「ミクロソーム」 11α -ヒドロキシアンドロステンジオンピークの濃度は、標準の純度を訂正(89.5%)した後、1.75および1.31 $\mu\text{g/ml}$ であった。これらの濃度は、250 μM の基質濃度を用いて、2.3および1.7%の基質が 11α -ヒドロキシアンドロステンジオンに変換されたのに相当した。

30

【0213】

図16は、アスペルギルス・オクラセウス 11α アルファ水酸化酵素およびヒト酸化還元酵素を発現する、バキュロウイルス感染昆虫細胞から調製した細胞成分分画とADをインキュベーションした後の、 11α アルファヒドロキシ対応物へのアンドロステンジオン(AD)の変換を例示するHPLC追跡を示す。

【0214】

実施例21：合成ペプチドに対して生成したポリクローナル抗体を用いた免疫ブロッティングによる、アスペルギルス・オクラセウス 11α アルファ水酸化酵素およびアスペルギルス・オクラセウスNADPHチトクロムP450還元酵素の認識

40

Sf9細胞溶解物由来のタンパク質(未感染および組換えバキュロウイルス感染細胞から得た)を、等濃度(ウェルあたり10 μg)で、10%勾配アクリルアミドミニゲル(BioRad、カリフォルニア州ハーキュルス)のレーンに装填した。タンパク質は、0.1%SDS(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を含有するTris-グリシン緩衝液でおよそ1時間、16mAmp定電流の電気泳動によって分離した。タンパク質は、70mAmp定電流で、40分間、ニトロセルロース(Schleicher & Schuell、ニューハンプシャー州キーン)に移した。一次抗体を1:10に希釈し(抗 11α アルファ水酸化酵素のIgG(ペプチド11aOHペプチド2 CRQILTPYIH K R K S L K G T T D(配列番号24)から調製した抗体GN-1187およびGN-1

50

188) 0.34 mg/ml、および抗oxredのIgG (oxrペプチド1 C T Y W A V A K D P Y A S A G P A M N G (配列番号26) から調製した抗体GN-2023 およびGN-12024) 0.26 mg/mlのストック濃度から)、そしてニトロセルロース膜を探查するのに用いた。抗原は、製造者(New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー) に推奨されるように、抗ウサギセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP) 連結二次抗体を用いて検出した。化学発光は、販売者に提供されるプロトコルにしたがって、ルミノールおよびペルオキシド試薬(New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー) を用いて検出した。光放出は、X-OMAT ARフィルム(Eastman Kodak Company、ニューヨーク州ロチェスター) を用いて記録した。画像は、Minolta Dimage Vデジタルカメラ(Minolta Corporation、ニュージャージー州ラムゼイ) を用いて記録した。 10

【0215】

実施例22：11アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素をコードするアスペルギルス・オクラセウス・ゲノムDNAの性質決定

上述のアプローチを用いて、アスペルギルス・オクラセウス、並びにクロコウジカビおよびアスペルギルス・ニダランスを含む、緊密に関連する微生物のゲノム内でステロイド水酸化酵素および酸化還元酵素をコードする遺伝子の同定を容易にすることが可能である。他の好ましい生物は、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、ストレプトミセス・フラディエー、巨大菌、シュードモナス・クルシビエー、トリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム f. sp. セベー、リゾプス・アーヒズス、およびモノスポリウム・オリバセウムである。ステロイド11アルファ水酸化酵素活性を有することが知られる、他の好ましい生物が、上の、本発明の詳細な説明に記載される。 20

【0216】

簡潔には、ゲノムDNAを調製し、そして細菌中で増殖する低コピー人工染色体にショットガンクローニングする。多数のクローンを配列決定して、全ゲノムの統計的提示を確実にし、そして重複クローンの配列を統合して、ゲノムの最終マップおよび配列を生じる。オープンリーディングフレームの解析は、BLAST、CLUSTAL W、およびBoxShadeなどの、ヌクレオチドおよびタンパク質配列データの多数の配列アラインメントを容易にするよう設計されたプログラムを用いて、本発明のステロイド水酸化酵素および酸化還元酵素遺伝子に相同な領域、並びにこれらの酵素に相同な、翻訳されるオープンリーディングフレームの領域を明らかにするであろう。これらのタンパク質をコードする遺伝子を、人工染色体から得て、そしてpFastBac1などの発現ベクターに再度クローニングし、適切な宿主細胞に形質転換し、これを、酸化対応物へのステロイド基質の変換を実行可能な酵素の存在に関してアッセイする。 30

【0217】

本発明の範囲は、付随する請求項を参照することによって決定することを意図する。現在記載されているような本発明に、本発明の利点のいずれも危うくすることなく、本発明の範囲および精神から逸脱しない、いくつかの変動を加えることが可能であると認識される。これらには、ステロイド基質の11アルファ水酸化を実行することが知られる微生物、好ましくは真菌および細菌由来の相同遺伝子の単離が含まれる。本発明はまた、類似の構成要素のいかなる置換にも向けられる。これには、限定されるわけではないが、コア分子の他の部位で作用する水酸化酵素を含む、ステロイド生成に関与する他のP450を単離するための、これらの技術の使用、および修飾宿主微生物におけるステロイド中間産物の生物変換を容易にするための、これらの酵素の使用が含まれる。 40

【0218】

本明細書に引用するすべての参考文献、特許、または出願は、本明細書に記載されるかのように、その全体が本明細書に援用される。

【0219】

参考文献

- Altschul S F; Gish W; Miller W; Myers E W; Lipman D J 基本的局所並列検索ツール。 J. Molec. Biol. (1990 Oct 5), 215(3), 403-10. Anfossi R, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:3379-3383 (1989)
- Arfin R Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:7714-7718 (1995)
- Armour R, FEBS Lett. 307:113-115 (1992)
- Baldwin R, Gene Ther. 4:1142-1149 (1997)
- Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88 10:189-193 (1991)
- Bassat R, J. Bacteriol. 169:751-757 (1987)
- Baum R, J. Hematother. 5:323-329 (1996)
- Becker R, EMBO J. 8:3685-3691 (1989)
- Ben-Bassat R, J. Bacteriol. 169:751-757 (1987)
- Berkner, BioTechniques 6:616-629 (1988)
- Berkner, Current Top. Microbiol. Immunol. 158:39-66 (1992)
- Blobel および Dobberstein, J. Cell Biol. 67:8 20:35-851 (1975)
- Boris-Lawrie および Temin, Annal. New York Acad. Sci. 716:59-71 (1994)
- Boris-Lawrie および Temin, Curr. Opin. Genet. Dev. 3:102-109 (1993)
- Bostian R, Cell 36:741-751 (1984)
- Botstein R, Ann. J. Hum. Genet. 32:314-331 (1980)
- Bregni R, Blood 80:1418-1422 (1992)
- Breskvar K, Cresnar B, Plaper A, Hudnik-Plevnik T. リゾプス・ニグリカンス由来のステロイド水酸化酵素チトクロム P-450 をコードする遺伝子の、ゲノム DNA の Hind III 断片内での位置決定。 Biochem. Biophys. Res. Commun 1991;178, 1078-1083.
- Brody および Crystal, Annal. New York Acad. Sci. 716:90-103 (1994)
- Capecci, Cell 22:479-488 (1980)
- Chen R, Gene Ther. 5:50-58 (1998)
- Clapp, Clin. Perinatol. 20:155-168 (1993)
- Collins: Alternative Immunoassays 中, John 40:Wiley & Sons, NY (1985)
- Corbi および Lopez-Rodriguez, Leuk. Lymphoma 25:415-425 (1997)
- Crabeel R, EMBO J. 2:205-212 (1983)
- Curie R, Hum. Gen. Ther. 3:147-154 (1992)
- Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)
- Czerwinski, M., Sahni, M., Madan, A. および Parkinson, A. ヒト CYPOR の多型: 新規対立遺伝子の発現。 未公表、直接提出 [AAG09798]

- Dattaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3324-2238 (1988)
- Derynckら, Nucleic Acids Res. 11:1819-1837 (1983)
- Dobsonら, Nucleic Acids Res. 11:2287-2302 (1983)
- Dunbarら, Blood 85:3048-3057 (1995)
- Dutta TK, Datta J, Samanta TB: in situ発芽による、アスペルギルス・オクラセウスTSの固定胞子における新規触媒活性の開始: C17-C20溶解がステロイドの11 α 水酸化に付随する。 Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:119-123 (1993) 10
- EglitisおよびAnderson, Biotechniques, 6:608-614 (1988)
- ELISA and Other Solid Phase Immunoassays (Kemenyら監修), John Wiley & Sons, NY (1988)
- Elshamiら, Cancer Gene Ther. 4:213-221 (1997)
- Engel, L.およびWhite, J. 100および60 kDa表面タンパク質に対する抗体は、げっ歯類骨格筋芽細胞の基層付着および分化を阻害する。 Dev Biol. 140:196-208, 1990 20
- Fackrell, Clin. Immunoassay 8:213-219 (1985)
- Fernandez de Henestrosaら, FEMS Microbiol. Lett. 147:209-213 (1997)
- Frohman, M.A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:8998-9002 (1988)
- Frommら, Nature 319:791 (1986)
- Frommら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:5824-5828 (1985)
- Gerwitzら, Science 242:1303-1306 (1988) 30
- Ghosh D, Samanta TB. アスペルギルス・オクラセウスTSの細胞不含調製によるプロゲステロンの11 α 水酸化。 J. Steroid Biochem. 1981;14, 1063-1067.
- Goffら, EMBO J. 9:2517-2522 (1990)
- Goodchildら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5507-5511 (1988)
- Goodhue, Charles T. “有機化合物の微生物転換の方法論”: Rosazza, John P.監修 Microb. Transform. Bioact. Compd., 1:9-44, 1982.
- Grahamおよびvan der Eb, Virology 54:536-539 (1973) 40
- Grayら, Proc. R. Acad. Soc. Lond. 243:241-253 (1991)
- Griffithsら Chem. Biol. 4:461-471 (1997)
- Griffithsら, Biochem. J. 241:313-324 (1987)
- GuarenteおよびPtashne, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78:2199-2203 (1981)
- Gusella, Ann. Rev. Biochem. 55:831-854 (1986) 50

- Hallekら, Cytokines Mol. Ther. 2:69-79(1996)
- Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T.D.およびShively, J.E. ブタ肝臓ミクロソーム由来のNADPH-チトクロムP-450還元酵素の完全アミノ酸配列。 Biochemistry 25(24), 7906-7911(1986)[P04175]
- Haniu, M., McManus, M.E., Birkett, D.J., Lee, T.D.およびShively, J.E. ヒト肝臓由来のNADPH-チトクロムP-450還元酵素の構造的および機能的解析:ヒト酵素の完全配列およびNADPH結合部位。 Biochemistry 28(21), 8639-8645(1989)[P16435]. 10
- HarleyおよびReynolds, Nucleic Acids Res. 15:2343-2361(1987)
- HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual中, Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1988)
- HarmsおよびSplitter, Hum. Gene Ther. 6:1291-1297(1995)
- Hasanら, Gene 56:141-151(1987)
- Hattoriら, Genes Dev. 6:609-618(1992) HawleyおよびMcClure, Nucleic Acids Res. 11:2237-2255(1983) 20
- Haymesら Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, ワシントンDC(1985)
- Hillelら, Anim. Genet. 20:145-155(1989)
- Hillelら, Genet. 124:783-789(1990)
- Hitzemanら, Nature 293:717-722(1981)
- Holtら, Molec. Cell. Biol. 8:963-973(1988) 30
- Ingberら Nature 348:555-557, (1990)
- Janknechtら, Carcinogenesis 16:443-450(1995)
- Janknecht Immunobiology 193:137-142(1995)
- Jayanthi CR, Madyastha P, Madyastha KM. アスペルギルス・オクラセウスにおけるプロゲステロンのミクロソーム11 α 水酸化:第一部:水酸化酵素系の性質決定。 Biochem. Biophys. Res. Commun. 106:1262-1268, 1982.
- Jeffersonら, EMBO J. 6:3901-3907(1987) 40
- Jefferson Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405(1987)
- Jeffreysら, Amer. J. Hum. Genet. 39:11-24(1986)
- Jeffreysら, Anim. Genet. 18:1-15(1987)
- Jeffreysら, Nature 316:76-79(1985)
- JohnstonらおよびTang, Methods Cell Biol. 43:353-365(1994)
- Jonesら, Eur. J. Haematol. 39:144-147(1987) 50

- Juliusら, Cell 32:839-852(1983)
- Juliusら, Cell 36:309-318(1984)
- Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Ymano, T.およびOhkawa, H. ウサギ肝臓NADPH-チトクロムP-450還元酵素mRNAの全長cDNAの分子クローニングおよび配列解析。 J. Biochem. 100(4), 945-954(1986)[P00389]
- KendallおよびBradshaw, J. Biol. Chem. 267:20667-20673(1992)
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S.G., Park, C., Vederas, J.C.およびHutchinson, C.R. ロバスタチン生合成中、アクセサリータンパク質がポリケチドシンターゼ活性を変調する。 Science(1999) 印刷中 LOCUS AAD34552.528aa PLN 02-JUN-1999 Kieslich, K.; Sebek, O.K. “ステロイドの微生物転換。” Ges. Biotechnol. Forsch. Braunschweig-Stoeckheim, Fed. Rep. Ger. Annu. Rep. Ferment. Processes, 3:275-304., 1979.
- Kieslich, Klaus. “ステロイド変換。” Ges. Biotechnol. Forsch. m.b.H., Braunschweig-Stoeckheim, Fed. Rep. Ger. Econ. Microbiol. 5(Microb. Enzymes Bioconvers.), 369-465, 1980.
- KingおよびPossee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, ロンドン, Chapman & Hall
- KurjanおよびHerskowitz, Cell 30:933-943(1982)
- Kusakaら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 174:1070-1076(1991)
- Kwohら, Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 86:1173(1989)
- Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Workら, North Holland Publishing Company, NY(1978)
- Lacour, Thierry, Tilman AchstetterおよびBruno Dumas. “酵母由来の組換え体アドレノドキシン還元酵素相同体(Arh1p)の性質決定” Journal of Biological Chemistry 273, 23984-23992(1998). Landegrenら, Science 241:1077-1080(1988)
- Langer R.ら, Chem. Tech. 12:98(1982)
- LiおよびChang, Biochem. Biophys. Res. Comm. 227:152-159(1989)
- Lorzら, Mol. Gen. Genet. 199:178(1985)
- Luら, J. Exp. Med. 178:2089-2096(1993)
- Luckowら, J. Virol. 67:4566-4579(1993)
- Luckow, V.A.: Protein Eng. J. L. Cleland. 中, Wiley-Liss, ニューヨーク州ニューヨーク:183-2180(1996)
- MakovecおよびBreskvar, 糸状真菌、リゾプス・ニグリカンス由来のチ

- トクロムP450の精製。 Pflugers Arch - Eur J. Physiol 439 (Suppl): R111 - R112, 2000.
- Makovec T, Breskvar K. “糸状真菌、リゾプス・ニグリカンス由来のNADPH - チトクロムP450還元酵素の精製および性質決定。” Arch Biochem Biophys. 357, 310 - 6 (1998)
- Marcotte R, Nature 335: 454 - 457 (1988)
- Marsh, Nucleic Acids Res. 14: 3603 (1986)
- McCarty R, Cell 66: 895 - 905 (1991)
- McCowen R, Science 113: 202 - 203 (1951)
- Miller Current Top. Microbiol. Immunol. 10 158: 1 - 24 (1992)
- Miller R, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 91: 2473 - 2477 (1987)
- Moore R, Genomics 10: 654 - 660 (1991)
- MoriおよびPrager, Leuk. Lymphoma 26: 421 - 433 (1997)
- Mouyna, I.およびBrygoo, Y. フザリウム・オキシスポルム f. sp. エレーディス (Fusarium oxysporum f. sp. elaeidis) チトクロムP450遺伝子の反復配列による破壊 未公表 LOCUS CAA57874 294aa PLN 21 - JUL - 1997 20
- Mullis R, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263 - 273 (1986)
- Myers EW, Miller W. “規則的な発現のおよそのマッチング” Bull Math Biol. 51: 5 - 37 (1989).
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, および Nebert DW. P450スーパーファミリー: 新規配列、遺伝子マッピング、寄託番号および命名法に関する最新情報 Pharmacogenetics 1996; 6, 1 - 42. 30
- Ngo R: Enzyme Mediated Immunoassay 中, Plenum Press, NY (1985)
- Nickerson R, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87: 8923 - 8927 (1990)
- 著者なし 線虫C.エレガンス (C. elegans) のゲノム配列: 生物学研究のプラットフォーム。C.エレガンス配列決定コンソーシアム。 Science 282 (5396), 2012 - 2018 (1998) [公表正誤表は、Science 1999 Jan 1; 283 (5398): 35 および 1999 Mar 26; 283 (5410): 2103 および 1999 Sep 3; 285 (5433): 1493 に見られる] LOCUS CAA91268 510aa INV 13 - JUL - 2000 40
- Norman R, Vaccine 15: 801 - 803 (1997)
- Nussbaumer R, FEMS Microbiol. Lett. 118: 57 - 63 (1994)
- O'Neil R, Transplant Proc. 23: 2862 - 2866 (1991)
- Obukowicz R, Applied Environmental Microbiology 58: 1511 - 1523 (1992)
- Ohara R, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 5673 - 5677 (1989) 50

- Ohgiya, S., Shinriki, N., Kamatani, T. およ
び Ishizaki, K. マウス NADPH - チトクロム P - 450 酸化還元酵素：
分子クローニングおよび酵母における機能的発現。 *Biochim. Biophys*
. Acta 1186 (1 - 2), 137 - 141 (1994) [BAA04496
P37040] .
- O'Reillyら, *Baculovirus Expression Vector*
s: A Laboratory Manual. ニューヨーク, W.H. Free
man and Company (1992)
- Owら, *Science* 234: 856 - 859 (1986)
- Pesceckisら, *J. Biol. Chem.* 267: 5107 - 5114 (10
1993)
- Porter, T.D. および Kasper, C.B. ラット NADPH - チトク
ロム P - 450 酸化還元酵素 cDNA のコードヌクレオチド配列およびフラビン結合ドメ
インの同定。 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (4),
973 - 977 (1985) [P00388]
- Potrykusら, *Mol. Gen. Genet.* 205: 193 - 200 (1986)
- Rachalら, *EXS* 64: 330 - 342 (1993)
- Rayら, *Adv. Exp. Med. Biol.* 280: 107 - 111 (1
990) 20
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16
版, Osol 監修, Mack, ペンシルバニア州イーストン (1980)
- Roderick および Matthews, *Biochemistry* 32: 390
7 - 3912 (1993)
- Romanosら, *Yeast* 8: 423 - 488 (1992)
- Roseら, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78:
2460 - 2464 (1981)
- Rothman および Orci, *Nature* 355: 409 - 415 (1992)
- Samanta TB, Ghosh DK アスベルギルス・オクラセウス TS のプロ
ゲステロン 11 アルファ水酸化酵素の性質決定: チトクロム P - 450 連結モノオキシゲ 30
ナーゼ *J Steroid Biochem* 28, 327 - 32 (1987)
- Samanta TB, Roy N, Chattopadhyay. アスベルギル
ス・オクラセウス TS によるプロゲステロンの改善された 11 α 水酸化。 *Bioche*
m. J. 1978; 176, 593 - 594 .
- Sambrookら, *Molecular Cloning, A Laborato*
ry Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press
, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (1989) Schroeder, G
, Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmi
dt, J., Strack, D. および Schroeder, J. インドール 40
アルカロイド生合成における光誘導チトクロム P 450 依存酵素: タバーソニン (tab
ersonine) 16 - 水酸化酵素。 *FEBS Lett.* 458, 97 - 10
2 (1999) LOCUS CAB56503 495aa PLN 23 - SEP -
1999 Schulte, U., Aign, V., Hoheisel, J.,
Brandt, P., Fartmann, B., Holland, R.,
Nyakatura, G., Mewes, H.W. および Mannhaupt,
G., 未公表 LOCUS CAB91316 514aa PLN 11 - MAY -
2000
- Serfingら, *Biochim. Biophys. Acta* 1263: 18
1 - 200 (1995)
- Shannonら, *Crit. Rev. Immunol.* 17: 301 - 323 50

(1997)

- Shephard, E.A., Palmer, C.N., Segall, H. J. および Phillips, I.R. ヒト組織におけるチトクロム P450 還元酵素遺伝子発現の定量化。 Arch. Biochem. Biophys. 294(1), 168-172 (1992) S90469 [AAB21814]
- Sidman U.ら, Biopolymers 22:547 (1983) Siminszky, B., Corbin, F.T., Ward, E.R., Fleischmann, T.J. および Dewey, R.E. 酵母およびタバコにおいて、ダイズチトクロム P450 モノオキシゲナーゼ cDNA の発現は、フェニル尿素除草剤の代謝を増進する。 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(4), 1750-1755 (1999) LOCUS AAB94588 510aa PLN 02-MAR-1999
- Sinら Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 94:6099-6103 (1997)
- Skolnick, M.H.ら, Cytogen. Cell Genet. 32:58-67 (1982)
- Slijkhuis, Herman; Smaal, Eric Bastiaan; Selten, Gerardus Cornelis Maria. (Rousseil-UC LAF, Fr.). 組換え宿主において操作可能なヒドロコルチゾン生合成酵素発現カセット。 U.S. (1999), 102pp., 米国特許出願第54, 185号の一部継続出願、放棄。 CODEN: USXXAM US 5869283 A 19990209.
- Smith KE, Ahmed F, Williams RA, Kelly SL. “ステロイドの微生物変換 - - VII. アスペルギルス・フミガツスの全細胞およびミクロソームによるプロゲステロンの変換” J Steroid Biochem Mol Biol 49, 93-100 (1994).
- Sonderfan, A.J., Arlotta, M.P., Dutton, D.R., McMillen, S.K., および Parkinson, A.J. ラット肝臓ミクロソーム・チトクロム P-450 による、テストステロン水酸化の制御 Arch. Biochem. Biophys. (1987) 255:27-41.
- Suら, Gene 169:17-23 (1996)
- Sunら, Curr. Top. Microbiol. Immunol 211:173-187 (1996)
- Sutcliffeら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 75:3737-3741 (1978)
- Takaiら, Princess Takamatsu Symp. 22:197-204 (1991)
- Tan L, Falardeau P. アスペルギルス・オクラセウス由来の細胞不含調製による、プロゲステロン-4-¹⁴C の 11 α 水酸化および分解 J. Steroid Biochem. 1:221-227, 1970. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 配列加重およびギャップ切除の使用を介したプロファイル検索の改善された感度。 Comput Appl Biosci. 10:19-29, 1994.
- Thompson, Julie D., Desmond G. Higgins, および Toby J. Gibson, CLUSTAL W: 配列加重、位特異的ギャップペナルティおよび加重マトリックス選択を介した進行性多数配列並列の感度の改善。 Nucleic Acids Research, 22(22):4673-4680, 1994.
- Timberlake WE, Hamer JE. アスペルギルス・ニダランスにおける分生子柄発生中の遺伝子活性の制御, p. 1-29. Setlow JK およ

- びHollaender A (監修), Genetic Engineering 1986; vol 8. 中, Plenum Publishing Corp., ニューヨーク.
- Tongら, Anticancer Res. 18:719-725 (1998)
- Tudzynski, B. およびHoelter, K. ジベレラ・フジクロイ (Gibberella fujikuroi) 由来のP450モノオキシゲナーゼ遺伝子の性質決定。未公表 LOCUS CAA76703 525aa PLN 07-JAN-1999
- Tudzynski, B. およびHoelter, K. ジベレラ・フジクロイにおけるジベレリン生合成経路: 遺伝子クラスターの証拠。Fungal Genet. Biol. 25(3), 157-170 (1998) [CAA75565 CAA75566 CAA75567]
- Tuiteら, EMBO J. 1:603-608 (1982)
- Uchimiyaら, Mol. Gen. Genet. 204:204 (1986)
- Valenzuelaら, Nature 298:347-350 (1982)
- van den Brink, Hans (J.) M., Robert F. M. van Gorcom, Cees A. M. J. J., van den Hondel, およびPeter J. Punt. “真菌におけるチトクロムP450酵素系” Fungal Genetics and Biology 23, 1-17 (1998).
- van den Brink, J., van Zeijl, C., van den Hondel, C. およびvan Gorcom, R. クロコウジカビのNADPHチトクロムP450酸化還元酵素 (cprA) 遺伝子のクローニングおよび性質決定。未公表 [CAA81550、Z26938].
- Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:6099-6103 (1992)
- Walkerら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:392-396 (1992)
- Wang, Regina W.; Lu, Anthony Y. H. ヒトCYP3A4に対する阻害性抗ペプチド抗体。Drug Metab. Dispos. 25(6), 762-767, 1997
- Weinbergら, Gene 126:25-33 (1993)
- Weisemannら, Biochimie 73:457-470 (1991)
- Wickstromら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:1028-1032 (1988)
- WongおよびNeumann Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:584-587 (1982)
- Wuら, J. Biol. Chem. 268:10796-10781 (1993)
- Wuら, Genomics 4:560 (1989)
- Yabusaki, Y., Murakami, H. およびOhkawa, H. クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列から推定した、サッカロミセス・セレピシエNADPH-チトクロムP450還元酵素の一次構造。J. Biochem. 103(6), 1004-1010 (1988) [BAA02936].
- Yamano, S., Aoyama, T., McBride, O. W., Hardwick, J. P., Gelboin, H. V. およびGonzalez, F. J. ヒトNADPH-P450酸化還元酵素: 相補DNAクローニング、配列およびワクシニアウイルス仲介発現およびCYPOR遺伝子の染色体7への位置決定。Mol. Pharmacol. 36(1), 83-88 (1989) [A60557]

Yanish-Perronら Gene 33:103-119 (1985) Yolk
 en Rev. Infect. Dis. 4:35 (1982)
 Zamechikら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)
 83:4143-4146 (1986)

【図面の簡単な説明】

【図1】 アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列。

アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列（それぞれ配列番号1、配列番号2）を示す。

10

【図2】 ヒト酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列。

ヒト酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列（それぞれ配列番号3、配列番号4）を示す。本明細書に開示するように、ヒトHepG2細胞由来のRNAをテンプレートとして用いたRT-PCRによって調製したcDNAライブラリーから独立にクローニングしたヒト酸化還元酵素の予測されるアミノ酸配列は、3つの異なる研究室によって先に報告されたものとマッチする。これらの遺伝子座のGenBank寄託番号には、A60557（NADPH-フェリヘモタンパク質還元酵素（EC1.6.2.4）-ヒト）；AAG09798（NADPH-チトクロムP450還元酵素[ホモ・サピエンス]）、およびP16435（NADPH-チトクロムP450還元酵素（CPR）（P450R））が含まれる。

20

AAB21814のアミノ酸配列（チトクロムP450還元酵素{EC1.6.2.4}[ヒト、胎盤、ペプチド部分的、676aa]）は、4残基で、ヒト酸化還元酵素A60557およびP16435と異なる；500でA→V、518でF→L、537でV→W、および538でA→H。AAB21814には、最初のメチオニンも欠けている。AAB21814の同族核酸（S90469[チトクロムP450還元酵素[ヒト、胎盤、mRNA部分的、2403nt]））は、最初のメチオニンのATGコドンに欠け、そして1496でのC→T変化、1551でのC→A変化、および1616でTが付加されることで回復する1605でのGの欠失によるフレームシフトを含む。

これらの遺伝子座に関する参考文献は以下のとおりである：A60557[Yamano, S., Aoyama, T., McBride, O.W., Hardwick, J.P., Gelboin, H.V.およびGonzalez, F.J. ヒトNADPH-P450酸化還元酵素：相補DNAクローニング、配列およびワクシニアウイルス仲介発現およびCYPOR遺伝子の染色体7への位置決定 Mol. Pharmacol. 36(1), 83-88 (1989)]；AAG09798[Czerwinski, M., Sahnii, M., Madan, A.およびParkinson, A. ヒトCYPORの多型：新規対立遺伝子の発現。未公表、直接提出]；およびP16435[Haniu, M., McManus, M.E., Birkett, D.J., Lee, T.D.およびShively, J.E. ヒト肝臓由来のNADPH-チトクロムP-450還元酵素の構造的および機能的解析：ヒト酵素の完全配列およびNADPH結合部位。 Biochemistry 28(21), 8639-8645 (1989)]；AAB21814[Shephard, E.A., Palmer, C.N., Segall, H.J.およびPhillips, I.R. ヒト組織におけるチトクロムP450還元酵素遺伝子発現の定量化。 Arch. Biochem. Biophys. 294(1), 168-172 (1992)]；S90469[Shephard, E.A., Palmer, C.N., Segall, H.J.およびPhillips, I.R. ヒト組織におけるチトクロムP450還元酵素遺伝子発現の定量化。 Arch. Biochem. Biophys. 294(1), 168-172 (1992)]。

30

40

【図3】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列。

50

アスペルギルス・オクラセウス 11 酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列（それぞれ配列番号 5、配列番号 6）を示す。

【図 4】 A. オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素と、GenBank 由来の上位 10 BLAST ヒットのアミノ酸相同性並列。

プラスミド pMON45624（配列番号 01）にクローニングしたアスペルギルス・オクラセウス、ステロイド 11 アルファ水酸化酵素（配列番号 02）は、ヒューリスティックマッチングアルゴリズム（Altschul, J. Mol. Biol. Oct 5; 215(3): 403-10, 1990）を実行する BLASTP プログラムを用いて、GenBank に見出される関連酵素と並列した。上位 10 マッチの GenBank 寄託番号（そのありうる機能、[属および種]）は以下のとおりである：CAA75565（チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [ジベレラ・フジクロイ]）；CAB91316（おそらくチトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (lovA) [アカパンカビ (Neurospora crassa)]）；CAB56503（チトクロム P450 [ニチニチソウ (Catharanthus roseus)]）；AAB94588（CY P71D10p [ダイズ (Glycine max)]）；CAA75566（チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [ジベレラ・フジクロイ]）；AAD34552（チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [アスペルギルス・テレウス (Aspergillus terreus)]）；CAA75567（チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ [ジベレラ・フジクロイ]）；CAA76703（チトクロム P450 [ジベレラ・フジクロイ]）；CAA57874（未命名タンパク質産物 [フザリウム・オキシスポルム]）；CAA91268（チトクロム P450 ~ cDNA に類似 EST yk423b11.3 がこの遺伝子から得られる [線虫 (Caenorhabditis elegans)]）。

これらの遺伝子座の参考文献は以下のとおりである：CAA75565 [Tudzynski, B. および Holter, K., ジベレラ・フジクロイにおけるジベレリン生合成経路：遺伝子クラスターの証拠。Fungal Genet. Biol. 25(3), 157-170 (1998)]；CAB91316 [Schulte, U., Aign, V., Hoheisel, J., Brandt, P., Fartmann, B., Holland, R., Nyakatura, G., Mewes, H.W. および Mannhaupt, G., 未公表]；CAB56503 [Schroeder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D. および Schroeder, J. インドールアルカロイド生合成における光誘導チトクロム P450 依存酵素：タバコニン 16 - 水酸化酵素。FEBS Lett. 458, 97-102 (1999)]；AAB94588 [Siminszky, B., Corbin, F.T., Ward, E.R., Fleischmann, T.J. および Dewey, R.E. 酵母およびタバコにおいて、ダイズ・チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ cDNA の発現は、フェニル尿素除草剤の代謝を増進する。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(4), 1750-1755 (1999)]；CAA75566 [Tudzynski, B. および Holter, K. ジベレラ・フジクロイにおけるジベレリン生合成経路：遺伝子クラスターの証拠。Fungal Genet. Biol. 25(3), 157-170 (1998)]；AAD34552 [Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S.G., Park, C., Vederas, J.C. および Hutchinson, C.R. ロバスタチン生合成中、アクセサリータンパク質がポリケチドシンターゼ活性を変調する。Science (1999) 印刷中]；CAA75567 [Tudzynski, B. および Holter, K. ジベレラ・フジクロイにおけるジベレリン生合成経路：遺伝子クラスターの証拠。Fungal Genet. Biol. 25(3), 157-170 (1998)]；CAA76703 [Tudzynski, B. および Hoelter, K. ジベレラ・フジク

ロイ由来のP450モノオキシゲナーゼ遺伝子の性質決定。未公表]；CAA57874 [Mouyna, I. およびBrygoo, Y. フザリウム・オキシスポルムf. sp. エレーディス・チトクロムP450遺伝子の反復配列による破壊。未公表]；およびCAA91268 [著者なし。線虫C. エレガンスのゲノム配列：生物科学研究のプラットフォーム。C. エレガンス配列決定コンソーシアム。Science 282(5396), 2012-2018(1998) [公表正誤表は、Science 1999 Jan 1; 283(5398): 35および1999 Mar 26; 283(5410): 2103および1999 Sep 3; 285(5433): 1493に見られる]]。

【図5】 GenBank由来の上位10BLASTヒットに対する、アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素の関連性を示す系統樹。 10

プラスミドpMON45624にクローニングしたアスペルギルス・オクラセウス、ステロイド11アルファ水酸化酵素の遺伝的関連性を示す系統樹を、GenBankに見られる関連酵素と並列させた。BLASTを用いて、GenBank内の関連酵素を見出し、そしてClustalWを用いて、多数配列並列およびこの図に示す系統樹を生成した。この図の表示として用いたGenBank寄託番号の説明は、図4のレジェンド用に、上述したものと同一である。

【図6】 アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素およびGenBank由来の上位10BLASTヒットの間のパーセント相同性。

アスペルギルス・オクラセウス、ステロイド11アルファ水酸化酵素、およびBLASTを用いてGenBankに見られる上位10酵素の間のパーセント相同性は、CLUSTAL(Thompsonら, Comput. Appl. Biosci. 10:19-29, 1994)を用いて計算した。 20

【図7】 クロコウジカビ、マウス、およびS. セレビシエ由来のNADPHチトクロムP450還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素のアミノ酸相同性並列。

プラスミドpMON45632(配列番号05)にクローニングしたアスペルギルス・オクラセウス、ステロイド酸化還元酵素のアミノ酸配列(配列番号06)、およびプラスミドpMON45605(配列番号04)にクローニングしたヒト酸化還元酵素(配列番号03)は、上述のように、クロコウジカビ、マウス、およびS. セレビシエ由来の関連酵素と並列させた。GenBank寄託番号(ありうる機能、[属および種])は以下のとおりである：BAA02936(NADPH-チトクロムP450還元酵素前駆体[サッカロミセス・セレビシエ])；CAA81550 NADPHチトクロムP450酸化還元酵素[クロコウジカビ]；P16435(NADPH-チトクロムP450還元酵素(CPR)(P450R)[ヒト])；BAA04496(NADPH-チトクロムP450酸化還元酵素[マウス(Mus musculus)])。 30

これらの遺伝子座の参考文献は以下のとおりである：BAA02936[Yabusaki, Y., Murakami, H. およびOhkawa, H. クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列から推定した、サッカロミセス・セレビシエNADPH-チトクロムP450還元酵素の一次構造。J. Biochem. 103(6), 1004-1010(1988)]；CAA81550[van den Brink, J., van Zeijl, C., van den Hondel, C. およびvan Gorcom, R. クロコウジカビのNADPHチトクロムP450酸化還元酵素(cprA)遺伝子のクローニングおよび性質決定。未公表]；P16435[Haniu, M., McManus, M.E., Birkett, D.J., Lee, T.D. およびShively, J.E. ヒト肝臓由来のNADPH-チトクロムP-450還元酵素の構造的および機能的解析：ヒト酵素の完全配列およびNADPH結合部位。Biochemistry 28(21), 8639-8645(1989)]；BAA04496[Ohgiya, S., Shinriki, N., Kamatani, T. およびIshizaki, K. マウスNADPH-チ 40 50

トクロム P - 450 酸化還元酵素：分子クローニングおよび酵母における機能的発現。

Biochim. Biophys. Acta 1186 (1-2), 137-141 (1994)]。

【図8】 クロコウジカビ、マウス、および *S. cerevisiae* 由来の NADPH-チトクロム P450 還元酵素に対する、*A. ochraceus* 酸化還元酵素のアミノ酸相同性並列。

プラスミド pMON45632 (配列番号05) にクローニングした *Aspergillus ochraceus*、ステロイド酸化還元酵素のアミノ酸配列 (配列番号06) は、上述のように、クロコウジカビおよび *S. cerevisiae* 由来の関連真菌酵素と並列させた。この図の表示として用いた GenBank 寄託番号の説明は、上の図7のレジェンド用に、上述したものと同一である。

【図9】 クロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の還元酵素に対する、*Aspergillus ochraceus* およびヒト酸化還元酵素の関連性を示す系統樹。

プラスミド pMON45632 (配列番号05) にクローニングした *Aspergillus ochraceus* 酸化還元酵素 (配列番号06) の遺伝的関連性を示す系統樹を、関連酵素と並列させた。BLASTを用いて、GenBank内の関連酵素を見出し、そして Clustal Wを用いて、多数配列並列およびこの図に示す系統樹を生成した。この図の表示として用いた GenBank 寄託番号の説明は、上の図7のレジェンド用に、上述したものと同一である。

【図10】 *Aspergillus ochraceus* 酸化還元酵素、並びにクロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の還元酵素の間のパーセント同一性。

Aspergillus ochraceus 酸化還元酵素、並びにクロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の酸化還元酵素の間のパーセント同一性は、Clustal Wおよび Boxshadeを用いて計算した。

【図11】 SwissProt由来の上位4ヒットとヒト酸化還元酵素の並列。

以下に P16435 に関して報告する訂正配列のアミノ酸配列に対応する、プラスミド pMON45605 (配列番号03) にクローニングしたヒトステロイド酸化還元酵素のアミノ酸配列 (配列番号04) は、上述のように、SWISSPROTタンパク質配列データベース由来の上位4ヒットに並列させた。SWISSPROT寄託番号 { 遺伝子座 } [通称] および種) ありうる機能) は以下のとおりである：P16435 { NCPR__HUMAN } [ヒト] NADPH - チトクロム P450 還元酵素；P00389 { NCPR__RABBIT } [ウサギ] NADPH - チトクロム P450 還元酵素；P00388 { NCPR__RAT } [ラット] NADPH-チトクロム P450 還元酵素；P37040 { NCPR__MOUSE } [マウス] NADPH - チトクロム P450 還元酵素；P04175 { NCPR__PIG } [ブタ] (NADPH - チトクロム P450 還元酵素。

これらの遺伝子座の参考文献は以下のとおりである：P16435 [Hanu, M., McManus, M.E., Birkett, D.J., Lee, T.D. および Shively, J.E. ヒト肝臓由来の NADPH - チトクロム P - 450 還元酵素の構造的および機能的解析：ヒト酵素の完全配列および NADPH 結合部位。

Biochemistry 28 (21), 8639-8645 (1989)]；P00389 [Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Yamanoto, T. および Ohkawa, H. ウサギ肝臓 NADPH - チトクロム P - 450 還元酵素 mRNA の全長 cDNA の分子クローニングおよび配列解析。 *J. Biochem.* 100 (4), 945-954 (1986)]；P00388 [Porter, T.D. および Kasper, C.B. ラット NADPH - チトクロム P - 450 酸化還元酵素 cDNA のコードヌクレオチド配列およびフラビン結合ドメインの同定。 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (4), 973-977 (1985)]；P37040 [Ohgiya, S., Shinriki, N., Kamatani, T. および Ishizaki, K. マウス NADPH - チトクロム P - 450 酸化還元酵素：分子クローニングおよび酵母における機能

的発現。 *Biochim. Biophys. Acta* 1186 (1-2), 137-141 (1994)] ; P04175 [Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T.D. および Shively, J. E. ブタ肝臓ミクロソーム由来の NADPH - チトクロム P - 450 還元酵素の完全アミノ酸配列。 *Biochemistry* 25 (24), 7906-7911 (1986)]。

【図12】 *SwissProt* 由来の上位4ヒットとヒト酸化還元酵素の関連性を示す系統樹。

プラスミド pMON45604 (配列番号03) にクローニングしたヒト酸化還元酵素 (配列番号04) の遺伝的関連性を示す系統樹を、*SWISSPROT* に見られる関連酵素と並列させた。BLASTを用いて、*SWISSPROT* 内の関連酵素を見出し、そして ClustalWを用いて、多数配列並列およびこの図に示す系統樹を生成した。この図の表示として用いた *SWISSPROT* 寄託番号の説明は、上の図11のレジェンド用に、上述したものと同一である。

10

【図13】 ヒト酸化還元酵素および *SwissProt* 由来の上位4ヒットの間のパーセント同一性。

ヒト酸化還元酵素および *SWISSPROT* に見られる上位4ヒットの間のパーセント同一性は、Clustal Wおよび Boxshadeを用いて計算した。

【図14】 トランスフェクションした Sf9 昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素の発現。

20

アスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素を発現しているバキュロウイルス感染昆虫細胞は、感染25および48時間後に採取し、そしてミクロソーム膜分画を調製し、そして SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。ゲル中のタンパク質は、0.2 μm ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell Grimsehlstrasse 23 37574 Einbeck ドイツ) に電気的にトランスファーし、そしてペプチド11aOHペプチド2 CRQILTPYIHK R K S L K G T T D (配列番号24) から調製した抗体 GN - 1187 および GN - 1188 で探査した (probed)。

【図15】 トランスフェクションした Sf9 昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウス P450 酸化還元酵素の発現。

30

アスペルギルス・オクラセウス11酸化還元酵素を発現しているバキュロウイルス感染昆虫細胞は、感染25および48時間後に採取し、そしてミクロソーム膜分画を調製し、そして SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した。ゲル中のタンパク質は、0.2 μm ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell Grimsehlstrasse 23 37574 Einbeck ドイツ) に電気的にトランスファーし、そして oxr ペプチド1 CTYWAVAKDPYASAGPAMNG (配列番号26) から調製した抗体 GN - 2023 および GN - 12024 で探査した。

【図16】 HPLC で監視した、アンドロステンジオンの11アルファヒドロキシアン드로ステンジオンへの変換。

ミクロソームおよびミトコンドリア細胞成分分画は、組換えアスペルギルス・オクラセウス11アルファ水酸化酵素および HepG2 細胞 RNA からクローニングしたヒト酸化還元酵素を発現する組換えバキュロウイルスに同時感染させた昆虫細胞から調製した。細胞成分分画は、NADPH 生成系の存在下、250 μM アン드로ステンジオンと120分間インキュベーションし、そして生じた産物を HPLC によって分離し、そして247 nm の紫外検出によって監視した。水酸化酵素活性は、予期されるとおり、ミクロソーム分画に見出されたが、ミトコンドリア分画にも現れた。これらの結果は、11アルファ水酸化酵素が、破壊細胞において、膜に貼り付く傾向を有する可能性があるか、またはこの実験において、細胞成分分画の分離が不十分であったことを示唆する。パネルAは、ミトコンドリア分画から調製した酵素を用いて行った反応を例示する。ADの後で溶出するパネルA中のピークは、テストステロンであるようである。ミクロソーム分画を用いた場合、ほ

40

50

ぼ同量の A D が 1 1 アルファヒドロキシ A D に変換されたが、比較的より多くのテストステロンもまた、産生された。パネル B は、酵素供給源なしで、1 2 0 分間行った、同一の反応を例示する。パネル C は、インキュベーション緩衝液に添加した 1 1 α - ヒドロキシアンドロステンジオン標準を用いた H P L C 追跡を例示する。

【配列表】

Sequence Listing

SEQUENCE LISTING

5	<110> Suzanne L. Bolten Alan M. Easton Leslie C. Engel Dean M. Messing John S. Ng	10
10	Beverly A. Reitz Scott A. Vaccaro Mark C. Walker Ping T. Wang Robin A. Weinberg	
15	<120> <i>Aspergillus ochraceus</i> 11 alpha hydroxylase and oxidoreductase	
20	<130> S03196-00-US	20
	<140> US 09/xxx,xxx <141> 2001-10-26	
25	<150> USSN 60/244,300 <151> 2000-10-30	
	<160> 65	
30	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
	<210> 1 <211> 1776 <212> DNA	
35	<213> <i>Aspergillus ochraceus</i>	
	<220> <221> CDS <222> (146)...(1690)	30
40	<223> <i>Aspergillus ochraceus</i> 11 alpha hydroxylase	
	<400> 1 tggaagtttt tacacttatt atgccggagc cgaagattc tgagtcgagg ggttggggaa 60 caacactata agacctacaa ccaacttgat ttggtgaatt tacacgggca ttatcaaaac 120 agccacaagc tgacagctca ttatc atg ccc ttc ttc act ggg ctt ctg gcg 172 Met Pro Phe Phe Thr Gly Leu Leu Ala 1 5	
50	att tac cat agt ctc ata ctc gac aac cca gtc caa acc ctg agc acc 220 ile tyr his ser leu ile leu asp asn pro val gln thr leu ser thr 10 15 20 25	
55	att gtc gta ttg gcg gca gcg tac tgg ctc gca acg ctc cag ccg agc 268 ile val val leu ala ala ala tyr trp leu ala thr leu gln pro ser 30 35 40	40

5	gac ctt cct gag ctg aat ccc gcc aaa cca ttc gag ttc acc aat cgt	316
	Asp Leu Pro Glu Leu Asn Pro Ala Lys Pro Phe Glu Phe Thr Asn Arg	
	45 50 55	
	cgt cgt gtt cat gag ttt gtt gaa aat agt aag agc ttg ctt gct cgg	364
	Arg Arg Val His Glu Phe Val Glu Asn Ser Lys Ser Leu Leu Ala Arg	
10	60 65 70	
	ggg agg gaa ttg cac ggg cac gag cgg tac aga ctc atg tct gaa tgg	412
	Gly Arg Glu Leu His Gly His Glu Pro Tyr Arg Leu Met Ser Glu Trp	
	75 80 85	
	gga tcc ttg att gtc ctg ccc cca gag tgc gcc gac gag ctg cgc aac	460
15	Gly Ser Leu Ile Val Leu Pro Pro Glu Cys Ala Asp Glu Leu Arg Asn	
	90 95 100 105	
	gac cca aga atg gac ttt gag acg ccc acc acc gac gac tcc cac gga	508
	Asp Pro Arg Met Asp Phe Glu Thr Pro Thr Thr Asp Asp Ser His Gly	
	110 115 120	
20	tat atc cct ggc ttc gac gct ctc aac gca gac cgg aac ctg act aaa	556
	Tyr Ile Pro Gly Phe Asp Ala Leu Asn Ala Asp Pro Asn Leu Thr Lys	
	125 130 135	
	gtg gtc acc aag tac ctc aca aaa gca ttg aac aag ctt act gct cgg	604
	Val Val Thr Lys Tyr Leu Thr Lys Ala Leu Asn Lys Leu Thr Ala Pro	
25	140 145 150	
	atc tgg cat gaa gcg tcc atc gcc atg aaa gcg gtg ctg ggt gac gat	652
	Ile Ser His Glu Ala Ser Ile Ala Met Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp	
	155 160 165	
	cca gat tgg cgt gag atc tac cca gcc aga gac ttg ctc cag ctc gtc	700
30	Pro Asp Trp Arg Glu Ile Tyr Pro Ala Arg Asp Leu Leu Gln Leu Val	
	170 175 180 185	
	gcc cgg atg tgg aca aga gtg ttc ctt ggc gag gaa atg tgc aat aac	748
	Ala Arg Met Ser Thr Arg Val Phe Leu Gly Glu Glu Met Cys Asn Asn	
	190 195 200	
35	cag gat tgg atc caa acc tca tca caa tac gcg gcc ctt gcc ttc ggt	796
	Gln Asp Trp Ile Gln Thr Ser Ser Gln Tyr Ala Ala Leu Ala Phe Gly	
	205 210 215	
	gtc ggt gac aag ctt aga ata tac cgg aga atg atc aga cgg ata gta	844
	Val Gly Asp Lys Leu Arg Ile Tyr Pro Arg Met Ile Arg Pro Ile Val	
40	220 225 230	
	cat tgg ttc atg cca tcc tgt tgg gag ctg cgc cga tgg ctg cga cgc	892
	His Trp Phe Met Pro Ser Cys Trp Glu Leu Arg Arg Ser Leu Arg Arg	
	235 240 245	
	tgc cga cag att ctc acg cgg tac att cac aaa cgc aag tcc ctg aag	940
45	Cys Arg Gln Ile Leu Thr Pro Tyr Ile His Lys Arg Lys Ser Leu Lys	
	250 255 260 265	

10

20

30

	ggg acc acg gac gag cag ggc aag ccc ctt atg ttt gat gat tcc atc Gly Thr Thr Asp Glu Gln Gly Lys Pro Leu Met Phe Asp Asp Ser Ile 270 275 280	988	
5	gag tgg ttc gag cga gag ctg ggt ccc aac cac gac gcg gtc ctg aag Glu Trp Phe Glu Arg Glu Leu Gly Pro Asn His Asp Ala Val Leu Lys 285 290 295	1036	
10	cag gtc acg ctc tcc ata gtt gct atc cac acc acg agt gac cta ctc Gln Val Thr Leu Ser Ile Val Ala Ile His Thr Thr Ser Asp Leu Leu 300 305 310	1084	
15	ttg cag gcc atg agc gat ctc gcg cag aac ccg aaa gtg cta caa gca Leu Gln Ala Met Ser Asp Leu Ala Gln Asn Pro Lys Val Leu Gln Ala 315 320 325	1132	10
20	gtg cgc gag gag gtg gtc cga gtg ctg agc acc gag ggg ctc agc aag Val Arg Glu Glu Val Val Arg Val Leu Ser Thr Glu Gly Leu Ser Lys 330 335 340 345	1180	
25	gtc tgc ctt cac agt ctc aag ctc atg gac agc gcg ttg aag gaa agc Val Ser Leu His Ser Leu Lys Leu Met Asp Ser Ala Leu Lys Glu Ser 350 355 360	1228	
30	cag cgt ctc agg cct acg ctt ctc ggc tcc ttt cgt cgg cag gca acg Gln Arg Leu Arg Pro Thr Leu Leu Gly Ser Phe Arg Arg Gln Ala Thr 365 370 375	1276	
35	aat gac atc aag ctg aag agc ggg ttt gtc ata aag aaa ggg act aga Asn Asp Ile Lys Leu Lys Ser Gly Phe Val Ile Lys Lys Gly Thr Arg 380 385 390	1324	20
40	gtc gtg atc gac agc acc cat atg tgg aat ccc gag tat tac act gac Val Val Ile Asp Ser Thr His Met Trp Asn Pro Glu Tyr Tyr Thr Asp 395 400 405	1372	
45	cct ctc cag tac gac ggg tac cgc tac ttc aac aag cgg cag aca ccc Pro Leu Gln Tyr Asp Gly Tyr Arg Tyr Phe Asn Lys Arg Gln Thr Pro 410 415 420 425	1420	
50	ggc gag gac aag aac gcg ttg ctc gtc agc aca agc gcc aac cac atg Gly Glu Asp Lys Asn Ala Leu Leu Val Ser Thr Ser Ala Asn His Met 430 435 440	1468	
55	gga ttc ggt cac ggc gtt cac gcc tgt cct gcc aga ttc ttc gcc tcc Gly Phe Gly His Gly Val His Ala Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Ser 445 450 455	1516	30
60	aac gag atc aag att gcc ttg tgt cat atc atc tta aat tat gag tgg Asn Glu Ile Lys Ile Ala Leu Cys His Ile Ile Leu Asn Tyr Glu Trp 460 465 470	1564	
65	cgt ctt cca gac ggc ttc aag ccc cag cct ctc aac atc ggg atg act Arg Leu Pro Asp Gly Phe Lys Pro Gln Pro Leu Asn Ile Gly Met Thr 475 480 485	1612	
70	tat ctg gcg gat ccc aat acc agg atg ctg atc agg cca cgc aag gcg	1660	

	Tyr Leu Ala Asp Pro Asn Thr Arg Met Leu Ile Arg Pro Arg Lys Ala	
	490 495 500 505	
5	gag atc gat atg gcg agt tta act gtg tag gtcgaacacg aagtcctgat	1710
	Glu Ile Asp Met Ala Ser Leu Thr Val *	
	510	
10	gaagtgttat tggtcagtgg gtgaagcaag tcgcagaaat gtgtaacaat ttataagaat	1770
	aaaaaa	1776
	<210> 2	
	<211> 514	
	<212> ERT	
15	<213> Aspergillus ochraceus	10
	<400> 2	
	Met Pro Phe Phe Thr Gly Leu Leu Ala Ile Tyr His Ser Leu Ile Leu	
	1 5 10 15	
20	Asp Asn Pro Val Gln Thr Leu Ser Thr Ile Val Val Leu Ala Ala Ala	
	20 25 30	
	Tyr Trp Leu Ala Thr Leu Gln Pro Ser Asp Leu Pro Glu Leu Asn Pro	
	35 40 45	
	Ala Lys Pro Phe Glu Phe Thr Asn Arg Arg Arg Val His Glu Phe Val	
	50 55 60	
25	Glu Asn Ser Lys Ser Leu Ala Arg Gly Arg Glu Leu His Gly His	
	65 70 75 80	
	Glu Pro Tyr Arg Leu Met Ser Glu Trp Gly Ser Leu Ile Val Leu Pro	
	85 90 95	
30	Pro Glu Cys Ala Asp Glu Leu Arg Asn Asp Pro Arg Met Asp Phe Glu	
	100 105 110	
	Thr Pro Thr Thr Asp Asp Ser His Gly Tyr Ile Pro Gly Phe Asp Ala	
	115 120 125	
	Leu Asn Ala Asp Pro Asn Leu Thr Lys Val Val Thr Lys Tyr Leu Thr	
	130 135 140	
35	Lys Ala Leu Asn Lys Leu Thr Ala Pro Ile Ser His Glu Ala Ser Ile	
	145 150 155 160	
	Ala Met Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Pro Asp Trp Arg Glu Ile Tyr	
	165 170 175	
	Pro Ala Arg Asp Leu Leu Gln Leu Val Ala Arg Met Ser Thr Arg Val	
	180 185 190	
40	Phe Leu Gly Glu Glu Met Cys Asn Asn Gln Asp Trp Ile Gln Thr Ser	
	195 200 205	
	Ser Gln Tyr Ala Ala Leu Ala Phe Gly Val Gly Asp Lys Leu Arg Ile	
	210 215 220	
45	Tyr Pro Arg Met Ile Arg Pro Ile Val His Trp Phe Met Pro Ser Cys	
	225 230 235 240	
	Trp Glu Leu Arg Arg Ser Leu Arg Arg Cys Arg Gln Ile Leu Thr Pro	
	245 250 255	
	Tyr Ile His Lys Arg Lys Ser Leu Lys Gly Thr Thr Asp Glu Gln Gly	
	260 265 270	
50	Lys Pro Leu Met Phe Asp Asp Ser Ile Glu Trp Phe Glu Arg Glu Leu	
	275 280 285	
	Gly Pro Asn His Asp Ala Val Leu Lys Gln Val Thr Leu Ser Ile Val	
	290 295 300	
55	Ala Ile His Thr Thr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ala Met Ser Asp Leu	
	305 310 315 320	
	Ala Gln Asn Pro Lys Val Leu Gln Ala Val Arg Glu Glu Val Val Arg	

		325		330		335	
		Val Leu Ser Thr Glu Gly Leu Ser Lys Val Ser Leu His Ser Leu Lys					
		340		345		350	
5		Leu Met Asp Ser Ala Leu Lys Glu Ser Gln Arg Leu Arg Pro Thr Leu					
		355		360		365	
		Leu Gly Ser Phe Arg Arg Gln Ala Thr Asn Asp Ile Lys Leu Lys Ser					
		370		375		380	
		Gly Phe Val Ile Lys Lys Gly Thr Arg Val Val Ile Asp Ser Thr His					
		385		390		395	400
10		Met Trp Asn Pro Glu Tyr Tyr Thr Asp Pro Leu Gln Tyr Asp Gly Tyr					
		405		410		415	
		Arg Tyr Phe Asn Lys Arg Gln Thr Pro Gly Glu Asp Lys Asn Ala Leu					
		420		425		430	
15		Leu Val Ser Thr Ser Ala Asn His Met Gly Phe Gly His Gly Val His					10
		435		440		445	
		Ala Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Ser Asn Glu Ile Lys Ile Ala Leu					
		450		455		460	
		Cys His Ile Ile Leu Asn Tyr Glu Trp Arg Leu Pro Asp Gly Phe Lys					
		465		470		475	480
20		Pro Gln Pro Leu Asn Ile Gly Met Thr Tyr Leu Ala Asp Pro Asn Thr					
		485		490		495	
		Arg Met Leu Ile Arg Pro Arg Lys Ala Glu Ile Asp Met Ala Ser Leu					
		500		505		510	
		Thr Val					
25							
		<210> 3					
		<211> 2031					
		<212> DNA					
30		<213> human					20
		<220>					
		<221> CDS					
		<222> (1)...(2031)					
35		<223> human oxidoreductase					
		<400> 3					
		atg gga gac tcc cac gtg gac acc agc tcc acc gtg tcc gag gcg gtg					48
40		Met Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Ser Thr Val Ser Glu Ala Val					
		1		5		10	15
		gcc gaa gaa gta tct ctt ttc agc atg acg gac atg att ctg ttt tcg					96
		Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile Leu Phe Ser					
		20		25		30	
45		ctc atc gtg ggt ctc cta acc tac tgg ttc ctc ttc aga aag aaa aaa					144
		Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Lys					
		35		40		45	
		gaa gaa gtc ccc gag ttc acc aaa att cag aca ttg acc tcc tct gtc					192
50		Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Thr Leu Thr Ser Ser Val					
		50		55		60	
		aga gag agc agc ttt gtg gaa aag atg aag aaa acg ggg agg aac atc					240
55		Arg Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile					
		65		70		75	80

	atc gtg ttc tac ggc tcc cag acg ggg act gca gag gag ttt gcc aac	288	
	Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn		
	85 90 95		
5	cgc ctg tcc aag gac gcc cac cgc tac ggg atg cga ggc atg tca gcg	336	
	Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala		
	100 105 110		
10	gac cct gag gag tat gac ctg gcc gac ctg agc agc ctg cca gag atc	384	
	Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile		
	115 120 125		
15	gac aac gcc ctg gtg gtt ttc tgc atg gcc acc tac ggt gag gga gac	432	10
	Asp Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp		
	130 135 140		
20	ccc acc gac aat gcc cag gac ttc tac gac tgg ctg cag gag aca gac	480	
	Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp		
	145 150 155 160		
25	gtg gat ctc tct ggg gtc aag ttc gcg gtg ttt ggt ctt ggg aac aag	528	
	Val Asp Leu Ser Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys		
	165 170 175		
30	acc tac gag cac ttc aat gcc atg ggc aag tac gtg gac aag cgg ctg	576	
	Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Lys Arg Leu		
	180 185 190		
35	gag cag ctc ggc gcc cag cgc atc ttt gag ctg ggg ttg ggc gac gac	624	20
	Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp		
	195 200 205		
40	gat ggg aac ttg gag gag gac ttc atc acc tgg cga gag cag ttc tgg	672	
	Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp		
	210 215 220		
45	ccg gcc gtg tgt gaa cac ttt ggg gtg gaa gcc act ggc gag gag tcc	720	
	Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser		
	225 230 235 240		
50	agc att cgc cag tac gag ctt gtg gtc cac acc gac ata gat gcg gcc	768	
	Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Thr Asp Ile Asp Ala Ala		
	245 250 255		
55	aag gtg tac atg ggg gag atg ggc cgg ctg aag agc tac gag aac cag	816	30
	Lys Val Tyr Met Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln		
	260 265 270		
60	aag ccc ccc ttt gat gcc aag aat cgg ttc ctg gct gca gtc acc acc	864	
	Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Thr		
	275 280 285		
65	aac cgg aag ctg aac cag gga acc gag cgc cac ctc atg cac ctg gaa	912	
	Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu		
	290 295 300		
70	ttg gac atc tgg gac tcc aaa atc agg tat gaa tct ggg gac cac gtg	960	

Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val
 305 310 315 320
 5 gct gtg tac cca gcc aac gac tct gct ctc gtc aac cag ctg ggc aaa 1008
 Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly Lys
 325 330 335
 10 atc ctg ggt gcc gac ctg gac gtc gtc atg tcc ctg aac aac ctg gat 1056
 Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp
 340 345 350
 15 gag gag tcc aac aag aag cac cca ttc ccg tgc cct acg tcc tac cgc 1104
 Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr Arg
 355 360 365
 acg gcc ctc acc tac tac ctg gac atc acc aac ccg ccg cgt acc aac 1152
 Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn
 370 375 380
 20 gtg ctg tac gag ctg gcg cag tac gcc tcg gag ccc tcg gag cag gag 1200
 Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu
 385 390 395 400
 25 ctg ctg cgc aag atg gcc tcc tcc tcc ggc gag ggc aag gag ctg tac 1248
 Leu Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr
 405 410 415
 30 ctg agc tgg gtg gtg gag gcc cgg agg cac atc ctg gcc atc ctg cag 1296
 Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln
 420 425 430
 35 gac tgc ccg tcc ctg cgg ccc ccc atc gac cac ctg tgt gag ctg ctg 1344
 Asp Cys Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu
 435 440 445
 ccg cgc ctg cag gcc cgc tac tac tcc atc gcc tca tcc tcc aag gtc 1392
 Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val
 450 455 460
 40 cac ccc aac tct gtg cac atc tgt gcg gtg gtt gtg gag tac gag acc 1440
 His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Val Glu Tyr Glu Thr
 465 470 475 480
 45 aag gcc ggc cgc atc aac aag ggc gtg gcc acc aac tgg ctg cgg gcc 1488
 Lys Ala Gly Arg Ile Asn Lys Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala
 485 490 495
 50 aag gag cct gcc ggg gag aac ggc ggc cgt gcg ctg gtg ccc atg ttc 1536
 Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe
 500 505 510
 55 gtg cgc aag tcc cag ttc cgc ctg ccc ttc aag gcc acc acg cct gtc 1584
 Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val
 515 520 525
 atc atg gtg ggc ccc ggc acc ggg gtg gca ccc ttc ata ggc ttc atc 1632
 Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile

10

20

30

	530	535	540	
	cag gag cgg gcc tgg ctg cga cag cag ggc aag gag gtg ggg gag acg			1680
	Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr			
5	545	550	555	560
	ctg ctg tac tac ggc tgc cgc cgc tgc gat gag gac tac ctg tac cgg			1728
	Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg			
		565	570	575
10				
	gag gag ctg gcg cag ttc cac agg gac ggt gcg ctc acc cag ctc aac			1776
	Glu Glu Leu Ala Gln Phe His Arg Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn			
		580	585	590
15				
	gtg gcc ttc tcc cgg gag cag tcc cac aag gtc tac gtc cag cac ctg			1824
	Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ser His Lys Val Tyr Val Gln His Leu			
		595	600	605
	cta aag caa gac cga gag cac ctg tgg aag ttg atc gaa ggc ggt gcc			1872
20	Leu Lys Gln Asp Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile Glu Gly Gly Ala			
		610	615	620
	cac atc tac gtc tgt ggg gat gca cgg aac atg gcc agg gat gtg cag			1920
	His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val Gln			
25	625	630	635	640
	aac acc ttc tac gac atc gtg gct gag ctc ggg gcc atg gag cac gcg			1968
	Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Leu Gly Ala Met Glu His Ala			
		645	650	655
30				
	cag gcg gtg gac tac atc aag aaa ctg atg acc aag ggc cgc tac tcc			2016
	Gln Ala Val Asp Tyr Ile Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr Ser			
		660	665	670
35	ctg gac gtg tgg agc			2031
	Leu Asp Val Trp Ser			
		675		
40	<210> 4			
	<211> 677			
	<212> FRT			
	<213> human			
45	<400> 4			
	Met Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Ser Thr Val Ser Glu Ala Val			
	1	5	10	15
	Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile Leu Phe Ser			
		20	25	30
50	Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Lys			
		35	40	45
	Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Thr Leu Thr Ser Ser Val			
		50	55	60
	Arg Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile			
55	65	70	75	80
	Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn			
		85	90	95

10

20

30

Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala
 100 105 110
 Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile
 115 120 125
 5 Asp Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp
 130 135 140
 Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp
 145 150 155 160
 Val Asp Leu Ser Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys
 10 165 170 175
 Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Lys Arg Leu
 180 185 190
 Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp
 195 200 205
 15 Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp
 210 215 220
 Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Thr Asp Ile Asp Ala Ala
 20 245 250 255
 Lys Val Tyr Met Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln
 260 265 270
 Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Thr
 275 280 285
 25 Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu
 290 295 300
 Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val
 305 310 315 320
 Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly Lys
 30 325 330 335
 Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp
 340 345 350
 Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr Arg
 355 360 365
 35 Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn
 370 375 380
 Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu
 385 390 395 400
 Leu Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr
 40 405 410 415
 Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln
 420 425 430
 Asp Cys Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu
 435 440 445
 45 Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val
 450 455 460
 His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Glu Tyr Glu Thr
 465 470 475 480
 Lys Ala Gly Arg Ile Asn Lys Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala
 485 490 495
 50 Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe
 500 505 510
 Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val
 515 520 525
 55 Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile
 530 535 540
 Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr

10

20

30

	545	550	555	560	
	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Gly
	Cys	Arg	Arg	Ser	Asp
	Glu	Asp	Tyr	Leu	Tyr
	Arg				
	565	570	575		
	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln
	Phe	His	Arg	Asp	Gly
	Ala	Leu	Thr	Gln	Leu
5	580	585	590		
	Val	Ala	Phe	Ser	Arg
	Glu	Gln	Ser	His	Lys
	Val	Tyr	Val	Gln	His
	Leu				
	595	600	605		
	Leu	Lys	Gln	Asp	Arg
	Glu	His	Leu	Trp	Lys
	Leu	Ile	Glu	Gly	Gly
	Ala				
	610	615	620		
10	His	Ile	Tyr	Val	Cys
	Gly	Asp	Ala	Arg	Asn
	Met	Ala	Arg	Asp	Val
	Gln				
	625	630	635	640	
	Asn	Thr	Phe	Tyr	Asp
	Ile	Val	Ala	Glu	Leu
	Gly	Ala	Met	Glu	His
	Ala				
	645	650	655		
	Gln	Ala	Val	Asp	Tyr
	Ile	Lys	Lys	Leu	Met
	Thr	Lys	Gly	Arg	Tyr
	Ser				
15	660	665	670		
	Leu	Asp	Val	Trp	Ser
	675				
	<210> 5				
20	<211> 2322				
	<212> DNA				
	<213> Aspergillus ochraceus				
	<220>				
25	<221> CDS				
	<222> (233)...(2320)				
	<223> Aspergillus ochraceus oxidoreductase				
	<400> 5				
30	cttatttcgt	ttaggaagag	caccggcttc	gggtgccttc	cttaccctct
	kattcttcct				60
	cttctgactc	cctttttgtt	attgatcgcc	catctcggtg	aacatttggg
	atatctttcc				120
	ctctccccc	cccgcccca	ccctccttat	cttctcctcc	cgtccagcat
	ttagctcgcc				180
	atcgaattcg	caattccttc	ctcgtgactc	ttcatcgctg	agcgtcccca
	tc	atg	gcg		238
				Met	Ala
35				1	
	caa	ctc	gat	act	ctc
	gat	ttg	gtc	gtc	ctg
	gtg	gcg	ctc	ttg	gtg
	ggc				286
	Gln	Leu	Asp	Thr	Leu
	Asp	Leu	Val	Val	Leu
	Val	Ala	Leu	Leu	Val
	Gly				
	5	10	15		
40	agc	gtg	gcc	tac	ttc
	acc	aag	ggc	acc	tac
	tgg	gcc	gtc	gcc	aaa
	gac				334
	Ser	Val	Ala	Tyr	Phe
	Thr	Lys	Gly	Thr	Tyr
	Trp	Ala	Val	Ala	Lys
	Asp				
	20	25	30		
45	cct	tat	gcc	tcg	gct
	ggt	cgc	gcg	atg	aat
	gga	ggc	gcc	aag	gcc
	ggc				382
	Pro	Tyr	Ala	Ser	Ala
	Gly	Pro	Ala	Met	Asn
	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala
	Gly				
	35	40	45	50	
	aag	act	cgc	gac	att
	gtt	cag	aaa	atg	gac
	gaa	act	ggc	aaa	aac
	tgt				430
50	Lys	Thr	Arg	Asp	Ile
	Val	Gln	Lys	Met	Asp
	Glu	Thr	Gly	Lys	Asn
	Cys				
	55	60	65		
	gtg	att	ttc	tac	ggc
	tcg	caa	acc	ggc	acc
	gct	gag	gac	tac	gcg
	tcc				478
	Val	Ile	Phe	Tyr	Gly
	Ser	Gln	Thr	Gly	Thr
	Ala	Glu	Asp	Tyr	Ala
	Ser				
55	70	75	80		
	aga	ctg	gcc	aag	gaa
	ggc	tcc	cag	cga	ttc
	ggc	ctc	aag	acc	atg
	gtg				526

	Arg Leu Ala Lys Glu Gly Ser Gln Arg Phe Gly Leu Lys Thr Met Val	
	85 90 95	
5	gcc gat ctg gag gac tac gac tac gaa aac ctg gaa aag ttc ccc gag Ala Asp Leu Glu Asp Tyr Asp Tyr Glu Asn Leu Glu Lys Phe Pro Glu	574
	100 105 110	
10	gac aag gtt gtt ttc ttc gtt ctg gcc act tat ggc gag ggt gaa ccc Asp Lys Val Val Phe Phe Val Leu Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Glu Pro	622
	115 120 125 130	
15	acg gat aat gcg gtt gaa ttc tac cag ttc gtc acg ggc gaa gat gct Thr Asp Asn Ala Val Glu Phe Tyr Gln Phe Val Thr Gly Glu Asp Ala	670
	135 140 145	
20	gct ttc gag agc ggc gct acc gcc gac gat aag cct ctg tct tct ctc Ala Phe Glu Ser Gly Ala Thr Ala Asp Asp Lys Pro Leu Ser Ser Leu	718
	150 155 160	
25	aag tat gtc acg ttt ggt ctg ggt aac aac acc tat gag cac tac aac Lys Tyr Val Thr Phe Gly Leu Gly Asn Asn Thr Tyr Glu His Tyr Asn	766
	165 170 175	
30	gct atg gtt cgc aat gtg gac gcc gct ctc aca aag ttc ggc gcc caa Ala Met Val Arg Asn Val Asp Ala Ala Leu Thr Lys Phe Gly Ala Gln	814
	180 185 190	
35	cgc att ggc tct gct ggt gag ggt gac gac ggc gct ggt aca atg gaa Arg Ile Gly Ser Ala Gly Glu Gly Asp Asp Gly Ala Gly Thr Met Glu	862
	195 200 205 210	
40	gag gat ttc ctg gcc tgg aag gaa ccc atg tgg gct gcc ctt tct gag Glu Asp Phe Leu Ala Trp Lys Glu Pro Met Trp Ala Ala Leu Ser Glu	910
	215 220 225	
45	gcg atg aac ctg caa gag cgc gat gcg gtc tac gag ccg gtc ttc aat Ala Met Asn Leu Gln Glu Arg Asp Ala Val Tyr Glu Pro Val Phe Asn	958
	230 235 240	
50	gtc acc gag gac gag tcc ctg agc ccc gaa gat gag aac gtt tac ctc Val Thr Glu Asp Glu Ser Leu Ser Pro Glu Asp Glu Asn Val Tyr Leu	1006
	245 250 255	
55	ggt gag ccc act caa ggt cat ctc caa ggc gag ccc aag ggc ccg tac Gly Glu Pro Thr Gln Gly His Leu Gln Gly Glu Pro Lys Gly Pro Tyr	1054
	260 265 270	
60	tct gcg cac aac ccg ttc atc gct ccc atc tcc gaa tct cgt gaa ctg Ser Ala His Asn Pro Phe Ile Ala Pro Ile Ser Glu Ser Arg Glu Leu	1102
	275 280 285 290	
65	ttc aac gtc aag gac cgc aac tgt ctg cac atg gaa atc agc atc gcc Phe Asn Val Lys Asp Arg Asn Cys Leu His Met Glu Ile Ser Ile Ala	1150
	295 300 305	
70	ggt agc aac ctc act tac cag act ggt gac cac atc gct gtt tgg ccc Gly Ser Asn Leu Thr Tyr Gln Thr Gly Asp His Ile Ala Val Trp Pro	1198

10

20

30

	310	315	320	
	acc aac gcc ggt tcc gag gtc gat cgg ttc ctg cag gct ttt ggt ctc			1246
	Thr Asn Ala Gly Ser Glu Val Asp Arg Phe Leu Gln Ala Phe Gly Leu			
5	325	330	335	
	gaa gga aag cgc cac tcc gtc atc aac att aag ggt atc gat gtg acc			1294
	Glu Gly Lys Arg His Ser Val Ile Asn Ile Lys Gly Ile Asp Val Thr			
	340	345	350	
10				
	gct aag gtt ccg att ccc act cct acg acc tat gac gcc gca gtt cgc			1342
	Ala Lys Val Pro Ile Pro Thr Thr Tyr Asp Ala Ala Val Arg			
	355	360	365	370
15				
	tac tac ctg gaa gtc tgt gcc ccc gtt tcc cgt cag ttt gtc tgc act			1390
	Tyr Tyr Leu Glu Val Cys Ala Pro Val Ser Arg Gln Phe Val Ser Thr			
	375	380	385	
20				
	ctc gct gcc ttt gcc cct gat gaa gcg acc aag gcg gag atc gtt cgt			1438
	Leu Ala Ala Phe Ala Pro Asp Glu Ala Thr Lys Ala Glu Ile Val Arg			
	390	395	400	
	ttg ggt ggc gac aag gac tat ttc cat gag aag att acc aac cga tgc			1486
	Leu Gly Gly Asp Lys Asp Tyr Phe His Glu Lys Ile Thr Asn Arg Cys			
25	405	410	415	
	ttc aac atc gct cag gct ctc cag agc atc acg tcc aag cct ttc acc			1534
	Phe Asn Ile Ala Gln Ala Leu Gln Ser Ile Thr Ser Lys Pro Phe Thr			
	420	425	430	
30				
	gcc gtc ccg ttc tcc ctg ctt atc gaa ggt atc acc aag ctt cag ccc			1582
	Ala Val Pro Phe Ser Leu Leu Ile Glu Gly Ile Thr Lys Leu Gln Pro			
	435	440	445	450
35				
	cgt tac tac tgc atc tcc tgc tct tcc ctg gtt cag aag gac aag att			1630
	Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Ser Leu Val Gln Lys Asp Lys Ile			
	455	460	465	
40				
	agc att acc gcc gtt gtg gag tgc gtt cgc ttg cct ggt gag gaa cac			1678
	Ser Ile Thr Ala Val Val Glu Ser Val Arg Leu Pro Gly Glu Glu His			
	470	475	480	
	att gtc aag ggt gtg acc acg aac tat ctt ctc gcg ctc aag gaa aag			1726
	Ile Val Lys Gly Val Thr Thr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Lys Glu Lys			
45	485	490	495	
	caa aac ggc gag cct tcc cct gac ccg cac ggc ttg act tac tct atc			1774
	Gln Asn Gly Glu Pro Ser Pro Asp Pro His Gly Leu Thr Tyr Ser Ile			
	500	505	510	
50				
	act gga ccc cgt aac aag tac gat ggc atc cat gtc ccc gtt cac gtc			1822
	Thr Gly Pro Arg Asn Lys Tyr Asp Gly Ile His Val Pro Val His Val			
	515	520	525	530
55				
	cgc cac tgc aac ttc aaa ttg ccc tgc gat ccc tgc cga cct gtg atc			1870
	Arg His Ser Asn Phe Lys Leu Pro Ser Asp Pro Ser Arg Pro Val Ile			
	535	540	545	

10

20

30

	atg gtt gga ccc ggt act ggt gtt gct cct ttc cgt ggg ttt atc cag	1918	
	Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly Phe Ile Gln		
	550 555 560		
5			
	gag cgt gct gcc ttg gcc gcg aag ggc gag aag gtc gga act acc ttg	1966	
	Glu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Lys Gly Glu Lys Val Gly Thr Thr Leu		
	565 570 575		
10			
	ctt ttc ttc ggc tgc cgt aag tcc gac gaa gat ttc ttg tac aag gat	2014	
	Leu Phe Phe Gly Cys Arg Lys Ser Asp Glu Asp Phe Leu Tyr Lys Asp		
	580 585 590		
15			10
	gaa tgg aag act ttt cag gag cag ctt ggc gac tcg ctc aag atc atc	2062	
	Glu Trp Lys Thr Phe Gln Glu Gln Leu Gly Asp Ser Leu Lys Ile Ile		
	595 600 605 610		
20			
	act gcc ttc tct cgt gaa tcg gct gag aaa gtc tac gtc cag cac agg	2110	
	Thr Ala Phe Ser Arg Glu Ser Ala Glu Lys Val Tyr Val Gln His Arg		
	615 620 625		
25			
	ctg cgt gag cat gcc gag ctg gtc agt gac ctg ctg aag cag aaa gcc	2158	
	Leu Arg Glu His Ala Glu Leu Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Lys Ala		
	630 635 640		
30			20
	act ttc tat gtt tgc ggt gac gct gcc aac atg gcc cgt gaa gtc aac	2206	
	Thr Phe Tyr Val Cys Gly Asp Ala Ala Asn Met Ala Arg Glu Val Asn		
	645 650 655		
35			
	ctc gtg ctt ggg caa atc att gcc aag cag cgc ggt ctc cct gcc gag	2254	
	Leu Val Leu Gly Gln Ile Ile Ala Lys Gln Arg Gly Leu Pro Ala Glu		
	660 665 670		
40			
	aag ggc gag gag atg gtg aag cac atg cgc agc agc ggc agc tac cag	2302	
	Lys Gly Glu Glu Met Val Lys His Met Arg Ser Ser Gly Ser Tyr Gln		
	675 680 685 690		
	gac gat gtc tgg tcc taa aa	2322	
	Asp Asp Val Trp Ser *		
	695		
45			
	<210> 6		
	<211> 695		
	<212> PRT		
	<213> <i>Aspergillus ochraceus</i>		30
50			
	<400> 6		
	Met Ala Gln Leu Asp Thr Leu Asp Leu Val Val Leu Val Ala Leu Leu		
	1 5 10 15		
	Val Gly Ser Val Ala Tyr Phe Thr Lys Gly Thr Tyr Trp Ala Val Ala		
	20 25 30		
	Lys Asp Pro Tyr Ala Ser Ala Gly Pro Ala Met Asn Gly Gly Ala Lys		
	35 40 45		
55			
	Ala Gly Lys Thr Arg Asp Ile Val Gln Lys Met Asp Glu Thr Gly Lys		
	50 55 60		
	Asn Cys Val Ile Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Asp Tyr		

	65	70	75	80	
	Ala Ser Arg Leu Ala Lys Glu Gly Ser Gln Arg Phe Gly Leu Lys Thr				
		85	90	95	
5	Met Val Ala Asp Leu Glu Asp Tyr Asp Tyr Glu Asn Leu Glu Lys Phe				
		100	105	110	
	Pro Glu Asp Lys Val Val Phe Phe Val Leu Ala Thr Tyr Gly Glu Gly				
		115	120	125	
	Glu Pro Thr Asp Asn Ala Val Glu Phe Tyr Gln Phe Val Thr Gly Glu				
		130	135	140	
10	Asp Ala Ala Phe Glu Ser Gly Ala Thr Ala Asp Asp Lys Pro Leu Ser				
		145	150	155	160
	Ser Leu Lys Tyr Val Thr Phe Gly Leu Gly Asn Asn Thr Tyr Glu His				
		165	170	175	
15	Tyr Asn Ala Met Val Arg Asn Val Asp Ala Ala Leu Thr Lys Phe Gly				10
		180	185	190	
	Ala Gln Arg Ile Gly Ser Ala Gly Glu Gly Asp Asp Gly Ala Gly Thr				
		195	200	205	
	Met Glu Glu Asp Phe Leu Ala Trp Lys Glu Pro Met Trp Ala Ala Leu				
		210	215	220	
20	Ser Glu Ala Met Asn Leu Gln Glu Arg Asp Ala Val Tyr Glu Pro Val				
		225	230	235	240
	Phe Asn Val Thr Glu Asp Glu Ser Leu Ser Pro Glu Asp Glu Asn Val				
		245	250	255	
25	Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Gln Gly His Leu Gln Gly Glu Pro Lys Gly				
		260	265	270	
	Pro Tyr Ser Ala His Asn Pro Phe Ile Ala Pro Ile Ser Glu Ser Arg				
		275	280	285	
	Glu Leu Phe Asn Val Lys Asp Arg Asn Cys Leu His Met Glu Ile Ser				
		290	295	300	
30	Ile Ala Gly Ser Asn Leu Thr Tyr Gln Thr Gly Asp His Ile Ala Val				20
		305	310	315	320
	Trp Pro Thr Asn Ala Gly Ser Glu Val Asp Arg Phe Leu Gln Ala Phe				
		325	330	335	
35	Gly Leu Glu Gly Lys Arg His Ser Val Ile Asn Ile Lys Gly Ile Asp				
		340	345	350	
	Val Thr Ala Lys Val Pro Ile Pro Thr Pro Thr Thr Tyr Asp Ala Ala				
		355	360	365	
	Val Arg Tyr Tyr Leu Glu Val Cys Ala Pro Val Ser Arg Gln Phe Val				
		370	375	380	
40	Ser Thr Leu Ala Ala Phe Ala Pro Asp Glu Ala Thr Lys Ala Glu Ile				
		385	390	395	400
	Val Arg Leu Gly Gly Asp Lys Asp Tyr Phe His Glu Lys Ile Thr Asn				
		405	410	415	
45	Arg Cys Phe Asn Ile Ala Gln Ala Leu Gln Ser Ile Thr Ser Lys Pro				
		420	425	430	
	Phe Thr Ala Val Pro Phe Ser Leu Leu Ile Glu Gly Ile Thr Lys Leu				30
		435	440	445	
	Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Ser Leu Val Gln Lys Asp				
		450	455	460	
50	Lys Ile Ser Ile Thr Ala Val Val Glu Ser Val Arg Leu Pro Gly Glu				
		465	470	475	480
	Glu His Ile Val Lys Gly Val Thr Thr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Lys				
		485	490	495	
	Glu Lys Gln Asn Gly Glu Pro Ser Pro Asp Pro His Gly Leu Thr Tyr				
55		500	505	510	
	Ser Ile Thr Gly Pro Arg Asn Lys Tyr Asp Gly Ile His Val Pro Val				
		515	520	525	

	His Val Arg His Ser Asn Phe Lys Leu Pro Ser Asp Pro Ser Arg Pro		
	530 535 540		
	Val Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly Phe		
	545 550 555 560		
5	Ile Gln Glu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Lys Gly Glu Lys Val Gly Thr		
	565 570 575		
	Thr Leu Leu Phe Phe Gly Cys Arg Lys Ser Asp Glu Asp Phe Leu Tyr		
	580 585 590		
	Lys Asp Glu Trp Lys Thr Phe Gln Glu Gln Leu Gly Asp Ser Leu Lys		
10	595 600 605		
	Ile Ile Thr Ala Phe Ser Arg Glu Ser Ala Glu Lys Val Tyr Val Gln		
	610 615 620		
	His Arg Leu Arg Glu His Ala Glu Leu Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln		
	625 630 635 640		10
15	Lys Ala Thr Phe Tyr Val Cys Gly Asp Ala Ala Asn Met Ala Arg Glu		
	645 650 655		
	Val Asn Leu Val Leu Gly Gln Ile Ile Ala Lys Gln Arg Gly Leu Pro		
	660 665 670		
	Ala Glu Lys Gly Glu Glu Met Val Lys His Met Arg Ser Ser Gly Ser		
20	675 680 685		
	Tyr Gln Asp Asp Val Trp Ser		
	690 695		
	<210> 7		
25	<211> 36		
	<212> DNA		
	<213> human primer H. oxred 1A		
	<400> 7		
30	gacgggatcc aatatgggag actccacgt ggacac	36	20
	<210> 8		
	<211> 36		
	<212> DNA		
35	<213> human primer H. oxred 1B		
	<400> 8		
	gacgggatcc aatatgggag actccacgt ggacac	36	
40	<210> 9		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> human primer H. oxred 2A		
45	<400> 9		
	ctctgctctc gtcaaccagc tg	22	30
	<210> 10		
	<211> 35		
50	<212> DNA		
	<213> human primer H. oxred 2B		
	<400> 10		
55	gacgggtacc ttagctccac acgtccaggg agtag	35	
	<210> 11		
	<211> 20		

<212> DNA
 <213> Aspergillus primer A. oxred-for1

 <220>
 5 <221> modified_base
 <222> (5)...(5)
 <223> I - Inosine

 <221> modified_base
 10 <222> (9)...(9)
 <223> I - Inosine

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(20)
 15 <223> n = Inosine 10

 <400> 11
 gacgggngcng gtacaatgga 20

 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Aspergillus Primer A.oxred-rev1

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (4)...(4)
 <223> I - Inosine

 <221> modified_base
 30 <222> (10)...(10)
 <223> I - Inosine 20

 <221> modified_base
 <222> (16)...(16)
 <223> I - Inosine

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(26)
 40 <223> n = Inosine

 <400> 12
 ttangaccan acatcctcct ggtagc 26

 <210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> E. coli Primer pSport-for1

 <400> 13
 50 caagctctaa tacgactcac tataggga 28

 <210> 14
 <211> 22
 55 <212> DNA
 <213> Aspergillus Primer A.oxred-rev2

	<400> 14		
	caggaaccga tcgacctcgg aa	22	
5	<210> 15		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Aspergillus Primer A.oxred-rev3		
10	<400> 15		
	gtcacctca ccagcagagc caatg	25	
	<210> 16		
	<211> 28		
	<212> DNA		10
15	<213> Aspergillus Primer A.oxred-rev4		
	<400> 16		
	ccacattgcg aaccatagcg ttgtagtg	28	
20	<210> 17		
	<211> 34		
	<212> DNA		
	<213> E. coli Primer pSport-for2		
25	<400> 17		
	gccaaagctct aatacgactc actataggga aagc	34	
	<210> 18		
	<211> 27		
	<212> DNA		20
30	<213> Aspergillus Primer A.oxred-for2		
	<400> 18		
35	gtcgacatgg cgcaactcga tactctc	27	
	<210> 19		
	<211> 31		
	<212> DNA		
	<213> Aspergillus Primer A.oxred-rev5		
40	<400> 19		
	ctcgagttag gaccagacat cgtcctggta g	31	
	<210> 20		
	<211> 24		
	<212> DNA		30
45	<213> Aspergillus Primer A.oxred-for3		
	<400> 20		
50	ggatccctcg cgacctgtga tcat	24	
	<210> 21		
	<211> 38		
	<212> DNA		
55	<213> Aspergillus Primer A.oxred-for4		
	<400> 21		

cgaagatttc ttgtacaagg atgaatggaa gacttttc 38

<210> 22
 <211> 36
 5 <212> DNA
 <213> Aspergillus Primer A.oxred-rev6

<400> 22
 ctgaaaagtc ttccattcat ccttgtagaa gaaatc 36

10 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Aspergillus 11aOH peptide 1 10

15 <400> 23
 Ala Ala Ala Tyr Trp Leu Ala Thr Leu Gln Pro Ser Asp Leu Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Asn

20 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Aspergillus 11aOH peptide 2:

<400> 24
 Cys Arg Gln Ile Leu Thr Pro Tyr Ile His Lys Arg Lys Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 30 Gly Thr Thr Asp 20 20

<210> 25
 <211> 21
 35 <212> PRT
 <213> Aspergillus 11aOH peptide 3

<400> 25
 His Met Gly Phe Gly His Gly Val His Ala Cys Pro Gly Arg Phe Phe
 1 5 10 15
 40 Ala Ser Asn Glu Ile 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Human oxr peptide 1 30

<400> 26
 Cys Thr Tyr Trp Ala Val Ala Lys Asp Pro Tyr Ala Ser Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Met Asn Gly 20

55 <210> 27
 <211> 526
 <212> PRT

<213> Gibberella fujikuroi CAA75565

<400> 27

5 Met Ala Asn His Ser Ser Ser Tyr Tyr His Glu Phe Tyr Lys Asp His
 1 5 10 15
 Ser His Thr Val Leu Thr Leu Met Ser Glu Lys Pro Val Ile Leu Pro
 20 25 30
 Ser Leu Ile Leu Gly Thr Cys Ala Val Leu Leu Cys Ile Gln Trp Leu
 35 40 45
 10 Lys Pro Gln Pro Leu Ile Met Val Asn Gly Arg Lys Phe Gly Glu Leu
 50 55 60
 Ser Asn Val Arg Ala Lys Arg Asp Phe Thr Phe Gly Ala Arg Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Glu Lys Gly Leu Lys Met Ser Pro Asp Lys Pro Phe Arg Ile Met
 85 90 95
 15 Gly Asp Val Gly Glu Leu His Ile Leu Pro Pro Lys Tyr Ala Tyr Glu
 100 105 110
 Val Arg Asn Asn Glu Lys Leu Ser Phe Thr Met Ala Ala Phe Lys Trp
 115 120 125
 20 Phe Tyr Ala His Leu Pro Gly Phe Glu Gly Phe Arg Glu Gly Thr Asn
 130 135 140
 Glu Ser His Ile Met Lys Leu Val Ala Arg His Gln Leu Thr His Gln
 145 150 155 160
 Leu Thr Leu Val Thr Gly Ala Val Ser Glu Glu Cys Ala Leu Val Leu
 165 170 175
 25 Lys Asp Val Tyr Thr Asp Ser Pro Glu Trp His Asp Ile Thr Ala Lys
 180 185 190
 Asp Ala Asn Met Lys Leu Met Ala Arg Ile Thr Ser Arg Val Phe Leu
 195 200 205
 30 Gly Lys Glu Met Cys Arg Asn Pro Gln Trp Leu Arg Ile Thr Ser Thr
 210 215 220
 Tyr Ala Val Ile Ala Phe Arg Ala Val Glu Glu Leu Arg Leu Trp Pro
 225 230 235 240
 Ser Trp Leu Arg Pro Val Val Gln Trp Phe Met Pro His Cys Thr Gln
 245 250 255
 35 Ser Arg Ala Leu Val Gln Glu Ala Arg Asp Leu Ile Asn Pro Leu Leu
 260 265 270
 Glu Arg Arg Arg Glu Glu Lys Ala Glu Ala Glu Arg Thr Gly Glu Lys
 275 280 285
 40 Val Thr Tyr Asn Asp Ala Val Glu Trp Leu Asp Asp Leu Ala Arg Glu
 290 295 300
 Lys Gly Val Gly Tyr Asp Pro Ala Cys Ala Gln Leu Ser Leu Ser Val
 305 310 315 320
 Ala Ala Leu His Ser Thr Thr Asp Phe Phe Thr Gln Val Met Phe Asp
 325 330 335
 45 Ile Ala Gln Asn Pro Glu Leu Ile Glu Pro Leu Arg Glu Glu Ile Ile
 340 345 350
 Ala Val Leu Gly Lys Gln Gly Trp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Asn Leu
 355 360 365
 50 Lys Leu Met Asp Ser Val Leu Lys Glu Ser Gln Arg Leu Lys Pro Ile
 370 375 380
 Ala Ile Ala Ser Met Arg Arg Phe Thr Thr His Asn Val Lys Leu Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Val Ile Leu Pro Lys Asn Lys Leu Thr Leu Val Ser Ala His
 405 410 415
 55 Gln His Trp Asp Pro Glu Tyr Tyr Lys Asp Pro Leu Lys Phe Asp Gly
 420 425 430

10

20

30

Tyr Arg Phe Phe Asn Met Arg Arg Glu Pro Gly Lys Glu Ser Lys Ala
 435 440 445
 Gln Leu Val Ser Ala Thr Pro Asp His Met Gly Phe Gly Tyr Gly Leu
 450 455 460
 5 His Ala Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Ser Glu Glu Ile Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Leu Ser His Ile Leu Leu Lys Tyr Asp Phe Lys Pro Val Glu Gly Ser
 485 490 495
 10 Ser Met Glu Pro Arg Lys Tyr Gly Leu Asn Met Asn Ala Asn Pro Thr
 500 505 510
 Ala Lys Leu Ser Val Arg Arg Arg Lys Glu Glu Ile Ala Ile
 515 520 525

 <210> 28
 15 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa CAB91316

 <400> 28
 20 Met Glu Arg Leu Asp Ile Lys Ser Ile Thr Asp Pro Ser Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 Phe Ser Tyr Leu Val Thr Ala Phe Leu Leu Ala Val Val Val Tyr Ser
 20 25 30
 25 Leu Gln Gly Pro Arg Phe Pro Lys Asn Ile Lys His Leu Asn Pro Lys
 35 40 45
 Gly Pro Leu Glu Phe Ser Asp Thr Arg Pro Lys Lys Glu Phe Val Tyr
 50 55 60
 Gly Ser Arg Gln Met Leu Ala Asn Trp Phe Lys Ala Asn Pro Asn Lys
 65 70 75 80
 30 Pro Cys Arg Val Ile Ser Asp Phe Gly Glu Ala Ile Val Leu Pro Pro
 85 90 95
 Arg Met Ala Asn Glu Ile Lys Asn Asp Asp Arg Leu Ser Phe Thr Arg
 100 105 110
 Trp Thr Tyr Lys Ala Phe His Gly His Leu Pro Gly Phe Glu Gly Phe
 115 120 125
 35 Gly Glu Ala Ser Arg Glu Ser His Ile Val Gln Glu Val Ile Met Arg
 130 135 140
 Asp Leu Thr Lys Tyr Leu Asn Lys Val Thr Glu Pro Leu Ala Gln Glu
 145 150 155 160
 40 Thr Ser Met Ala Met Glu Ala Asn Leu Pro Lys Ala Ala Asn Gly Glu
 165 170 175
 Trp Ser Thr Ile Asn Leu Arg Ser Lys Ile Leu Pro Ile Val Ala Arg
 180 185 190
 Ile Ser Ser Arg Val Phe Leu Gly Glu Glu Leu Cys Arg Asn Glu Glu
 195 200 205
 45 Trp Leu Lys Val Thr Gln Gln Tyr Thr Ile Asp Gly Phe Gly Ala Ala
 210 215 220
 Glu Asp Leu Arg Leu Trp Pro Ala Ala Leu Arg Pro Ile Val His Trp
 225 230 235 240
 50 Phe Leu Pro Ser Cys Gln Arg Ala Arg Ala Asp Val Arg Val Ala Arg
 245 250 255
 Ser Ile Leu Asp Pro Val Leu Lys Lys Arg Arg Gln Glu Lys Ala Ala
 260 265 270
 Asn Gly Gly Lys Ala Glu His Asp Asp Ala Ile Glu Trp Phe Glu Arg
 275 280 285
 55 Thr Ala Lys Gly Lys Tyr Tyr Asp Pro Ala Val Ala Gln Leu Val Leu
 290 295 300

10

20

30

	Ser Leu Val Ala Ile His Thr Thr Ser Asp Leu Thr Cys Gln Val Met	
	305 310 315 320	
	Thr Asn Leu Met Gln Asn Pro Glu Phe Ile Ala Pro Leu Arg Glu Glu	
	325 330 335	
5	Met Ile Gln Val Leu Ser Glu Gly Gly Trp Lys Lys Thr Ser Leu Tyr	
	340 345 350	
	Asn Met Lys Leu Leu Asp Ser Val Ile Lys Glu Ser Gln Arg Val Lys	
	355 360 365	
10	Pro Thr Gly Val Ala Ser Met Arg Arg Tyr Ala Glu Lys Asp Val Thr	
	370 375 380	
	Leu Ser Asp Gly Thr Phe Ile Pro Lys Gly Gly Phe Val Ala Val Ser	
	385 390 395 400	
	Ala His Asp Met Trp Asn Ser Glu Val Tyr Glu Gln Ala Glu Lys Trp	
	405 410 415	
15	Asp Gly Arg Arg Phe Leu Arg Met Arg Glu Thr Pro Gly Ala Gly Lys	
	420 425 430	
	Glu Asn Val Ala Gln Leu Val Ser Thr Ala Pro Glu His Leu Gly Phe	
	435 440 445	
20	Gly His Gly Gln His Ala Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Ala Asn Glu	
	450 455 460	
	Ile Lys Ile Ala Leu Val His Leu Leu Leu Asn Tyr Glu Trp Arg Leu	
	465 470 475 480	
	Pro Glu Gly Ser Asp Pro Lys Ile Arg Thr Phe Gly Phe Ser Met Gly	
	485 490 495	
25	Val Asp Pro Ser Leu Lys Val Glu Tyr Lys Gly Arg Gln Pro Glu Ile	
	500 505 510	
	Glu Leu	
30	<210> 29	10
	<211> 495	
	<213> PRT	
	<213> Catharanthus roseus CAB56503	
35	<400> 29	
	Leu Leu Phe Cys Phe Ile Leu Ser Lys Thr Thr Lys Lys Phe Gly Gln	
	1 5 10 15	
	Asn Ser Gln Tyr Ser Asn His Asp Glu Leu Pro Pro Gly Pro Pro Gln	
	20 25 30	
40	Ile Pro Ile Leu Gly Asn Ala His Gln Leu Ser Gly Gly His Thr His	
	35 40 45	
	His Ile Leu Arg Asp Leu Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Leu Met His Leu	
	50 55 60	
45	Lys Ile Gly Glu Val Ser Thr Ile Val Ala Ser Ser Pro Gln Ile Ala	
	65 70 75 80	
	Glu Glu Ile Phe Arg Thr His Asp Ile Leu Phe Ala Asp Arg Pro Ser	
	85 90 95	
	Asn Leu Glu Ser Phe Lys Ile Val Ser Tyr Asp Phe Ser Asp Met Val	
	100 105 110	
50	Val Ser Pro Tyr Gly Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Arg Lys Ile Ser Met	
	115 120 125	
	Met Glu Leu Leu Ser Gln Lys Ser Val Gln Ser Phe Arg Ser Ile Arg	
	130 135 140	
55	Glu Glu Glu Val Leu Asn Phe Ile Lys Ser Ile Gly Ser Lys Glu Gly	
	145 150 155 160	
	Thr Arg Ile Asn Leu Ser Lys Glu Ile Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ile	
	165 170 175	

10

20

30

	Thr Thr Arg Ala Ala Phe Gly Glu Lys Asn Lys Asn Thr Glu Glu Phe	
	180 185 190	
	Ile Arg Leu Leu Asp Gln Leu Thr Lys Ala Val Ala Glu Pro Asn Ile	
	195 200 205	
5	Ala Asp Met Phe Pro Ser Leu Lys Phe Leu Gln Leu Ile Ser Thr Ser	
	210 215 220	
	Lys Tyr Lys Ile Glu Lys Ile His Lys Gln Phe Asp Val Ile Val Glu	
	225 230 235 240	
10	Thr Ile Leu Lys Gly His Lys Glu Lys Ile Asn Lys Pro Leu Ser Gln	
	245 250 255	
	Glu Asn Gly Glu Lys Lys Glu Asp Leu Val Asp Val Leu Leu Asn Ile	
	260 265 270	
	Gln Arg Arg Asn Asp Phe Glu Ala Pro Leu Gly Asp Lys Asn Ile Lys	
	275 280 285	
15	Ala Ile Ile Phe Asn Ile Phe Ser Ala Gly Thr Glu Thr Ser Ser Thr	
	290 295 300	
	Thr Val Asp Trp Ala Met Cys Glu Met Ile Lys Asn Pro Thr Val Met	
	305 310 315 320	
20	Lys Lys Ala Gln Glu Glu Val Arg Lys Val Phe Asn Glu Glu Gly Asn	
	325 330 335	
	Val Asp Glu Thr Lys Leu His Gln Leu Lys Tyr Leu Gln Ala Val Ile	
	340 345 350	
	Lys Glu Thr Leu Arg Leu His Pro Pro Val Pro Leu Leu Leu Pro Arg	
	355 360 365	
25	Glu Cys Arg Glu Gln Cys Lys Ile Lys Gly Tyr Thr Ile Pro Ser Lys	
	370 375 380	
	Ser Arg Val Ile Val Asn Ala Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Tyr	
	385 390 395 400	
30	Trp Ile Glu Pro Glu Lys Phe Asn Pro Asp Arg Phe Leu Glu Ser Lys	
	405 410 415	
	Val Asp Phe Lys Gly Asn Ser Phe Glu Tyr Leu Pro Phe Gly Gly Gly	
	420 425 430	
	Arg Arg Ile Cys Pro Gly Ile Thr Phe Ala Leu Ala Asn Ile Glu Leu	
	435 440 445	
35	Pro Leu Ala Gln Leu Leu Phe His Phe Asp Trp Gln Ser Asn Thr Glu	
	450 455 460	
	Lys Leu Asn Met Lys Glu Ser Arg Gly Val Thr Val Arg Arg Glu Asp	
	465 470 475 480	
40	Asp Leu Tyr Leu Thr Pro Val Asn Phe Ser Ser Ser Ser Pro Ala	
	485 490 495	
	<210> 30	
	<211> 510	
	<212> PRT	
45	<213> Glycine max AAB94588	
	<400> 30	
	Met Val Met Glu Leu His Asn His Thr Pro Phe Ser Ile Tyr Phe Ile	
	1 5 10 15	
50	Thr Ser Ile Leu Phe Ile Phe Phe Val Phe Phe Lys Leu Val Gln Arg	
	20 25 30	
	Ser Asp Ser Lys Thr Ser Ser Thr Cys Lys Leu Pro Pro Gly Pro Arg	
	35 40 45	
55	Thr Leu Pro Leu Ile Gly Asn Ile His Gln Ile Val Gly Ser Leu Pro	
	50 55 60	
	Val His Tyr Tyr Leu Lys Asn Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Leu Met	
	65 70 75 80	

30

<212> PRT

<213> Gibberella fujikuroi CAA75566

<400> 31

5 Met Ser Ile Phe Asn Met Ile Thr Ser Tyr Ala Gly Ser Gln Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Phe Tyr Ile Ala Ile Phe Val Phe Thr Leu Val Pro Trp Ala Ile
 20 25 30
 10 Arg Phe Ser Trp Leu Glu Leu Arg Lys Gly Ser Val Val Pro Leu Ala
 35 40 45
 Asn Pro Pro Asp Ser Leu Phe Gly Thr Gly Lys Thr Arg Arg Ser Phe
 50 55 60
 Val Lys Leu Ser Arg Glu Ile Leu Ala Lys Ala Arg Ser Leu Phe Pro
 65 70 75 80
 15 Asn Glu Pro Phe Arg Leu Ile Thr Asp Trp Gly Glu Val Leu Ile Leu
 85 90 95
 Pro Pro Asp Phe Ala Asp Glu Ile Arg Asn Asp Pro Arg Leu Ser Phe
 100 105 110
 Ser Lys Ala Ala Met Gln Asp Asn His Ala Gly Ile Pro Gly Phe Glu
 115 120 125
 20 Thr Val Ala Leu Val Gly Arg Glu Asp Gln Leu Ile Gln Lys Val Ala
 130 135 140
 Arg Lys Gln Leu Thr Lys His Leu Ser Ala Val Ile Glu Pro Leu Ser
 145 150 155 160
 25 Arg Glu Ser Thr Leu Ala Val Ser Leu Asn Phe Gly Glu Thr Thr Glu
 165 170 175
 Trp Arg Ala Ile Arg Leu Lys Pro Ala Ile Leu Asp Ile Ile Ala Arg
 180 185 190
 30 Ile Ser Ser Arg Ile Tyr Leu Gly Asp Gln Leu Cys Arg Asn Glu Ala
 195 200 205
 Trp Leu Lys Ile Thr Lys Thr Tyr Thr Thr Asn Phe Tyr Thr Ala Ser
 210 215 220
 Thr Asn Leu Arg Met Phe Pro Arg Ser Ile Arg Pro Leu Ala His Trp
 225 230 235 240
 35 Phe Leu Pro Glu Cys Arg Lys Leu Arg Gln Glu Arg Lys Asp Ala Ile
 245 250 255
 Gly Ile Ile Thr Pro Leu Ile Glu Arg Arg Arg Glu Leu Arg Arg Ala
 260 265 270
 Ala Ile Ala Ala Gly Gln Pro Leu Pro Val Phe His Asp Ala Ile Asp
 275 280 285
 40 Trp Ser Glu Gln Glu Ala Glu Ala Ala Gly Thr Gly Ala Ser Phe Asp
 290 295 300
 Pro Val Ile Phe Gln Leu Thr Leu Ser Leu Leu Ala Ile His Thr Thr
 305 310 315 320
 45 Tyr Asp Leu Leu Gln Gln Thr Met Ile Asp Leu Gly Arg His Pro Glu
 325 330 335
 Tyr Ile Glu Pro Leu Arg Gln Glu Val Val Gln Leu Leu Arg Glu Glu
 340 345 350
 Gly Trp Lys Lys Thr Thr Leu Phe Lys Met Lys Leu Leu Asp Ser Ala
 355 360 365
 50 Ile Lys Glu Ser Gln Arg Met Lys Pro Gly Ser Ile Val Thr Met Arg
 370 375 380
 Arg Tyr Val Thr Glu Asp Ile Thr Leu Ser Ser Gly Leu Thr Leu Lys
 385 390 395 400
 55 Lys Gly Thr Arg Leu Asn Val Asp Asn Arg Arg Leu Asp Asp Pro Lys
 405 410 415
 Ile Tyr Asp Asn Pro Glu Val Tyr Asn Pro Tyr Arg Phe Tyr Asp Met

10

20

30

420 425 430
 Arg Ser Glu Ala Gly Lys Asp His Gly Ala Gln Leu Val Ser Thr Gly
 435 440 445
 Ser Asn His Met Gly Phe Gly His Gly Gln His Ser Cys Pro Gly Arg
 450 455 460
 Phe Phe Ala Ala Asn Glu Ile Lys Val Ala Leu Cys His Ile Leu Val
 465 470 475 480
 Lys Tyr Asp Trp Lys Leu Cys Pro Asp Thr Glu Thr Lys Pro Asp Thr
 485 490 495
 10 Arg Gly Met Ile Ala Lys Ser Ser Pro Val Thr Asp Ile Leu Ile Lys
 500 505 510
 Arg Arg Glu Ser Val Glu Leu Asp Leu Glu Ala Ile
 515 520
 15 <210> 32
 <211> 528
 <212> FRT
 <213> Aspergillus terreus AAD34552
 20 <400> 32
 Met Thr Val Asp Ala Leu Thr Gln Pro His His Leu Leu Ser Leu Ala
 1 5 10 15
 Trp Asn Asp Thr Gln Gln His Gly Ser Trp Phe Ala Pro Leu Val Thr
 20 25 30
 25 Thr Ser Ala Gly Leu Leu Cys Leu Leu Tyr Leu Cys Ser Ser Gly
 35 40 45
 Arg Arg Ser Asp Leu Pro Val Phe Asn Pro Lys Thr Trp Trp Glu Leu
 50 55 60
 Thr Thr Met Arg Ala Lys Arg Asp Phe Asp Ala Asn Ala Pro Ser Trp
 65 70 75 80
 30 Ile Glu Ser Trp Phe Ser Gln Asn Asp Lys Pro Ile Arg Phe Ile Val
 85 90 95
 Asp Ser Gly Tyr Cys Thr Ile Leu Pro Ser Ser Met Ala Asp Glu Phe
 100 105 110
 35 Arg Lys Met Lys Glu Leu Cys Met Tyr Lys Phe Leu Gly Thr Asp Phe
 115 120 125
 His Ser His Leu Pro Gly Phe Asp Gly Phe Lys Glu Val Thr Arg Asp
 130 135 140
 Ala His Leu Ile Thr Lys Val Val Met Asn Gln Phe Gln Thr Gln Ala
 145 150 155 160
 40 Pro Lys Tyr Val Lys Pro Leu Ala Asn Glu Ala Ser Gly Ile Ile Thr
 165 170 175
 Asp Ile Phe Gly Asp Ser Asn Glu Trp His Thr Val Pro Val Tyr Asn
 180 185 190
 45 Gln Cys Leu Asp Leu Val Thr Arg Thr Val Thr Phe Ile Met Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Leu Ala His Asn Glu Glu Trp Leu Asp Ile Ala Lys His His
 210 215 220
 Ala Val Thr Met Ala Ile Gln Ala Arg Gln Leu Arg Leu Trp Pro Val
 225 230 235 240
 50 Ile Leu Arg Pro Leu Val His Trp Leu Glu Pro Gln Gly Ala Lys Leu
 245 250 255
 Arg Ala Gln Val Arg Arg Ala Arg Gln Leu Leu Asp Pro Ile Ile Gln
 260 265 270
 55 Glu Arg Arg Ala Glu Arg Asp Ala Cys Arg Ala Lys Gly Ile Glu Pro
 275 280 285
 Pro Arg Tyr Val Asp Ser Ile Gln Trp Phe Glu Asp Thr Ala Lys Gly

10

20

30

290 295 300
 Lys Trp Tyr Asp Ala Ala Gly Ala Gln Leu Ala Met Asp Phe Ala Gly
 305 310 315 320
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asp Leu Leu Ile Gly Gly Leu Val Asp Ile Val
 325 330 335
 Arg His Pro His Leu Leu Glu Pro Leu Arg Asp Glu Ile Arg Thr Val
 340 345 350
 Ile Gly Gln Gly Gly Trp Thr Pro Ala Ser Leu Tyr Lys Leu Lys Leu
 355 360 365
 Leu Asp Ser Cys Leu Lys Glu Ser Gln Arg Val Lys Pro Val Glu Cys
 370 375 380
 Ala Thr Met Arg Ser Tyr Ala Leu Gln Asp Val Thr Phe Ser Asn Gly
 385 390 395 400
 Thr Phe Ile Pro Lys Gly Glu Leu Val Ala Val Ala Ala Asp Arg Met
 405 410 415
 Ser Asn Pro Glu Val Trp Pro Glu Pro Ala Lys Tyr Asp Pro Tyr Arg
 420 425 430
 Tyr Met Arg Leu Arg Glu Asp Pro Ala Lys Ala Phe Ser Ala Gln Leu
 435 440 445
 Glu Asn Thr Asn Gly Asp His Ile Gly Phe Gly Trp His Pro Arg Ala
 450 455 460
 Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Ser Lys Glu Ile Lys Met Met Leu Ala
 465 470 475 480
 Tyr Leu Leu Ile Arg Tyr Asp Trp Lys Val Val Pro Asp Glu Pro Leu
 485 490 495
 Gln Tyr Tyr Arg His Ser Phe Ser Val Arg Ile His Pro Thr Thr Lys
 500 505 510
 Leu Met Met Arg Arg Arg Asp Glu Asp Ile Arg Leu Pro Gly Ser Leu
 515 520 525
 <210> 33
 <211> 388
 <212> FRT
 <213> Gibberella fujikuroi CAA75567
 <400> 33
 Met Lys Tyr Thr Thr Cys Gln Met Asn Ile Phe Pro Ser Leu Trp Ser
 1 5 10 15
 Met Lys Thr Ser Phe Arg Trp Pro Arg Thr Ser Lys Trp Ser Ser Val
 20 25 30
 Ser Leu Tyr Asp Met Met Leu Arg Thr Val Ala Leu Leu Ser Gly Arg
 35 40 45
 Ala Phe Val Gly Leu Pro Leu Cys Arg Asp Glu Gly Trp Leu Gln Ala
 50 55 60
 Ser Ile Gly Tyr Thr Val Gln Cys Val Ser Ile Arg Asp Gln Leu Phe
 65 70 75 80
 Thr Trp Ser Pro Val Leu Arg Pro Ile Ile Gly Pro Phe Leu Pro Ser
 85 90 95
 Val Arg Ser Val Arg Arg His Leu Arg Phe Ala Ala Glu Ile Met Ala
 100 105 110
 Pro Leu Ile Ser Gln Ala Leu Gln Asp Glu Lys Gln His Arg Ala Asp
 115 120 125
 Thr Leu Leu Ala Asp Gln Thr Glu Gly Arg Gly Thr Phe Ile Ser Trp
 130 135 140
 Leu Leu Arg His Leu Pro Glu Glu Leu Arg Thr Pro Glu Gln Val Gly
 145 150 155 160
 Leu Asp Gln Met Leu Val Ser Phe Ala Ala Ile His Thr Thr Thr Met

10

20

30

165 170 175
 Ala Leu Thr Lys Val Val Trp Glu Leu Val Lys Arg Pro Glu Tyr Ile
 180 185 190
 Glu Pro Leu Arg Thr Glu Met Gln Asp Val Phe Gly Pro Asp Ala Val
 195 200 205
 Ser Pro Asp Ile Cys Ile Asn Lys Glu Ala Leu Ser Arg Leu His Lys
 210 215 220
 Leu Asp Ser Phe Ile Arg Glu Val Gln Arg Trp Cys Pro Ser Thr Phe
 225 230 235 240
 Val Thr Pro Ser Arg Arg Val Met Lys Ser Met Thr Leu Ser Asn Gly
 245 250 255
 Ile Lys Leu Gln Arg Gly Thr Ser Ile Ala Phe Pro Ala His Ala Ile
 260 265 270
 His Met Ser Glu Glu Thr Pro Thr Phe Ser Pro Asp Phe Ser Ser Asp
 275 280 285
 Phe Glu Asn Pro Ser Pro Arg Ile Phe Asp Gly Phe Arg Tyr Leu Asn
 290 295 300
 Leu Arg Ser Ile Lys Gly Gln Gly Ser Gln His Gln Ala Ala Thr Thr
 305 310 315 320
 Gly Pro Asp Tyr Leu Ile Phe Asn His Gly Lys His Ala Cys Pro Gly
 325 330 335
 Arg Phe Phe Ala Ile Ser Glu Ile Lys Met Ile Leu Ile Glu Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Tyr Asp Phe Arg Leu Glu Asp Gly Lys Pro Gly Pro Glu Leu
 355 360 365
 Met Arg Val Gly Thr Glu Thr Arg Leu Asp Thr Lys Ala Gly Leu Glu
 370 375 380
 Met Arg Arg Arg
 385
 <210> 34
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Gibberella fujikuroi CAA76703
 390
 <400> 34
 Met Ser Lys Ser Asn Ser Met Asn Ser Thr Ser His Glu Thr Leu Phe
 1 5 10 15
 Gln Gln Leu Val Leu Gly Leu Asp Arg Met Pro Leu Met Asp Val His
 20 25 30
 Trp Leu Ile Tyr Val Ala Phe Gly Ala Trp Leu Cys Ser Tyr Val Ile
 35 40 45
 His Val Leu Ser Ser Ser Thr Val Lys Val Pro Val Val Gly Tyr
 50 55 60
 Arg Ser Val Phe Glu Pro Thr Trp Leu Leu Arg Leu Arg Phe Val Trp
 65 70 75 80
 Glu Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gln Gly Tyr Asn Lys Phe Lys Asp Ser
 85 90 95
 Ile Phe Gln Val Arg Lys Leu Gly Thr Asp Ile Val Ile Ile Pro Pro
 100 105 110
 Asn Tyr Ile Asp Glu Val Arg Lys Leu Ser Gln Asp Lys Thr Arg Ser
 115 120 125
 Val Glu Pro Phe Ile Asn Asp Phe Ala Gly Gln Tyr Thr Arg Gly Met
 130 135 140
 Val Phe Leu Gln Ser Asp Leu Gln Asn Arg Val Ile Gln Gln Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Pro Lys Leu Val Ser Leu Thr Lys Val Met Lys Glu Glu Leu Asp

10

20

30

[illegible]

	35	40	45	
	Thr Met Leu Asp His Leu Ser Asn Gly Arg Asn Glu His Ile Ala Asp			
	50	55	60	
5	Asp Val Glu Leu Gln Leu Leu His Gln Met Thr Leu Ile Ala Val Gly			
	65	70	75	80
	Thr Val Thr Thr Phe Ser Ser Thr Thr Gln Ala Ile Tyr Asp Leu Val			
	85	90	95	
	Ala His Pro Glu Tyr Ile Thr Ile Leu Arg Glu Glu Val Glu Ser Val			
	100	105	110	
10	Pro Arg Asp Pro Asn Gly Asn Phe Thr Lys Asp Ser Thr Val Ala Met			
	115	120	125	
	Asp Lys Leu Asp Ser Phe Leu Lys Glu Ser Gln Arg Phe Asn Ser Pro			
	130	135	140	
15	Asp Leu Ser Met Ser Asn Leu Lys Asn Tyr Lys Leu Cys Glu Ser Leu			10
	145	150	155	160
	Thr Gly His Ser Asn Leu Pro Thr Arg Thr Ile Ala Asp Met Lys Leu			
	165	170	175	
	Pro Asp Gly Thr Phe Val Pro Lys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Thr			
	180	185	190	
20	Cys Ser Ile His Lys Asp His Lys Leu Tyr Glu Asn Pro Glu Gln Phe			
	195	200	205	
	Asp Gly Leu Arg Phe His Lys Trp Arg Lys Ala Pro Gly Lys Glu Lys			
	210	215	220	
25	Arg Tyr Met Tyr Ser Ser Gly Thr Asp Asp Leu Ser Trp Gly Phe			
	225	230	235	240
	Gly Arg His Ala Cys Pro Gly Arg Tyr Leu Ser Ala Ile Asn Ile Lys			
	245	250	255	
	Leu Ile Met Ala Glu Leu Leu Met Asn Tyr Asp Ile Lys Leu Pro Asp			
	260	265	270	
30	Gly Leu Ser Arg Pro Lys Asn Ile Glu Phe Glu Val Leu Ala Ser Leu			20
	275	280	285	
	Asn Ala Cys Ala Asn Ala			
	290			
35	<210> 36			
	<211> 510			
	<212> PRT			
	<213> Caenorhabditis elegans CAA91268			
40	<400> 36			
	Met Ala Leu Leu Ile Leu Ser Ser Leu Val Ile Ser Ile Phe Thr Phe			
	1	5	10	15
	Phe Ile Tyr Ile Ile Leu Ala Arg Arg Glu Arg Phe Lys Leu Arg Glu			
	20	25	30	
45	Lys Ile Gly Leu Ser Gly Pro Glu Pro His Trp Phe Leu Gly Asn Leu			30
	35	40	45	
	Lys Gln Thr Ala Glu Arg Lys Glu Lys Leu Gly Tyr Asp Asp Ala Asn			
	50	55	60	
	Arg Trp Phe Asn Glu Leu His Glu Gln Tyr Gly Glu Thr Phe Gly Ile			
50	65	70	75	80
	Tyr Tyr Gly Ser Gln Met Asn Ile Val Ile Ser Asn Glu Lys Asp Ile			
	85	90	95	
	Lys Glu Val Phe Ile Lys Asn Phe Ser Asn Phe Ser Asp Arg Ser Val			
	100	105	110	
55	Pro Ser Ile Tyr Glu Ala Asn Gln Leu Thr Ala Ser Leu Leu Met Asn			
	115	120	125	
	Ser Tyr Ser Ser Gly Trp Lys His Thr Arg Ser Ala Ile Ala Pro Ile			

130 135 140
 Phe Ser Thr Gly Lys Met Lys Ala Met Gln Glu Thr Ile Asn Ser Lys
 145 150 155 160
 Val Asp Leu Phe Leu Asp Ile Leu Arg Glu Lys Ala Ser Ser Gly Gln
 5 165 170 175
 Lys Trp Asp Ile Tyr Asp Asp Phe Gln Gly Leu Thr Leu Asp Val Ile
 180 185 190
 Gly Lys Cys Ala Phe Ala Ile Asp Ser Asn Cys Gln Arg Asp Arg Asn
 195 200 205
 10 Asp Val Phe Tyr His Pro Val Thr Val Lys Ile Thr Ile Asn Asn Phe
 210 215 220
 Thr Tyr Phe His Ser Ser Ser Pro Gly Thr Phe His Phe Leu Glu Ser
 225 230 235 240
 Thr Leu Gln Ile His Thr Thr Gly Arg Cys Arg Asn Ser Thr Cys Arg
 15 245 250 255
 Arg Thr Val Lys Cys Val Gly Phe Arg Gln Asp Lys Ala Lys Phe Cys
 260 265 270
 Ser Asp Tyr Glu Arg Arg Arg Gly Gly Glu Gly Ser Asp Ser Val Asp
 275 280 285
 20 Leu Leu Lys Leu Leu Leu Asn Arg Glu Asp Asp Lys Ser Lys Pro Met
 290 295 300
 Thr Lys Gln Glu Val Ile Glu Asn Cys Phe Ala Phe Leu Leu Ala Gly
 305 310 315 320
 Tyr Glu Thr Thr Ser Thr Ala Met Thr Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ser
 25 325 330 335
 Lys Tyr Pro Asn Val Gln Gln Lys Leu Tyr Glu Glu Ile Met Glu Ala
 340 345 350
 Lys Glu Asn Gly Gly Leu Thr Tyr Asp Ser Ile His Asn Met Lys Tyr
 355 360 365
 30 Leu Asp Cys Val Tyr Lys Glu Thr Leu Arg Phe Tyr Pro Pro His Phe
 370 375 380
 Ser Phe Ile Arg Arg Leu Cys Arg Glu Asp Ile Thr Ile Arg Gly Gln
 385 390 395 400
 Phe Tyr Pro Lys Gly Ala Ile Val Val Cys Leu Pro His Thr Val His
 35 405 410 415
 Arg Asn Pro Glu Asn Trp Asp Ser Pro Glu Glu Phe His Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Glu Asn Trp Glu Glu Lys Ser Ser Ser Leu Lys Trp Ile Pro Phe
 435 440 445
 40 Gly Val Gly Pro Arg Tyr Cys Val Gly Met Arg Phe Ala Glu Met Glu
 450 455 460
 Phe Lys Thr Thr Ile Val Lys Leu Leu Asp Thr Phe Glu Leu Lys Gln
 465 470 475 480
 Phe Glu Gly Glu Ala Asp Leu Ile Pro Asp Cys Asn Gly Val Ile Met
 45 485 490 495
 Arg Pro Asn Asp Pro Val Arg Leu His Leu Lys Pro Arg Asn
 500 505 510

 <210> 37
 50 <211> 691
 <212> PRT
 <213> yeast P450 reductase

 <400> 37
 55 Met Pro Phe Gly Ile Asp Asn Thr Asp Phe Thr Val Leu Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Val Leu Leu Tyr Val Lys Arg Asn Ser Ile Lys Glu Leu

20 25 30
 Leu Met Ser Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Val Ser Ser Gly Asn Arg
 35 40 45
 Asp Ile Ala Gln Val Val Thr Glu Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Leu
 5 50 55 60
 Tyr Ala Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Asp Tyr Ala Lys Lys Phe Ser
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Val Ala Lys Phe Asn Leu Asn Val Met Cys Ala Asp Val
 85 90 95
 10 Glu Asn Tyr Asp Phe Glu Ser Leu Asn Asp Val Pro Val Ile Val Ser
 100 105 110
 Ile Phe Ile Ser Thr Tyr Gly Glu Gly Asp Phe Pro Asp Gly Ala Val
 115 120 125
 15 Asn Phe Glu Asp Phe Ile Cys Asn Ala Glu Ala Gly Ala Leu Ser Asn
 130 135 140
 Leu Arg Tyr Asn Met Phe Gly Leu Gly Asn Ser Thr Tyr Glu Phe Phe
 145 150 155 160
 Asn Gly Ala Ala Lys Lys Ala Glu Lys His Leu Ser Ala Ala Gly Ala
 165 170 175
 20 Ile Arg Leu Gly Lys Leu Gly Glu Ala Asp Asp Gly Ala Gly Thr Thr
 180 185 190
 Asp Glu Asp Tyr Met Ala Trp Lys Asp Ser Ile Leu Glu Val Leu Lys
 195 200 205
 25 Asp Glu Leu His Leu Asp Glu Gln Glu Ala Lys Phe Thr Ser Gln Phe
 210 215 220
 Gln Tyr Thr Val Leu Asn Glu Ile Thr Asp Ser Met Ser Leu Gly Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Ala His Tyr Leu Pro Ser His Gln Leu Asn Arg Asn Ala Asp
 245 250 255
 30 Gly Ile Gln Leu Gly Pro Phe Asp Leu Ser Gln Pro Tyr Ile Ala Pro
 260 265 270
 Ile Val Lys Ser Arg Glu Leu Phe Ser Ser Asn Asp Arg Asn Cys Ile
 275 280 285
 35 His Ser Glu Phe Asp Leu Ser Gly Ser Asn Ile Lys Tyr Ser Thr Gly
 290 295 300
 Asp His Leu Ala Val Trp Pro Ser Asn Pro Leu Glu Lys Val Glu Gln
 305 310 315 320
 Phe Leu Ser Ile Phe Asn Leu Asp Pro Glu Thr Ile Phe Asp Leu Lys
 325 330 335
 40 Pro Leu Asp Pro Thr Val Lys Val Pro Phe Pro Thr Pro Thr Thr Ile
 340 345 350
 Gly Ala Ala Ile Lys His Tyr Leu Glu Ile Thr Gly Pro Val Ser Arg
 355 360 365
 45 Gln Leu Phe Ser Ser Leu Ile Gln Phe Ala Pro Asn Ala Asp Val Lys
 370 375 380
 Glu Lys Leu Thr Leu Leu Ser Lys Asp Lys Asp Gln Phe Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Ser Lys Tyr Phe Asn Ile Ala Asp Ala Leu Lys Tyr Leu Ser
 405 410 415
 50 Asp Gly Ala Lys Trp Asp Asn Val Pro Met Gln Phe Leu Val Glu Ser
 420 425 430
 Val Pro Gln Met Thr Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Ser Leu
 435 440 445
 55 Ser Glu Lys Gln Thr Val His Val Thr Ser Ile Val Glu Asn Phe Pro
 450 455 460
 Asn Pro Glu Leu Pro Asp Ala Pro Pro Gly Val Gly Val Thr Thr Asn
 465 470 475 480

10

20

30

	Leu Leu Arg Asn Ile Gln Leu Ala Gln Asn Asn Val Asn Ile Ala Glu	
	485 490 495	
	Thr Asn Leu Pro Val His Tyr Asp Leu Asn Gly Pro Arg Lys Leu Phe	
	500 505 510	
5	Ala Asn Tyr Lys Leu Pro Val His Val Arg Arg Ser Asn Phe Arg Leu	
	515 520 525	
	Pro Ser Asn Pro Ser Thr Pro Val Ile Met Ile Gly Pro Gly Thr Gly	
	530 535 540	
10	Val Ala Pro Phe Arg Gly Phe Ile Arg Glu Arg Val Ala Phe Leu Glu	
	545 550 555 560	
	Ser Gln Lys Lys Gly Gly Asn Asn Val Ser Leu Gly Lys His Ile Leu	
	565 570 575	
	Phe Tyr Gly Ser Arg Asn Thr Asp Asp Phe Leu Tyr Gln Asp Glu Trp	
	580 585 590	
15	Pro Glu Tyr Ala Lys Lys Leu Asp Gly Ser Phe Glu Met Val Val Ala	10
	595 600 605	
	His Ser Arg Leu Pro Asn Thr Lys Lys Val Tyr Val Gln Asp Lys Leu	
	610 615 620	
20	Lys Asp Tyr Glu Asp Gln Val Phe Glu Met Ile Asn Asn Gly Ala Phe	
	625 630 635 640	
	Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Lys Gly Met Ala Lys Gly Val Ser Thr	
	645 650 655	
	Ala Leu Val Gly Ile Leu Ser Arg Gly Lys Ser Ile Thr Thr Asp Glu	
	660 665 670	
25	Ala Thr Glu Leu Ile Lys Met Leu Lys Thr Ser Gly Arg Tyr Gln Glu	
	675 680 685	
	Asp Val Trp	
	690	
30	<210> 38	20
	<211> 693	
	<212> FRT	
	<213> Aspergillus niger P450 reductase	
35	<400> 38	
	Met Ala Gln Leu Asp Thr Leu Asp Leu Val Val Leu Ala Val Leu Leu	
	1 5 10 15	
	Val Gly Ser Val Ala Tyr Phe Thr Lys Gly Thr Tyr Trp Ala Val Ala	
	20 25 30	
40	Lys Thr Arg Met Pro Leu Pro Ala Pro Arg Met Asn Gly Ala Ala Lys	
	35 40 45	
	Ala Gly Lys Thr Arg Asn Ile Ile Glu Lys Met Glu Glu Thr Gly Lys	
	50 55 60	
	Asn Cys Val Ile Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Asp Tyr	
45	65 70 75 80	30
	Ala Ser Arg Leu Ala Lys Glu Gly Ser Gln Arg Phe Gly Leu Lys Thr	
	85 90 95	
	Met Val Ala Asp Leu Glu Glu Tyr Asp Tyr Glu Asn Leu Asp Gln Phe	
	100 105 110	
50	Pro Glu Asp Lys Val Ala Phe Phe Val Leu Ala Thr Tyr Gly Glu Gly	
	115 120 125	
	Glu Pro Thr Asp Asn Ala Val Glu Phe Tyr Gln Phe Phe Thr Gly Asp	
	130 135 140	
	Asp Val Ala Phe Glu Ser Ala Ser Ala Asp Glu Lys Pro Leu Ser Lys	
55	145 150 155 160	
	Leu Lys Tyr Val Ala Phe Gly Leu Gly Asn Asn Thr Tyr Glu His Tyr	
	165 170 175	

Asn Ala Met Val Arg Gln Val Asp Ala Ala Phe Gln Lys Leu Gly Pro
 180 185 190
 Gln Arg Ile Gly Ser Ala Gly Glu Gly Asp Asp Gly Ala Gly Thr Met
 195 200 205
 5 Glu Glu Asp Phe Leu Ala Trp Lys Glu Pro Met Trp Ala Ala Leu Ser
 210 215 220
 Glu Ser Met Asp Leu Glu Arg Glu Ala Val Tyr Glu Pro Val Phe
 225 230 235 240
 10 Cys Val Thr Glu Asn Glu Ser Leu Ser Pro Glu Asp Glu Thr Val Tyr
 245 250 255
 Leu Gly Glu Pro Thr Gln Ser His Leu Gln Gly Thr Pro Lys Gly Pro
 260 265 270
 Tyr Ser Ala His Asn Pro Phe Ile Ala Pro Ile Ala Glu Ser Arg Glu
 275 280 285
 15 Leu Phe Thr Val Lys Asp Arg Asn Cys Leu His Met Glu Ile Ser Ile
 290 295 300
 Ala Gly Ser Asn Leu Ser Tyr Gln Thr Gly Asp His Ile Ala Val Trp
 305 310 315 320
 Pro Thr Asn Ala Gly Ala Glu Val Asp Arg Phe Leu Gln Val Phe Gly
 325 330 335
 20 Leu Glu Gly Lys Arg Asp Ser Val Ile Asn Ile Lys Gly Ile Asp Val
 340 345 350
 Thr Ala Lys Val Pro Ile Pro Thr Pro Thr Thr Tyr Asp Ala Ala Val
 355 360 365
 25 Arg Tyr Tyr Met Glu Val Cys Ala Pro Val Ser Arg Gln Phe Val Ala
 370 375 380
 Thr Leu Ala Ala Phe Ala Pro Met Arg Lys Ala Arg Gln Arg Leu Cys
 385 390 395 400
 Val Trp Val Ala Gln Gly Leu Phe Pro Arg Glu Gly His Gln Pro Met
 405 410 415
 30 Leu Gln His Ala Gln Ala Leu Gln Ser Ile Thr Ser Lys Pro Phe Ser
 420 425 430
 Ala Val Pro Phe Ser Leu Leu Ile Glu Gly Ile Thr Lys Leu Gln Pro
 435 440 445
 35 Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Ser Leu Val Gln Lys Asp Lys Ile
 450 455 460
 Ser Ile Thr Ala Val Val Glu Ser Val Arg Leu Pro Gly Ala Ser His
 465 470 475 480
 Met Val Lys Gly Val Thr Thr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Lys Gln Lys
 485 490 495
 40 Gln Asn Gly Arg Ser Leu Ser Arg Pro Ser Arg Leu Asp Leu Leu His
 500 505 510
 His Gly Pro Arg Asn Lys Tyr Asp Gly Ile His Val Pro Val His Val
 515 520 525
 45 Arg His Ser Asn Phe Lys Leu Pro Ser Asp Pro Ser Arg Pro Ile Ile
 530 535 540
 Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly Phe Ile Gln
 545 550 555 560
 Glu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Lys Gly Glu Lys Val Gly Pro Thr Val
 565 570 575
 50 Leu Phe Phe Gly Cys Arg Lys Ser Asp Glu Asp Phe Leu Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Glu Trp Lys Thr Tyr Gln Asp Gln Leu Gly Asp Asn Leu Lys Ile Ile
 595 600 605
 55 Thr Ala Phe Ser Arg Glu Gly Pro Gln Lys Val Tyr Val Gln His Arg
 610 615 620
 Leu Arg Glu His Ser Glu Leu Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Lys Ala

10

20

30

625 630 635 640
 Thr Phe Tyr Val Cys Gly Asp Ala Ala Asn Met Ala Arg Glu Val Asn
 645 650 655
 Leu Val Leu Gly Gln Ile Ile Ala Ala Gln Arg Gly Leu Pro Ala Glu
 5 660 665 670
 Lys Gly Glu Glu Met Val Lys His Met Arg Arg Arg Gly Arg Tyr Gln
 675 680 685
 Glu Asp Val Trp Ser
 690
 10
 <210> 39
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> mouse
 15
 <400> 39
 Met Gly Asp Ser His Glu Asp Thr Ser Ala Thr Val Pro Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Thr Thr Asp Ile Val Leu Phe Ser
 20 20 25 30
 Leu Ile Val Gly Val Leu Thr Tyr Trp Phe Ile Phe Lys Lys Lys Lys
 35 40 45
 Glu Glu Ile Pro Glu Phe Ser Lys Ile Gln Thr Thr Ala Pro Pro Val
 50 55 60
 25 Lys Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn
 85 90 95
 Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala
 30 100 105 110
 Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile
 115 120 125
 Asp Lys Ser Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp
 130 135 140
 35 Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp
 145 150 155 160
 Val Asp Leu Thr Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys
 165 170 175
 Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Gln Arg Leu
 40 180 185 190
 Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp
 195 200 205
 Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp
 210 215 220
 45 Pro Ala Val Cys Glu Phe Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Glu Asp Met Asp Thr Ala
 245 250 255
 Lys Val Tyr Thr Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln
 50 260 265 270
 Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Thr
 275 280 285
 Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu
 290 295 300
 55 Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val
 305 310 315 320
 Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Thr Leu Val Asn Gln Ile Gly Glu

10

20

30

		325	330	335	
		Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val	Ile Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp		
		340	345	350	
5		Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Thr Tyr Arg			
		355	360	365	
		Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn			
		370	375	380	
		Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu			
		385	390	395	400
10		His Leu His Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr			
		405	410	415	
		Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln			
		420	425	430	
15		Asp Tyr Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu			10
		435	440	445	
		Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val			
		450	455	460	
		His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Ala Val Glu Tyr Glu Ala			
		465	470	475	480
20		Lys Ser Gly Arg Val Asn Lys Gly Val Ala Thr Ser Trp Leu Arg Thr			
		485	490	495	
		Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Arg Arg Ala Leu Val Pro Met Phe			
		500	505	510	
25		Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Pro Thr Thr Pro Val			
		515	520	525	
		Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Met Gly Phe Ile			
		530	535	540	
		Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Glu Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr			
		545	550	555	560
30		Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg			20
		565	570	575	
		Glu Glu Leu Ala Arg Phe His Lys Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn			
		580	585	590	
35		Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ala His Lys Val Tyr Val Gln His Leu			
		595	600	605	
		Leu Lys Arg Asp Lys Glu His Leu Trp Lys Leu Ile His Glu Gly Gly			
		610	615	620	
		Ala His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Lys Asp Val			
		625	630	635	640
40		Gln Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Phe Gly Pro Met Glu His			
		645	650	655	
		Thr Gln Ala Val Asp Tyr Val Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr			
		660	665	670	
45		Ser Leu Asp Val Trp Ser			30
		675			
		<210> 40			
		<211> 17			
		<212> DNA			
50		<213> bacteriophage M13 reverse primer			
		<400> 40			
		caggaaacag ctatgac			17
55		<210> 41			
		<211> 20			
		<212> DNA			

	<213> bacteriophage T7 promoter primer		
5	<400> 41 taatacgact cactataggg	20	
	<210> 42		
	<211> 30		
	<212> DNA		
10	<213> Aspergillus ochraceus Primer 11alphaOH-for		
	<400> 42 gatcgaattc atgcccttct tcactgggct	30	
	<210> 43		10
15	<211> 37		
	<212> DNA		
	<213> Aspergillus ochraceus Primer 11alphaOH-rev		
20	<400> 43 gatctctaga ttacacagtt aaactcgcca tatcgat	37	
	<210> 44		
	<211> 20		
	<212> DNA		
25	<213> pFastBacI Primer Bacfwd		
	<400> 44 ctgttttcgt aacagttttg	20	
30	<210> 45		20
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> pFastBacI Primer PolyA		
35	<400> 45 cctctacaaa tgtggtatg	19	
	<210> 46		
	<211> 17		
40	<212> DNA		
	<213> Aspergillus ochraceus Primer 45624-for1		
	<400> 46 gagatcaaga ttgcctt	17	
45	<210> 47		30
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> Aspergillus ochraceus Primer 45624-for2		
50	<400> 47 cttcgacgct ctcaa	15	
	<210> 48		
55	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> Aspergillus ochraceus Primer 45624-rev1		

	<400> 48		
	gcaatcttga tctcgtt		17
5	<210> 49		
	<211> 2403		
	<212> DNA		
	<213> human oxidoreductase partial S90469		
10	<400> 49		
	ggagactccc acgtggacac cagctccacc gtgtccgagg cgggtggccga agaagtatct	60	
	cttttcagca tgacggacat gattctgttt tcgtccatcg tgggtctcct aacctactgg	120	
	ttcctcttca gaaagaaaa agaagaagtc cccgagttca ccaaaattca gacattgacc	180	
	tccctctgtca gagagagcag ctttgtggaa aagatgaaga aaacggggag gaacatcatc	240	
15	gtgttctacg gctcccagac ggggactgca gaggagtgtt ccaaccgcct gtccaaggac	300	
	gcccaccgct acgggatgag aggcattgtc ggggaccctg aggagtatgc cctggccgac	360	
	ctgagcagcc tggcagagat cgacaacgcc ctgggtgttt tctgcatggc cactacgggt	420	
	gagggagacc ccacogacaa tgcccaggac ttctacgact ggctgcaggc gacagacgtg	480	
	gatctctctg gggccaagtt cgcgggtgtt ggtcttggga acaagacctc cgagcacttc	540	
20	aatgcatatg gcaagtacgt ggacaagcgg ctgggacagc tcggcgccca gcgcactctt	600	
	gagctggggt tggcgcagca cgatgggaac ttggaggagg acttcacac ctggcgagag	660	
	cagttctggc cggccgtgtg tgaacacttt ggggtggaag ccactggcga ggagtccagc	720	
	attcgcagct acgagcttgt ggtccacacc gacatagatg cggccaaggt gtacatgggg	780	
	gagatggggc ggttgaagag ctacgagaac cagaagcccc cctttgatgc caagaatccg	840	
25	ttcctgggtt cagtcaccac caaccggaag ctgaaccagg gaaccgagcg ccacctcatg	900	
	cacctggaat tggscatctc ggactccaaa atcaggtatg aatctgggga ccacgtggct	960	
	gtgtaccacg ccaacgactc tgctctcgtc aaccagctgg gcaaaatcct ggggtgcgac	1020	
	ctggacgtcg tcatgtccct gaacaaacct gatgaggagt ccaacaagaa gcacccattc	1080	
	cggtgcccta cgtcctaccg caccggccct acctactacc tggacatcac caaccgcgg	1140	
30	cgtaccaacg tgctgtacga gctggcgagc tacgcctcgg agcctctcga gcaggagctg	1200	
	ctgcgcaaga tggcctcttc ctccggcgag ggcaaggagc tgtacctgag ctgggtgtgtg	1260	
	gagggccgga ggcacatcct ggccatcctg caggactgcc cgtccctgcg gccccccatc	1320	
	gaccacctgt gtgagctgct gccgcgctc caggcccgct actactccat cgcctcatcc	1380	
	tcacaaggtc accccaactc tgtgcacatc tgtgcggtgg ttgtggagta cgagaccaag	1440	
35	gccggccgca tcaacaaggc cgtggccacc aactggctgc gggccaagga gcctgtcggg	1500	
	gagaacggcg gccgtgcgct ggtgcccatg ttctgtcgca agtccagbt acgcctgccc	1560	
	ttcaaggcca ccacgcctgt catcatgggt ggccccgga cggggtgca cctttcata	1620	
	ggcttcattc aggaagcgggc ctggctgcga cagcagggca aggaagtggg gtagacgtg	1680	
	ctgtactacg cgtgcgcccg ctgggatgag gactacctgt accgggagga gctggcgag	1740	
40	ttccacaggg acgggtgcgt caccagctc aactggcctc tctcccgga gcagtccac	1800	
	aagggtctacg tccagcacct gctaaagcaa gaccgagagc acctgtgaa gttgatcgaa	1860	
	ggcgggtgcc acatctactg ctgtggggat gcacggaaca tggccaggga tgtgcagaa	1920	
	accttctacg acatcgtggc tgagctcggg gccatggagc acgcgagggc ggtggactac	1980	
	atcaagaac tcatgaccaa gggccgctac tccctggagc tgtggagcta ggggcttgc	2040	
45	tgcccccccc accccacaga ctccggcctg taatcagctc tcttggtcc cteccgtagt	2100	
	ctcctgggtg tgtttggctt ggccttggca tgggcgaggg cccagtgaca aagactctc	2160	
	tgggcctggg gtgcatctc ctccgcccc agggcagggt aggtccaccg gccctggca	2220	
	gcacagccca gggcctgcat gggggcaccg ggctccatgc ctctggagcc tctggccctc	2280	
	gggtggtgca cagaagggtc ctttctctct gctgagctgg cccagccctc ccacgtgatt	2340	
50	tccagttagt gtaataaatt ttaataaac tctggccctt ggaataaagt tctgttttct	2400	
	gta	2403	
	<210> 50		
	<211> 676		
55	<212> PRT		
	<213> human cytochrome P450 reductase, partial AAB21814		

10

20

30

<400> 50
 Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Ser Thr Val Ser Glu Ala Val Ala
 1 5 10 15
 Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile Leu Phe Ser Leu
 20 25 30
 Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Glu
 35 40 45
 Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Thr Leu Thr Ser Ser Val Arg
 50 55 60
 Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile Ile
 65 70 75 80
 Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn Arg
 85 90 95
 Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala Asp
 100 105 110
 Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile Asp
 115 120 125
 Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp Pro
 130 135 140
 Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp Val
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys Thr
 165 170 175
 Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Lys Arg Leu Glu
 180 185 190
 Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp Asp
 195 200 205
 Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp Pro
 210 215 220
 Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser Ser
 225 230 235 240
 Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Thr Asp Ile Asp Ala Ala Lys
 245 250 255
 Val Tyr Met Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln Lys
 260 265 270
 Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Thr Asn
 275 280 285
 Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu Leu
 290 295 300
 Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val Ala
 305 310 315 320
 Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly Lys Ile
 325 330 335
 Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp Glu
 340 345 350
 Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr Arg Thr
 355 360 365
 Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn Val
 370 375 380
 Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu Leu
 385 390 395 400
 Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr Leu
 405 410 415
 Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln Asp
 420 425 430
 Cys Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu Pro
 435 440 445

10

20

30

	Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val His	
	450 455 460	
	Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Val Glu Tyr Glu Thr Lys	
	465 470 475 480	
5	Ala Gly Arg Ile Asn Lys Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala Lys	
	485 490 495	
	Glu Fro Val Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe Val	
	500 505 510	
10	Arg Lys Ser Gln Leu Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val Ile	
	515 520 525	
	Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Trp His Pro Phe Ile Gly Phe Ile Gln	
	530 535 540	
	Glu Arg Ala Trp Leu Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr Leu	
	545 550 555 560	
15	Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg Glu	10
	565 570 575	
	Glu Leu Ala Gln Phe His Arg Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn Val	
	580 585 590	
	Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ser His Lys Val Tyr Val Gln His Leu Leu	
20	595 600 605	
	Lys Gln Asp Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile Glu Gly Gly Ala His	
	610 615 620	
	Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val Gln Asn	
	625 630 635 640	
25	Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Leu Gly Ala Met Glu His Ala Gln	
	645 650 655	
	Ala Val Asp Tyr Ile Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr Ser Leu	
	660 665 670	
30	Asp Val Trp Ser	20
	675	
	<210> 51	
	<211> 677	
	<212> PRT	
35	<213> human NADPH-ferrihemoprotein reductase A60557	
	<400> 51	
	Met Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Ser Thr Val Ser Glu Ala Val	
	1 5 10 15	
40	Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile Leu Phe Ser	
	20 25 30	
	Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Lys	
	35 40 45	
45	Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Thr Leu Thr Ser Ser Val	
	50 55 60	
	Arg Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile	30
	65 70 75 80	
	Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn	
	85 90 95	
50	Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala	
	100 105 110	
	Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile	
	115 120 125	
	Asp Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp	
55	130 135 140	
	Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp	
	145 150 155 160	

	Val Asp Leu Ser Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys	
	165 170 175	
	Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Lys Arg Leu	
	180 185 190	
5	Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp	
	195 200 205	
	Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp	
	210 215 220	
10	Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser	
	225 230 235 240	
	Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Thr Asp Ile Asp Ala Ala	
	245 250 255	
	Lys Val Tyr Met Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln	
	260 265 270	
15	Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Thr	
	275 280 285	
	Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu	
	290 295 300	
20	Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val	
	305 310 315 320	
	Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly Lys	
	325 330 335	
	Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp	
	340 345 350	
25	Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr Arg	
	355 360 365	
	Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn	
	370 375 380	
30	Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu	
	385 390 395 400	
	Leu Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr	
	405 410 415	
	Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln	
	420 425 430	
35	Asp Cys Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu	
	435 440 445	
	Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val	
	450 455 460	
40	His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Val Glu Tyr Glu Thr	
	465 470 475 480	
	Lys Ala Gly Arg Ile Asn Lys Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala	
	485 490 495	
	Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe	
	500 505 510	
45	Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val	
	515 520 525	
	Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile	
	530 535 540	
50	Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr	
	545 550 555 560	
	Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg	
	565 570 575	
	Glu Glu Leu Ala Gln Phe His Arg Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn	
	580 585 590	
55	Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ser His Lys Val Tyr Val Gln His Leu	
	595 600 605	
	Leu Lys Gln Asp Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile Glu Gly Gly Ala	

10

20

30

610 615 620
 His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val Gln
 625 630 635 640
 Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Leu Gly Ala Met Glu His Ala
 5 645 650 655
 Gln Ala Val Asp Tyr Ile Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr Ser
 660 665 670
 Leu Asp Val Trp Ser
 675
 10
 <210> 52
 <211> 677
 <212> PRT
 <213> human NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE F16435
 15
 <400> 52
 Met Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Ser Thr Val Ser Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile Leu Phe Ser
 20 20 25 30
 Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Lys
 35 40 45
 Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Thr Leu Thr Ser Ser Val
 50 55 60
 25 Arg Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn
 85 90 95
 Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala
 30 100 105 110
 Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile
 115 120 125
 Asp Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp
 130 135 140
 35 Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp
 145 150 155 160
 Val Asp Leu Ser Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys
 165 170 175
 Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Lys Arg Leu
 40 180 185 190
 Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp
 195 200 205
 Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp
 210 215 220
 45 Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Thr Asp Ile Asp Ala Ala
 245 250 255
 Lys Val Tyr Met Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln
 260 265 270
 50 Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Thr
 275 280 285
 Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu
 290 295 300
 55 Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val
 305 310 315 320
 Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly Lys

10

20

30

325 330 335
 Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp
 340 345 350
 Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr Arg
 355 360 365
 Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn
 370 375 380
 Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu
 385 390 395 400
 Leu Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr
 405 410 415
 Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln
 420 425 430
 Asp Cys Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu
 435 440 445
 Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val
 450 455 460
 His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Val Glu Tyr Glu Thr
 465 470 475 480
 Lys Ala Gly Arg Ile Asn Lys Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala
 485 490 495
 Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe
 500 505 510
 Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val
 515 520 525
 Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile
 530 535 540
 Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr
 545 550 555 560
 Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg
 565 570 575
 Glu Glu Leu Ala Gln Phe His Arg Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn
 580 585 590
 Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ser His Lys Val Tyr Val Gln His Leu
 595 600 605
 Leu Lys Gln Asp Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile Glu Gly Gly Ala
 610 615 620
 His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val Gln
 625 630 635 640
 Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Leu Gly Ala Met Glu His Ala
 645 650 655
 Gln Ala Val Asp Tyr Ile Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr Ser
 660 665 670
 Leu Asp Val Trp Ser
 675

 <210> 53
 <211> 679
 <212> PRT
 <213> Rabbit NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE P00389

 <400> 53
 Met Ala Asp Ser His Gly Asp Thr Gly Ala Thr Met Pro Glu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Glu Ala Ser Val Phe Ser Met Thr Asp Val Val Leu Phe Ser
 20 25 30
 Leu Ile Val Gly Leu Ile Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Lys

	35	40	45	
	Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Ala Pro Thr Ser Ser Ser			
	50	55	60	
5	Val Lys Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn			
	65	70	75	80
	Ile Val Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala			
	85	90	95	
	Asn Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ala			
	100	105	110	
10	Ala Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu			
	115	120	125	
	Ile Asn Asn Ala Leu Ala Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly			
	130	135	140	
15	Asp Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr			10
	145	150	155	160
	Asp Val Asp Leu Ser Gly Val Lys Tyr Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn			
	165	170	175	
	Lys Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Gln Arg			
	180	185	190	
20	Leu Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Met Gly Asp			
	195	200	205	
	Asp Asp Ala Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe			
	210	215	220	
25	Trp Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu			
	225	230	235	240
	Ser Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Leu His Thr Asp Ile Asp Val			
	245	250	255	
	Ala Lys Val Tyr Gln Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn			
	260	265	270	
30	Gln Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Thr Val Thr			20
	275	280	285	
	Thr Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu			
	290	295	300	
35	Glu Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His			
	305	310	315	320
	Val Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly			
	325	330	335	
	Glu Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu			
	340	345	350	
40	Asp Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr			
	355	360	365	
	Arg Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr			
	370	375	380	
45	Asn Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ala Asp Pro Ala Glu Gln			
	385	390	395	400
	Glu Gln Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu			30
	405	410	415	
	Tyr Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu			
	420	425	430	
50	Gln Asp Tyr Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu			
	435	440	445	
	Leu Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys			
	450	455	460	
55	Val His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Ala Val Glu Tyr Glu			
	465	470	475	480
	Thr Lys Ala Gly Arg Leu Asn Lys Gly Val Ala Thr Ser Trp Leu Arg			
	485	490	495	

Ala Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met
 500 505 510
 Phe Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro
 515 520 525
 5 Val Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe
 530 535 540
 Ile Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu
 545 550 555 560
 Thr Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ala Ala Glu Asp Tyr Leu Tyr
 565 570 575
 10 Arg Glu Glu Leu Ala Gly Phe Gln Lys Asp Gly Thr Leu Ser Gln Leu
 580 585 590
 Asn Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ala Gln Lys Val Tyr Val Gln His
 595 600 605
 15 Leu Leu Arg Arg Asp Lys Glu His Leu Trp Arg Leu Ile His Glu Gly
 610 615 620
 Gly Ala His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp
 625 630 635 640
 Val Gln Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Leu Gly Ala Met Glu
 645 650 655
 20 His Ala Gln Ala Val Asp Tyr Val Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg
 660 665 670
 Tyr Ser Leu Asp Val Trp Ser
 675
 25
 <210> 54
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Rat NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE P00388
 30
 <400> 54
 Met Gly Asp Ser His Glu Asp Thr Ser Ala Thr Met Pro Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Thr Thr Asp Met Val Leu Phe Ser
 20 25 30
 35 Leu Ile Val Gly Val Leu Thr Tyr Trp Phe Ile Phe Arg Lys Lys Lys
 35 40 45
 Glu Glu Ile Pro Glu Phe Ser Lys Ile Gln Thr Thr Ala Pro Pro Val
 50 55 60
 40 Lys Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile
 65 70 75 80
 Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn
 85 90 95
 Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala
 100 105 110
 45 Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile
 115 120 125
 Asp Lys Ser Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp
 130 135 140
 50 Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Thr Asp
 145 150 155 160
 Val Asp Leu Thr Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys
 165 170 175
 Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Gln Arg Leu
 180 185 190
 55 Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp
 195 200 205

10

20

30

	Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp	
	210 215 220	
	Pro Ala Val Cys Glu Phe Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser	
	225 230 235 240	
5	Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Glu Asp Met Asp Val Ala	
	245 250 255	
	Lys Val Tyr Thr Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln	
	260 265 270	
10	Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Ala Val Thr Ala	
	275 280 285	
	Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu	
	290 295 300	
	Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val	
	305 310 315 320	
15	Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Ile Gly Glu	10
	325 330 335	
	Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp	
	340 345 350	
20	Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Thr Tyr Arg	
	355 360 365	
	Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn	
	370 375 380	
	Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu	
	385 390 395 400	
25	His Leu His Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr	
	405 410 415	
	Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln	
	420 425 430	
30	Asp Tyr Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu	20
	435 440 445	
	Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val	
	450 455 460	
	His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Ala Val Glu Tyr Glu Ala	
	465 470 475 480	
35	Lys Ser Gly Arg Val Asn Lys Gly Val Ala Thr Ser Trp Leu Arg Ala	
	485 490 495	
	Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe	
	500 505 510	
40	Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ser Thr Thr Pro Val	
	515 520 525	
	Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Met Gly Phe Ile	
	530 535 540	
	Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Glu Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr	
	545 550 555 560	
45	Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg	30
	565 570 575	
	Glu Glu Leu Ala Arg Phe His Lys Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn	
	580 585 590	
	Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ala His Lys Val Tyr Val Gln His Leu	
50	595 600 605	
	Leu Lys Arg Asp Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile His Glu Gly Gly	
	610 615 620	
	Ala His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Lys Asp Val	
	625 630 635 640	
55	Gln Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Phe Gly Pro Met Glu His	
	645 650 655	
	Thr Gln Ala Val Asp Tyr Val Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr	

30

370 375 380
 Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu
 385 390 395 400
 His Leu His Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr
 5 405 410 415
 Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln
 420 425 430
 Asp Tyr Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Leu Leu
 435 440 445
 10 450 455 460
 Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val
 465 470 475 480
 His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Ala Val Glu Tyr Glu Ala
 15 485 490 495
 Lys Ser Gly Arg Val Asn Lys Gly Val Ala Thr Ser Trp Leu Arg Thr
 500 505 510
 Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Arg Arg Ala Leu Val Pro Met Phe
 Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Pro Thr Thr Pro Val
 515 520 525
 20 530 535 540
 Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Met Gly Phe Ile
 Gln Glu Arg Ala Trp Leu Arg Glu Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr
 545 550 555 560
 Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg
 25 565 570 575
 Glu Glu Leu Ala Arg Phe His Lys Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn
 580 585 590
 Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Ala His Lys Val Tyr Val Gln His Leu
 595 600 605
 30 610 615 620
 Leu Lys Arg Asp Lys Glu His Leu Trp Lys Leu Ile His Glu Gly Gly
 Ala His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Lys Asp Val
 625 630 635 640
 Gln Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Phe Gly Pro Met Glu His
 35 645 650 655
 Thr Gln Ala Val Asp Tyr Val Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr
 660 665 670
 Ser Leu Asp Val Trp Ser
 675
 40
 <210> 56
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> Fig NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE P04175
 45
 <400> 56
 Met Gly Asp Ser Asn Val Asp Thr Gly Thr Thr Thr Ser Glu Met Val
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Ala Thr Asp Met Val Leu Phe Ser
 20 25 30
 50 35 40 45
 Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Ile Phe Arg Lys Lys Lys
 Asp Glu Val Pro Glu Phe Ser Lys Ile Glu Thr Thr Thr Ser Ser Val
 50 55 60
 55 65 70 75 80
 Lys Asp Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile
 Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn

85 90 95
 Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ala Ala
 100 105 110
 Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Ser Ser Leu Pro Glu Ile
 115 120 125
 Glu Asn Ala Leu Ala Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp
 130 135 140
 Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln Glu Ala Asp
 145 150 155 160
 Val Asp Leu Thr Gly Val Lys Tyr Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys
 165 170 175
 Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Lys Arg Leu
 180 185 190
 Glu Gln Leu Gly Ala Gln Arg Ile Phe Asp Leu Gly Leu Gly Asp Asp
 195 200 205
 Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Gln Phe Trp
 210 215 220
 Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Gln Tyr Glu Leu Val Val His Thr Asp Met Asp Thr Ala
 245 250 255
 Val Val Tyr Thr Gly Glu Met Gly Arg Leu Lys Ser Tyr Glu Asn Gln
 260 265 270
 Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Val Val Thr Thr
 275 280 285
 Asn Arg Lys Leu Asn Gln Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu
 290 295 300
 Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val
 305 310 315 320
 Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Gln Leu Gly Glu
 325 330 335
 Ile Leu Gly Thr Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp
 340 345 350
 Glu Glu Ser Asn Lys Arg His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Thr Tyr Arg
 355 360 365
 Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Arg Thr Asn
 370 375 380
 Val Leu Tyr Glu Leu Ala Gln Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Gln Glu
 385 390 395 400
 Gln Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr
 405 410 415
 Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Ala Ile Leu Gln
 420 425 430
 Asp Tyr Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp His Leu Cys Glu Arg Leu
 435 440 445
 Pro Arg Leu Gln Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val
 450 455 460
 His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Glu Tyr Glu Thr
 465 470 475 480
 Lys Ser Gly Arg Val Asn Lys Gly Val Ala Thr Ser Trp Leu Arg Ala
 485 490 495
 Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Arg Arg Ala Leu Val Pro Met Phe
 500 505 510
 Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val
 515 520 525
 Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile
 530 535 540

10

20

30

	Gln Glu Arg Ala Trp Leu Gln Glu Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr	
	545 550 555 560	
	Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg	
	565 570 575	
5	Glu Glu Leu Ala Gln Phe His Ala Lys Gly Ala Leu Thr Arg Leu Ser	
	580 585 590	
	Val Ala Phe Ser Arg Glu Gln Pro Gln Lys Val Tyr Val Gln His Leu	
	595 600 605	
10	Leu Lys Arg Asp Lys Glu His Leu Trp Lys Leu Ile His Asp Gly Gly	
	610 615 620	
	Ala His Ile Tyr Ile Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val	
	625 630 635 640	
	Gln Asn Thr Phe Cys Asp Ile Val Ala Glu Gln Gly Pro Met Glu His	
	645 650 655	
15	Ala Gln Ala Val Asp Tyr Val Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg Tyr	10
	660 665 670	
	Ser Leu Asp Val Trp Ser	
	675	
20	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Bacteriophage SP6 primer	
25	<400> 57	
	gatttaggtg acactatag	19
	<210> 58	
	<211> 44	
30	<212> DNA	20
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic adapter with NotI site and poly dT tail	
35	<221> misc_structure	
	<222> (1)...(1)	
	<223> The first base is phosphorylated	
40	<400> 58	
	gactagtctt agatcgcgag cggccgccct tttttttttt tttt	44
	<210> 59	
	<211> 16	
45	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	30
	<220>	
	<223> Top Strand of a SalI adapter	
50	<400> 59	
	tcgacccacg cgtcog	16
	<210> 60	
55	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<223> Bottom Strand of a SalI adapter, the first base is phosphorylated		
5	<221> misc_feature		
	<222> (1)...(1)		
	<223> The first base is phosphorylated		
10	<400> 60		
	gcctgcgcac cc	12	
	<210> 61		
	<211> 21		10
15	<212> DNA		
	<213> human oxidoreductase primer 1C		
	<400> 61		
20	gtggaccaca agctcgtact g	21	
	<210> 62		
	<211> 22		
	<212> DNA		
25	<213> human oxidoreductase primer 2C		
	<400> 62		
	catcgaccac ctgtgtgagc tg	22	
	<210> 63		
30	<211> 22		20
	<212> DNA		
	<213> human oxidoreductase primer 2D		
	<400> 63		
35	gtacaggtag tctctatccg ag	22	
	<210> 64		
	<211> 3710		
	<212> DNA		
40	<213> Aspergillus niger NADP CYP450 oxidoreductaseZ26838		
	<400> 64		
	cctgtatcct gataactcct cagcaaatcg gagtaaacag aaggacaagt cattggagta	60	
	ctaagtagct ccgtgtcaga gaccocggaca ggatcagctt ctccgaacc gagactccgg	120	
45	gcgaaaaggc caccatcgct caggctacca cctgtgttcc ttccgtcgat cgtcctccct	180	
	cgtttccggc tcacggcccc ccaaattatt gcggctcgtc tagcagtggt ttccggcctct	240	
	ctgttcttcc tggatcacac caccgcttac ttctttatcc ttttctttt cctttcttcc	300	
	tttcttctg ttctctttt ttcttttcca ccccttctt tcttttaacc ccatagcgtc	360	
	attctttctt ccgttttctt ttgtgtttt ggacgcgcgc accttatctc ggttctctgc	420	
50	tcggtctccg gtgatcgac ctggataggc taagcgtagg gaggtgtgac attcttcttt	480	
	cacctctctt ccttttcccg cctcactccg ttcaatcccc cgttcacccc ttccagactc	540	
	gccatcgtat caagtcgggg cctttgcttg cgcgctgaa cagcctcacc atggcgcaac	600	
	tcgataccct cgatctgggt gtcttggcgg tgcttttggg gggtagcgtg gcctacttca	660	
	ccaagggcac ctactgggca gttgcaaaga ccgctatgcc tctaccggcc ccgcggatga	720	
55	acggcgccgc taaggctggc aagactcggc acatcattga gaagatggaa gaaacgggca	780	
	agaattgtgt tattttctac ggatcgcaa ctggaaccgc tgaggactac gcctccagat	840	
	tggccaagga aggatctcag cgttcggcc tcaagaccat ggtggctgac ctcgaggaat	900	

	acgactatga gaacctggac caattcccgg aggacaagg tgcgtttttc gtgctcgcca	960	
	cctacggaga gggtagagcct acggataatg ctgttgagtt ctaccagttc ttcacgggtg	1020	
	cgacgttgc ttttgagagc gcgtccggcg acgagaagcc tctgtccaag ctgaagtatg	1080	
	ttgcttttcg tctgggtaac aacacttatg agcactacaa cgccatgggt cgtcaagtgc	1140	
5	atgctgcttt coagaagctc gggccgcagc gtattgggtc tgcgtggcag ggtgatgacg	1200	
	gtgccggtac aatggaagaa gacttcttgg cctggaagga gccatgtgg gacgactgt	1260	
	cggagtcgat ggaatctgaa gagctggaag cggctctacga acctgttttc tgcgtcacog	1320	
	aaaacgagtc cctgagccct gaggacgaga cggctctatc tggagagccc acccagagcc	1380	
	accttcaggg tactcccaaa ggcctgtact ctgcgcacaa cccctttatc gccctattg	1440	
10	ccgaatctcg tgagcttttc accgtcaagg atcgcaactg tctgcacatg gaaattagca	1500	
	tcgctggaag taacttctcc taccagactg gtgaccacat cgtgttttgg cccacaaacy	1560	
	ctgggtgccga agtggatcgg ttccctcagg tcttcggtct cgagggcagc cgtgattcgg	1620	
	tcataacat caaggggtatc gatgttacgg ccaaggtccc aatcccgacc ccgaccacgt	1680	
	acgatgcgcg tgttcggtag tatatggaag tctgcgcccc tgtgtccctc cagttgtgag	1740	
15	ccactctggc cgcgttctgc ccgatgagga aagcaaggca gagattgtgc gtctgggtag	1800	
	cacaaggcgt atttccacga gaaggtcacc aaccaatgct tcaacatgcc caggctcttc	1860	
	agagcatcac gtccaagcct ttctctgctg ttccgttctc tctgcttatt gaaggcatta	1920	
	cgaagctgca gcctcgctac tactcgatct ctctgtcctc cctgtccag aaggacaaga	1980	
	tcagatcac gcccggttgc gaattctgtc gtctgcccg tgcctctcac atggtgaagg	2040	
20	gtgtgactac gaattatctc ctgcgctca agcagaagca gaacgggcca tccctctccc	2100	
	gacctcacg gcttctacta ctccatcac gtcccggaac caagtacgac ggtatccagc	2160	
	ttcccggtca tgttcggcac tcgaacttca agctgccctc tgatccctct gggccatta	2220	
	tcattggttg tctcgttact ggtgttctc ctctccgtgg ttctatccag gaacgtgctg	2280	
	ctttggcgcc caaggcgagc aagggtggac ccaactgtct ctctctcggt tgcgcaaga	2340	
25	gtgacgagga ttctctgtac aaggatgaat ggaaggtaag atacttttt ttcttttccg	2400	
	cagctacett catacatctc ggaatgtaac atactcgcat tcgcagacct atcaggacca	2460	
	gcttgagac aacttgaaga tcatcactgc gttctcgctg gaggtcctc agaaggctca	2520	
	cgttcagcac agactccgcg agcactccga actgttcagc gacctctga agcagaagc	2580	
	tacctttcat gctgtgtgtg acgctgcaaa catggctcgc gaggttaacc ttgtgcttgg	2640	
30	ccagatcatt gctgcgcagc gtggtctgcc cgcgagaaag ggcgaagaaa tggtaagca	2700	
	catgctgtaga cgtggagcct accaggaaga tgtgtgtgca taatctttca atgcatcgac	2760	
	ttttctttct tgtctatcac gacggccttc tcgattccat attttatcta acgcttagat	2820	
	gatctttgca tatatactcc gctgattttg cctattcatc tgttttgctt ggcgtggtt	2880	
	atgtatgctt agtttatctt ttttgtgcac cgaccggcca gccacacatt gaagtggctt	2940	
35	gagcatgagt gcggtagcca gtgtcgaaag aacaggatag acgatcatga ttattgctgg	3000	
	aacatgttat gccattctgg gcattattgat atctggttgc atgagccagc aggtatcgaa	3060	
	aagatgaatc catatttaat ttgcacaata cttttcgctt tcttcatcta gtaattaaat	3120	
	taattgagca ctgaccgaac gagctgacac ctgctgctcg gaatagccga caacgcattg	3180	
	acgtgcaaga gatgcataat cattacaatc aacaagtaga ctggtaacta aatcactgaa	3240	
40	tactacagtt actgcctact ttacgccaac aagtaatact gaagatttgc gggaaatcaaa	3300	
	tagaagaaac atgcataagc ccaacctcgg caataccggg agttaagcac agtaaccaaa	3360	
	accaaaccaa actagaaccg gcgcgcgacc agtgacccat cgtcattccc ggtatcagca	3420	
	gttcagtcag actggctggc tagcccgacc ccaactgccc caatcatcca tccatcctca	3480	
	accggccctt cccatgcca cctctctact ccgcagagcg agggacaaaa aaatgagatg	3540	
45	cagcaattaa ccaatgataa ctacgaaaaa gaaagttaga agccggaaga acatacatat	3600	
	cgtctttacc gctgttcgac tgcgacgagc ggtcttgaga gcagttccgc cactgtggcg	3660	
	aaaagctgga ctgcacacta cttacgctac cctacgctac ctggtaacc	3710	
50	<210> 65		
	<211> 693		
	<212> PRT		
	<213> Aspergillus niger NADFCYP450oxidoreductaseCAA81550		
55	<400> 65		
	Met Ala Gln Leu Asp Thr Leu Asp Leu Val Val Leu Ala Val Leu Leu		
	1	5	10
	Val Gly Ser Val Ala Tyr Phe Thr Lys Gly Thr Tyr Trp Ala Val Ala		

10

20

30

	20	25	30	
	Lys Thr Arg Met Pro Leu Pro Ala Pro Arg Met Asn Gly Ala Ala Lys			
	35	40	45	
5	Ala Gly Lys Thr Arg Asn Ile Ile Glu Lys Met Glu Glu Thr Gly Lys			
	50	55	60	
	Asn Cys Val Ile Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Asp Tyr			
	65	70	75	80
	Ala Ser Arg Leu Ala Lys Glu Gly Ser Gln Arg Phe Gly Leu Lys Thr			
	85	90	95	
10	Met Val Ala Asp Leu Glu Glu Tyr Asp Tyr Glu Asn Leu Asp Gln Phe			
	100	105	110	
	Pro Glu Asp Lys Val Ala Phe Phe Val Leu Ala Thr Tyr Gly Glu Gly			
	115	120	125	
15	Glu Pro Thr Asp Asn Ala Val Glu Phe Tyr Gln Phe Phe Thr Gly Asp			10
	130	135	140	
	Asp Val Ala Phe Glu Ser Ala Ser Ala Asp Glu Lys Pro Leu Ser Lys			
	145	150	155	160
	Leu Lys Tyr Val Ala Phe Gly Leu Gly Asn Asn Thr Tyr Glu His Tyr			
	165	170	175	
20	Asn Ala Met Val Arg Gln Val Asp Ala Ala Phe Gln Lys Leu Gly Pro			
	180	185	190	
	Gln Arg Ile Gly Ser Ala Gly Glu Gly Asp Asp Gly Ala Gly Thr Met			
	195	200	205	
25	Glu Glu Asp Phe Leu Ala Trp Lys Glu Pro Met Trp Ala Ala Leu Ser			
	210	215	220	
	Glu Ser Met Asp Leu Glu Glu Arg Glu Ala Val Tyr Glu Pro Val Phe			
	225	230	235	240
	Cys Val Thr Glu Asn Glu Ser Leu Ser Pro Glu Asp Glu Thr Val Tyr			
	245	250	255	
30	Leu Gly Glu Pro Thr Gln Ser His Leu Gln Gly Thr Pro Lys Gly Pro			20
	260	265	270	
	Tyr Ser Ala His Asn Pro Phe Ile Ala Pro Ile Ala Glu Ser Arg Glu			
	275	280	285	
	Leu Phe Thr Val Lys Asp Arg Asn Cys Leu His Met Glu Ile Ser Ile			
35	290	295	300	
	Ala Gly Ser Asn Leu Ser Tyr Gln Thr Gly Asp His Ile Ala Val Trp			
	305	310	315	320
	Pro Thr Asn Ala Gly Ala Glu Val Asp Arg Phe Leu Gln Val Phe Gly			
	325	330	335	
40	Leu Glu Gly Lys Arg Asp Ser Val Ile Asn Ile Lys Gly Ile Asp Val			
	340	345	350	
	Thr Ala Lys Val Pro Ile Pro Thr Thr Tyr Asp Ala Ala Val			
	355	360	365	
	Arg Tyr Tyr Met Glu Val Cys Ala Pro Val Ser Arg Gln Phe Val Ala			
45	370	375	380	
	Thr Leu Ala Ala Phe Ala Pro Met Arg Lys Ala Arg Gln Arg Leu Cys			30
	385	390	395	400
	Val Trp Val Ala Gln Gly Leu Phe Pro Arg Glu Gly His Gln Pro Met			
	405	410	415	
50	Leu Gln His Ala Gln Ala Leu Gln Ser Ile Thr Ser Lys Pro Phe Ser			
	420	425	430	
	Ala Val Pro Phe Ser Leu Leu Ile Glu Gly Ile Thr Lys Leu Gln Pro			
	435	440	445	
	Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Ser Leu Val Gln Lys Asp Lys Ile			
55	450	455	460	
	Ser Ile Thr Ala Val Val Glu Ser Val Arg Leu Pro Gly Ala Ser His			
	465	470	475	480

Met Val Lys Gly Val Thr Thr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Lys Gln Lys
485 490 495

Gln Asn Gly Arg Ser Leu Ser Arg Pro Ser Arg Leu Asp Leu Leu His
500 505 510

5 His Gly Pro Arg Asn Lys Tyr Asp Gly Ile His Val Pro Val His Val
515 520 525

Arg His Ser Asn Phe Lys Leu Pro Ser Asp Pro Ser Arg Pro Ile Ile
530 535 540

10 Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly Phe Ile Gln
545 550 555 560

Glu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Lys Gly Glu Lys Val Gly Pro Thr Val
565 570 575

Leu Phe Phe Gly Cys Arg Lys Ser Asp Glu Asp Phe Leu Tyr Lys Asp
580 585 590

15 Glu Trp Lys Thr Tyr Gln Asp Gln Leu Gly Asp Asn Leu Lys Ile Ile
595 600 605

Thr Ala Phe Ser Arg Glu Gly Pro Gln Lys Val Tyr Val Gln His Arg
610 615 620

20 Leu Arg Glu His Ser Glu Leu Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Lys Ala
625 630 635 640

Thr Phe Tyr Val Cys Gly Asp Ala Ala Asn Met Ala Arg Glu Val Asn
645 650 655

Leu Val Leu Gly Gln Ile Ile Ala Ala Gln Arg Gly Leu Pro Ala Glu
660 665 670

25 Lys Gly Glu Glu Met Val Lys His Met Arg Arg Arg Gly Arg Tyr Gln
675 680 685

Glu Asp Val Trp Ser
690

10

20

【 図 1 】

図 1 アスベルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素のヌクレオチド
およびタンパク質配列

5	tgaaagtgtt tacacttatt atgcgcgagc cpaagatctc tgcgtcgagc ggttgggaaa 60	ggc tgg ttc gag cga gag ctg ggt ccc aac cac gac gcg gtc ctg aag 1036
	caacacataa agacatacaa coacttgcgt ttggtgaatt taccgcgcgc ttacaaacac 120	gta trp phe glu arg glu leu gly pro asn his asp ala val leu lys 285
	agcccaaacg tgaagatctca tttac ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc 172	290 295
10	att tac cat agt ctg ata ctc gac aac cca gtc caa acc ctg agc acc 220	5 cag gtc acg ctg tcc ata gtt gct atc cac acc acg agt gac cta ctg 1084
	ile tyr his ser leu ile leu asp asn pro val gln thr leu ser thr 35	305 310
15	att gtc gta ttg gcg gca gcg tac tgg ctg gca acg ctg cag ccg agc 268	10 ttg cag gcc atg agc gat ctg gcg cag aac ccg aaa gtg cta caa gca 1132
	ile val val leu ala ala ala tyr trp leu ala thr leu gln pro ser 35	315 320
20	gac ctt cgt gag ctg aat ccc ggc aaa cca ttc gag ttc acc aat cgt 316	15 gtc ggc gag gac gtc gtc cga atg ctg agc acc gag gcg ctg agc aag 1180
	asp leu pro glu leu asn pro ala lys pro phe glu phe thr asn arg 45	325 330
25	cgt cgt gtt cat gag ttt gtt gaa aat agt aag agc ttg ctt cgt ccg 364	20 gtc tgg ctt cag agt ctc aag ctg atg gac gcg gcy ttg aag gaa agc 1228
	arg arg val his glu phe val glu asn ser lys ser leu leu ala arg 60	335 340
30	ggg ggg gaa ttg cac ggg cac gag ccg tac aga ctg atg tct gaa tgg 412	25 cag cgt ctg agc cgt agc ctt ctc ggc tcc ttt cgt ccg cag gca acg 1276
	gly arg glu leu his gly his glu pro tyr arg leu met ser glu trp 75	345 350
35	gga tcc ttg att gtc ctg ccc cca gag tgc gac gag ctg tgc aac 460	30 gtc atg atc gag agc acc cat atg tgg aat ccc gag tat tac act gac 1372
	gly ser leu ile val leu pro pro glu cys ala asp glu leu arg asn 85	355 400
40	gac cca aga atg gac ttt gag acg ccc acc acc gac gac tcc cca gga 508	35 cct ctc cag tac gac gga tac gac tgc tac ttc aac agc cag gac aca ccc 1420
	asp pro arg met asp phe glu thr pro thr thr asp asp ser his gly 110	410 415
45	tat atc cct ggc ttc gac gct ctc aac gca gac ccg aac ctg act aca 556	40 ggc gag gac aag aac gcg ttg ctg gtc agc aca agc gcc aac cac atg 1468
	tyr ile pro gly phe asp ala leu asn ala asp pro asn leu thr lys 125	420 425
50	gtg gtc acc aag tac ctg aca aca gca ttg aac aag ctt act cgt ccg 604	45 gga ttc ggt cac ggc gtt cac gcc tgt cct ggc aga ttc ttc gcc tcc 1516
	val val thr tyr leu thr thr lys ala leu asn lys leu thr ala pro 140	430 435
55	atc tgg cat gaa gcg tcc atc gac atg aca gcg gty ctg ggt gac gat 632	50 aac ggc atc aag att gcc ttg tgt cat atc atc tta aat tat gag tgg 1564
	ile ser his glu ala ser ile ala met lys ala val leu gly asp asp 155	440 445
60	cca gat tgg cgt gag atc taa cca gcc aga gac ttg ctg cag ctg gtc 700	55 cgt ctt cca gac ggc ttc aag ccc cag cct ctc acc atc ggc atg atc 1612
	pro asp trp arg glu ile tyr pro ala arg asp leu leu gln leu val 170	450 455
65	gac ccg atg tgg aca aga gty ttc ctt ggc gag aat tgc aat aac 748	60 gag atc gat atg gcg agt tta act gtc tag gtgcacacg aagtcctgat 1710
	ala arg met ser thr arg val phe leu gly glu glu met cys asn asn 180	510
70	cag gat tgg atc cca acc taa cca gaa gac gac ctt gcc ttc ggt 796	65 gaagtgatat tggctcgttg gtgcacacag tgcgaagaat gtgtacacat ttatagat 1770
	gln asp trp ile gln thr ser ser gln tyr ala ala leu ala phe gly 205	1776
75	gtc ggt gac aac ctt aga ata tac ccg aga atg atc aga ccg ata gta 844	
	val gly asp tyr leu arg ile tyr pro arg met ile arg pro ile ala 220	
80	cat tgg ttc atg cca tcc tgt tgg gag ctg cgc cga tgc ctg cga cgc 892	
	his trp phe met pro ser cys trp glu leu arg arg ser leu arg arg 240	
85	tgc cga cag att ctg acg ccg tac att cca aaa cgc aag tcc ctg aag 940	
	cys arg gln ile leu thr pro tyr ile his lys arg lys ser leu lys 250	
90	ggg acc aac gac gag ccg gcc acc ctt atg ttt gat gat tcc atc 988	
	gly thr thr asp glu gln gly lys pro leu met phe asp asp ser ile 270	

【図 2】

図 2—ヒト酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列

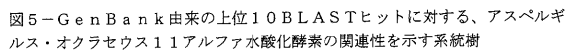
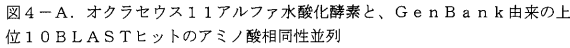
5	atg gga gac tcc cac gtg gac acc agc tcc acc gtg tcc gag ggg gtg Met Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Thr Val Ser Glu Ala Val 1 10 15	48
10	gac gaa gaa gta tcc ttc ttc agc atg agc agc agc atg att ctg ttt tgc Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile Leu Phe Ser 20 25 30	96
15	ctc atc gtg ggt ccc cta acc tac tgg ttc ctc ttc aga agc aaa aaa Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg Lys Lys Lys 35 40 45	144
20	gaa gaa gtc ccc ggg ttc acc aaa att cac agc atg acc tcc ttc gtc Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Glu Thr Leu Thr Ser Ser Val 50 55 60	192
25	aga agc agc agc ttt gtg gaa agc atg agc agc agc agc agc atc Arg Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly Arg Asn Ile 65 70 75	240
30	atc gtg ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc ttc Ile Val Phe Tyr Tyr Ser Glu Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Asn 85 90 95	288
35	cgc atg tcc aag gac gac acc cgc tac ggg atg cga agc atg tcc ggc Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly Met Ser Ala 100 105 110	336
40	gac cct gag gac tat gac ctg gac cgc atg agc agc cgc cga agc atc Asp Pro Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Ser Leu Pro Glu Ile 115 120 125	384
45	gac aac gac ctg gtg gtt ttc tgc atg gac acc tac ggc gag gaa gac Asp Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Asp 130 135 140	432
50	ccc aac gac aat gac cga gac ttc ttc gac tgg ctg gac gag aca gac Pro Thr Asp Asn Ala Glu Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Glu Glu Thr Asp 145 150 155	480
55	gtg gat ctc tct ggc gtc aag ttc gtc gtc ttt ggc ctt ggc aac aag Val Asp Leu Ser Gly Val Lys Phe Ala Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys 160 165 170	528
60	acc tac gag cac ttc aat gac atg ggc aag tac gtg gac aag agc ctg Thr Tyr Glu His Phe Asn Ala Met Gly Lys Tyr Val Asp Arg Leu 175 180 185	576
65	gag cag ctc ggc gac cgc cgc atc ttt gag ctg ggc atg ggc gac gac Glu Glu Leu Gly Ala Glu Arg Ile Phe Glu Leu Gly Leu Gly Asp Asp 190 195 200	624
70	gat ggc aac ttc gag gac gac ttc atc acc tgg cgc gag cac ttc tgg Asp Gly Asn Leu Glu Glu Asp Phe Ile Thr Trp Arg Glu Glu Thr Trp 205 210 215	672
75	cgc ggc gtc tgc gac cgc ttt ggc gtc gaa gac acc ggc gac tcc Pro Ala Val Cys Glu His Phe Gly Val Glu Ala Thr Gly Glu Glu Ser 220 225 230	720
80	agc att cgc cag tac gac ctt gtg gtc cac gac acc ata gat ggc ggc Ser Ile Arg Glu Thr Val Val Val His Thr Asp Ile Asp Ala Ala 235 240 245	768
85	aag gtg tac atg ggc gag atg ggc cgc atg aag aac tac gag aac aag Lys Val Tyr Met Gly Glu Met Gly Arg Leu Thr Val Ala Glu Asn Glu 250 255 260	816
90	aag ccc ccc ttt gat gac aac aat cgc ttc ctg gtc gaa gtc acc acc Lys Pro Pro Phe Asp Ala Lys Asn Pro Phe Leu Ala Val Thr Thr 265 270 275	864
95	acc ggc aac ctg aac cca gaa acc gag ggc acc ctc atc acc ctg gaa Asn Arg Lys Leu Asn Glu Gly Thr Glu Arg His Leu Met His Leu Glu 280 285 290	912
100	tgg gac atc tgg gac tcc aac atc agc tat gaa tct ggc gac cac gtc Leu Asp Ile Ser Asp Ser Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Gly Asp His Val 295 300 305	960

【図 3】

図 3—アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のヌクレオチドおよびタンパク質配列

5	cttatttggg ttaggaagag cagcgggttc ggtgatttcc ctctacccct tattttctct ctcttgacac ccttttggg atgtgacgc cacttgggtg aacatttggg atgtttctct ctctctccctt cccggcgacga cctctctat ctctctctct cgtcagacat ttagctggc ctgaaatgg cacttctctt ctcttgacac tcttctctctt agtctctct to atg ggc Met Ala 1 10 15	60
10	caa ctc gat act ctc gat tgg gtc gtc ctg gtc ggc ctc ttc ggc ggt Gln Leu Asp Thr Leu Asp Leu Val Val Leu Ala Leu Leu Val Gly 5 10 15	288
15	agc gtg gac tac ttc acc aag agc acc tac tgg gtc gtc gac aca gac Ser Val Ala Tyr Thr Lys Gly Thr Tyr Tyr Trp Ala Lys Asp 20 25 30	336
20	cct tat ggc tgg gct ggt cgc ggc atg nat gaa ggc agc aag ggc ggc Pro Tyr Ala Ser Ala Gly Pro Lys Met Asn Tyr Gly Ala Lys Ala Gly 35 40 45	384
25	aag act cgc gac att gtt cag aac atg gac gac gac aac aac tgc Lys Thr Arg Asp Ile Val Glu Lys Met Asp Glu Thr Gly Lys Asn Cys 50 55 60	432
30	gtg att ttc cgc ggc tcc gaa acc ggc acc gtc ggc gac tac ggc tcc Val Ile Phe Tyr Gly Ser Glu Thr Thr Thr Ala Glu Asp Tyr Ala Ser 65 70 75	480
35	aga ctg ggc aag gac ggc tcc cgc ggc ttc gtc gtc acc atg gtc Arg Leu Ala Lys Glu Gly Ser Glu Arg Phe Gly Leu Lys Thr Met Val 85 90 95	528
40	gac aag gtt gtt ttc ttc gtc gtc gac nat gaa ggc ggc gaa ccc Asp Lys Val Val Phe Phe Val Leu Ala Thr Tyr Gly Glu Gly Glu Pro 100 105 110	576
45	agc gat aat ggc gtt gaa ttc tac cag ttc gtc acg ggc gaa gat gtc Thr Asp Asn Ala Val Glu Phe Tyr Glu Phe Val Thr Gly Glu Asp Ala 115 120 125	624
50	gct ttc gag agc ggc gtc acc ggc gac gat aag cct ctg tct tct ctc Ala Phe Glu Ser Gly Ala Thr Ala Asp Asp Lys Pro Leu Ser Ser Leu 130 135 140	672
55	aag tat ctc agc ttt gtc ctg gtc acc aac acc tat gag cac tac aac Lys Tyr Val Thr Phe Gly Leu Gly Asn Asn Thr Tyr Glu His Tyr Asn 145 150 155	720
60	gct atg gtt ctc gac aat gtc gac ggc gtc cca aag ttc ggc ggc cca Ala Met Val Arg Asn Val Asp Ala Ala Leu Thr Lys Phe Gly Ala Glu 160 165 170	768
65	cgc att ggc ttc gtc ggt gag ggt gac ggc ggc gtc gtc aca atg gaa Arg Ile Gly Ser Ala Gly Glu Gly Asp Gly Ala Gly Thr Thr Met Glu 175 180 185	816
70	gag gat ttc ctg ggc gag aag gac acc atg tgg gtc gtc ctt tct tgc Glu Asp Phe Leu Ala Trp Lys Glu Pro Met Trp Ala Ala Leu Ser Asp 190 195 200	864
75	gcy atg aac ctc gaa gac ggc gat ggc tac gac cgc gtc ttc aat Ala Met Asn Leu Glu Glu Arg Asp Ala Val Tyr Glu Pro Val Phe Asn 205 210 215	912
80	gac acc gag gac gac ttc gtc ggc ccc gaa gat gag aac gtt tac ctc Val Thr Glu Asp Glu Ser Leu Pro Glu Asp Asn Val Tyr Leu Thr 220 225 230	960
85	ggt gag ccc act cca ggt cat ctc cca ggc gag ccc aag ggc cgc tac Gly Glu Pro Thr Glu Gly His Leu Glu Gly Asn Val Tyr Lys Gly Pro 235 240 245	1008
90	tcc ggc ccc aac cgc ttc act gtc ccc atc tcc gaa tct gtc gac ctg Ser Ala His Asn Pro Phe Ile Ala Pro Ile Ser Glu Ser Arg Glu Leu 250 255 260	1056

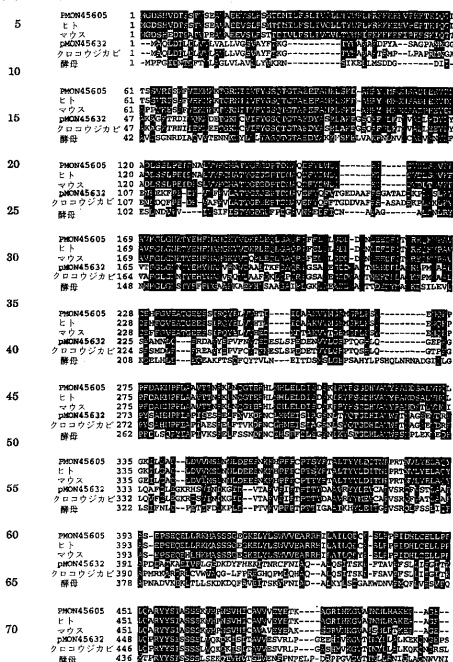
	305	310	315	320	
5	gct gtc tac cca ggc aac gac tct gct ctc gtc aac cag ctg ggc aac Ala Val Tyr Pro Ala Asn Asp Ser Ala Leu Val Asn Glu Leu Gly Lys 325 330 335 340	1008			
	atc ctg gct ggc gac ctg gac gtc atg tcc ctg aac aac ctg gat Ile Leu Gly Ala Asp Leu Asp Val Val Met Ser Leu Asn Asn Leu Asp 345 350 355 360	1056			
10	gag ggc tcc aac aag aag cca ttc cgc gtc cct acg tcc tac ggc Glu Glu Ser Asn Lys Lys His Pro Phe Pro Cys Pro Thr Ser Tyr Arg 365 370 375 380	1104			
15	agc ggc ctc acc tac tac ctg gac atc acc acc cgc cgt acc aac Thr Ala Leu Thr Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Asn Pro Pro Thr Ser Thr Asn 385 390 395 400	1152			
20	gtg ctg tac gac ctg ggc cag tac ggc tgg gac ccc tgg gag cag gag Val Leu Tyr Glu Leu Ala Glu Tyr Ala Ser Glu Pro Ser Glu Glu Glu 405 410 415 420	1200			
25	ctg ctg cgc aag atg ggc tcc tcc tcc ggc gag ggc aag gag ctg tac Leu Leu Arg Lys Met Ala Ser Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Leu Tyr 425 430 435 440	1248			
30	ctg agc tgg gtc gtc ggc ggc agc agc agc ctc ctg ctc atc ctg cag Leu Ser Trp Val Val Glu Ala Arg Arg His Ile Leu Val Ile Leu Glu 445 450 455 460	1296			
35	gac tgc cgc tcc ctg ggc ccc ccc atc gac cac ctg tgc gag ctg ctg Asp Cys Pro Ser Leu Arg Pro Pro Ile Asp Asn His Leu Cys Glu Leu Tyr 465 470 475 480	1344			
40	cgc ggc ctg cag ggc ggc tac tac tcc atc ggc tcc tcc tcc aag gtc Pro Arg Leu Glu Ala Arg Tyr Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Ser Lys Val 485 490 495 500	1392			
45	cac ccc aac tct gtc gac acc tgc ggc gtc gtt gtc gag tac gag acc His Pro Asn Ser Val His Ile Cys Ala Val Val Val Glu Tyr Glu Thr 505 510 515 520	1440			
50	aag ggc ggc gtc atc aac aag ggc gtc ggc acc aac tgg ctg ggc Lys Ala Gly Arg Ile Asn Lys Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala 525 530 535 540	1488			
55	aag gag cct ggc gag aac ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe 545 550 555 560	1536			
60	gtg ggc aag tcc cag ttc ggc ctg ctc ttc aag ggc acc acg ctg gtc Val Arg Leu Ser Glu Thr Phe Arg Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val 565 570 575 580	1584			
65	atc atg gtc ggc ccc ggc acc ggc gtc ggc acc ttc ata ggc ttc atc Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile 585 590 595 600	1632			
70	cag ggc cgc ggc tgg ctg cgc cag cag ggc aag ggc ggc gag ggc Glu Glu Arg Ala Trp Leu Arg Glu Glu Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr 605 610 615 620	1680			
75	ctg ctg tac tac ggc tgc ggc ggc tgc gac gag cac ctg tac Leu Leu Tyr Tyr Gly Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr 625 630 635 640	1728			
80	gag gag ctg ggc gac ttc acc aag gac ggc ggc ggc ggc ggc ggc Glu Glu Leu Thr Glu Phe His Arg Asp Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr 645 650 655 660	1776			
85	gtg ggc ttc tcc ggc gag ccc tac cag aac ggc gtc tac ctg cag ctc Val Ala Phe Ser Arg Glu Glu Thr Ser His Lys Val Tyr Val Glu His Leu 665 670 675 680	1824			
90	cta aag cca gac cgc gag cag ctg tgg aag ttc atc gac ggc ggc ggc Lys Lys Glu Asn Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile Glu Gly Gly Ala 685 690 695 700	1872			
95	cac atc tac gtc gtc gat cgc cgc aac atg ggc acc ggc ggc ggc ggc His Ile Tyr Tyr Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val Glu 705 710 715 720	1920			
100	aac acc ttc tac gac atc gtc gtc gag ctc ggc ggc atc gag cac ggc Asn Thr Phe Tyr Tyr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 725 730 735 740	1968			
105	cag ggc gtc gac tac atc aag aac ctg atc aag ggc ggc ggc ggc ggc Gln Ala Val Lys Asp Arg Asn Cys Leu His Met Glu Thr Thr Thr Thr Thr 745 750 755 760	2016			
110	ctg gac gtc tgg agc Leu Asp Val Trp Ser 765 770	2064			
115	ttc aac gtc aag gac cgc aac tgc ctg cac atg gaa atc agc atc ggc Phe Asn Val Lys Asp Arg Asn Cys Leu His Met Glu Thr Thr Thr Thr Thr 775 780 785 790	2112			
120	ggt agc aac ctc act tac cag act ggt gac cac atc gtc gtt tgg ccc Gly Ser Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Gly Asp His Ile Ala Val Trp Thr 795 800 805 810	2160			
125	acc aac ggc gtc tcc gag gtc gat cgc ttc ctg cag gtc ttt ggt ctc Thr Asn Ala Gly Ser Glu Val Asp Arg Phe Leu Glu Ala Phe Gly Thr 815 820 825 830	2208			
130	gaa gaa aag cgc ccc tac gtc atc aac aat agc ggc atc gat gtc acc Gly Lys Arg His Ser Val Ile Asn Ile Lys Gly Ile Asp Val Thr 835 840 845 850	2256			
135	gct aag gtt ccc act ccc act acc acy acc tac gac ggc ggc gtc ggc Ala Val Pro Ile Val Pro Thr Thr Tyr Asp Ala Val Val Arg 855 860 865 870	2304			
140	tac tac ctg gaa gtc ggt ggc ccc gtt tcc gtc cag ttc gtc tcc act Tyr Tyr Leu Glu Val Cys Ala Pro Val Ser Arg Glu Phe Val Ser Thr 875 880 885 890	2352			
145	ctc gtc gtc ttc ggc ccc gat gaa ggc acc aag ggc gag gac gtt gtc Leu Ala Ala Pro Asp Glu Ala Thr Thr Lys Ala Glu Ile Val Val Arg 895 900 905 910	2400			
150	tgg ggt ggc gag aag gac tat ttc cat gag aag att acc aac cgc tgc Leu Gly Glu Asp Lys Asp Tyr Phe His Glu Lys Ile Thr Asn Arg Cys 915 920 925 930	2448			
155	tcc aac atc ctc gac gtc ctc gac agc atc acc tcc aag cct tcc acc Phe Asn Ile Ala Glu Ala Leu Glu Ser Ile Thr Ser Lys Pro Phe Thr 935 940 945 950	2496			
160	gac gtc cgc ttc tcc ctg ctc atc gaa ggc atc acc acc acc ctc cag Ala Val Pro Phe Ser Leu Leu Ile Glu Gly Ile Thr Lys Leu Glu Pro 955 960 965 970	2544			
165	cgt tac tac tcc acc tcc tcc ctg gtc cag aag gag aag att Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser 975 980 985 990	2592			
170	agc att acc ggc gtt gtc ggc tgg gtc gtc gtc gtc gtc gtc gtc gtc Ser Ile Thr Thr Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val 995 1000 1005 1010	2640			
175	att gtc aag gtc gtc acc acy aac tat ctt ctc ggc gtc aag gaa aag Ile Val Lys Gly Val Thr Thr Asn Tyr Leu Leu Ala Leu Thr Lys Thr 1015 1020 1025 1030	2688			
180	caa aac ggc gag cct tcc cct gac cgc ggc gtc gtc gtc gtc gtc gtc Gln Asn Gly Ile Pro Ser Pro Asp Pro His Gly Leu Thr Tyr Ser Ile 1035 1040 1045 1050	2736			
185	act gaa ccc cgc aac aag tac gat ggc atc atc gtc ctc gtc ctc gtc Thr Gly Pro Arg Asn Lys Tyr Asp Gly Ile His Val Pro Val His Val 1055 1060 1065 1070	2784			
190	cgc ccc tgc aac ttc aag gag cag ctt ggc gac ctg ctc gtc aag atc Glu Trp Lys Thr Phe Glu Glu Glu Leu Gly Asp Ser Ser Lys Ile Ile 1075 1080 1085 1090	2832			
195	atg gtt ggc acc ggt act ggt gtt ggt gtc atc pro gtc ggt gtt ttc aag Met Val Gly Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 1095 1100 1105 1110	2880			
200	gag cgt gtc gtc gtc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc ggc Glu Arg Ala Glu Leu Ala Leu Ala Lys Gly Glu Lys Val Gly Thr Thr Thr 1115 1120 1125 1130	2928			
205	ctt ttc phe gty cys arg lys ser asp glu asp Leu Phe Phe Gly Cys Arg Lys Ser Asp Glu Asp 1135 1140 1145 1150	2976			
210	gaa tgg agc act ttc gtc gaa gac ctt ggc asp Glu Trp Lys Thr Phe Glu Glu Glu Leu Gly Asp Ser Leu Lys Ile Ile 1155 1160 1165 1170	3024			
215	act gtc ttc ttc cgt gaa tgg gtc gag aac gtc tac gtc cag cag Thr Ala Phe Ser Arg Glu Ser Ala Glu Lys Val Tyr Val Glu His Arg 1175 1180 1185 1190	3072			
220	ctg cgt gag cat ggc gag ctg gtc agt gac ctg ctg aag aac ggc 1195 1200 1205 1210	3120			



寄託番号	種	11a OHへの% 1D
CAB91316	アカバンカビ	40
CAA76855	ジベレラ・フジクロイ	37
CAA75566	ジベレラ・フジクロイ	37
AAJ34552	アスペルギルス・テレウス	29
CAA75557	ジベレラ・フジクロイ	24
CAA67874	フザリウム・オキシスポルム	24
CAA76703	ジベレラ・フジクロイ	23
CAB56503	ニチニチソウ	14
AAB94588	ダイズ	14
CAA91268	線虫	12

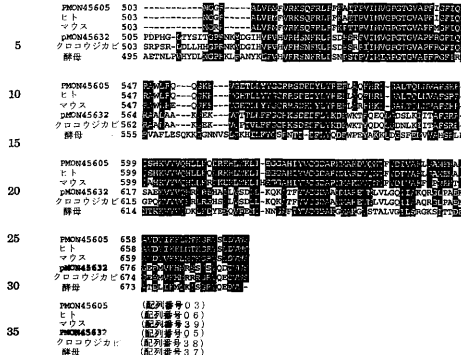
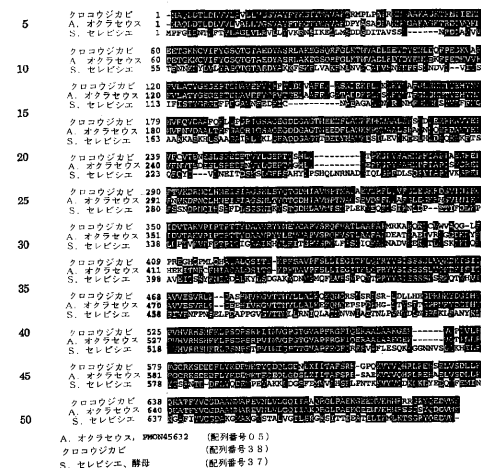
【図 7】

図7ークロコウジカビ、マウス、およびS. セレビスエ由来のNADPHチトクロムP450還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素のアミノ酸相同性並列



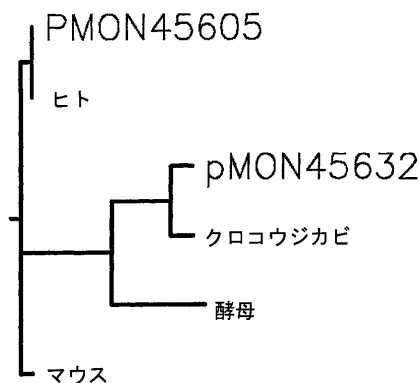
【図 8】

図8ークロコウジカビおよびS. セレビスエ由来のNADPHチトクロムP450還元酵素に対する、A. オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸相同性並列



【図 9】

図9ークロコウジカビ、酵母、およびマウス由来の還元酵素に対する、アスペルギルス・オクラセウスおよびヒト酸化還元酵素の関連性を示す系統樹



【図 10】

図10ークロコウジカビ、酵母、およびマウスおよびヒト由来の還元酵素に対するアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素の間のパーセント相同性

寄託番号	生物	A. オクラセウス酸化還元酵素に対する%ID
CAA81550	クロコウジカビ	84
EAA02936	S. セレビスエ	37
EAA04496	マウス	34
AAB21814	ヒト	33

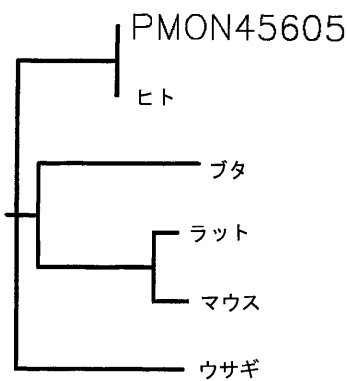
【図 1 1】

図 11—Swiss Prot 由来の上位 4 ヒットとヒト酸化還元酵素のアミノ酸相溶性並列

5	PMON45605	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ
	ラット	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ
	マウス	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ	1	MDSDIFVDFGQ
10	PMON45605	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ
	ラット	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ
	マウス	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ	61	MDSDIFVDFGQ
20	PMON45605	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ
	ラット	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ
	マウス	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ	120	MDSDIFVDFGQ
30	PMON45605	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ
	ラット	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ
	マウス	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ	180	MDSDIFVDFGQ
35	PMON45605	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ
	ラット	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ
	マウス	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ	240	MDSDIFVDFGQ
40	PMON45605	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ
	ラット	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ
	マウス	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ	300	MDSDIFVDFGQ
50	PMON45605	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
	ラット	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
55	PMON45605	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ
	ラット	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ	360	MDSDIFVDFGQ

【図 1 2】

図 12—Swiss Prot 由来の上位 4 ヒットとヒト酸化還元酵素 (P16435) の関連性を示す系統樹



【図 1 3】

図 13—ヒト酸化還元酵素および Swiss Prot 由来の上位 4 ヒットの間のパーセント相溶性

寄託番号	種	ヒト酸化還元酵素に対する % ID
P00388	ラット	92
P00389	ウサギ	92
P37040	マウス	92
P04175	ブタ	91

【図 1 4】

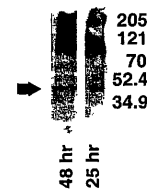
図 14—トランスフェクションした Sf9 昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素の発現

マウス	360	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
ブタ	360	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
5	PMON45605	420	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	420	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	420	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ラット	420	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	マウス	420	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	420	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
10	PMON45605	480	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	480	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	480	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ラット	480	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	マウス	480	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	480	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
15	PMON45605	540	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	540	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	540	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ラット	540	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	マウス	540	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	540	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
20	PMON45605	600	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	600	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	600	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ラット	600	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	マウス	600	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	600	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
25	PMON45605	660	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ヒト	660	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ウサギ	660	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ラット	660	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	マウス	660	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ
	ブタ	660	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ	MDSDIFVDFGQ

【図 1 5】

図 15—トランスフェクションした Sf9 昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウス P450 酸化還元酵素の発現

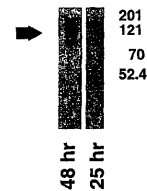
トランスフェクションした Sf9 細胞における 11 α 水酸化酵素の発現



【図 1 6】

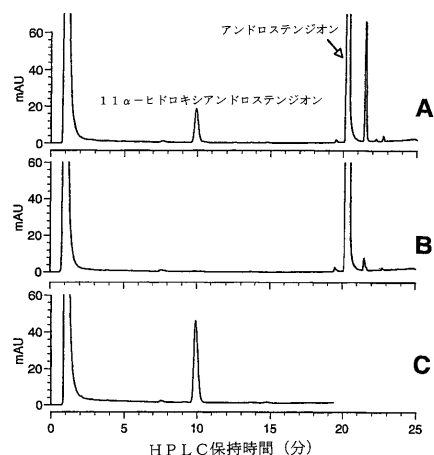
図 16—トランスフェクションした Sf9 昆虫細胞におけるアスペルギルス・オクラセウス P450 酸化還元酵素の発現

トランスフェクションした Sf9 細胞における真菌 P450 酸化還元酵素の発現



【図 16】

図16-HPLCで監視した、アンドロステンジオンの11アルファヒドロキシアンドロステンジオンへの変換



【手続補正書】

【提出日】平成16年10月25日(2004.10.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アスペルギルス・オクラセウス (*Aspergillus ochraceus*) 11アルファ水酸化酵素をコードする単離精製核酸。

【請求項2】 アスペルギルス・オクラセウス 11アルファ水酸化酵素をコードする単離DNA。

【請求項3】 アスペルギルス・オクラセウス 11アルファ水酸化酵素をコードする単離cDNA。

【請求項4】 アスペルギルス・オクラセウス 11アルファ水酸化酵素をコードする単離遺伝子。

【請求項5】 アスペルギルス・オクラセウス 11アルファ水酸化酵素をコードする、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項6】 核酸配列が配列番号1に示すとおりである単離精製核酸。

【請求項7】 DNA配列が配列番号1に示すとおりである単離DNA。

【請求項8】 cDNA配列が配列番号1に示すとおりである単離cDNA。

【請求項9】 遺伝子配列が配列番号1に示すとおりである単離遺伝子。

【請求項10】 遺伝子配列が配列番号1に示すとおりである、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項11】 アスペルギルス・オクラセウス 11アルファ水酸化酵素のアミノ

酸配列を有する単離タンパク質。

【請求項 1 2】 アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列を有する、タンパク質の単離変異体。

【請求項 1 3】 アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ水酸化酵素のアミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質。

【請求項 1 4】 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 2 に示すとおりである単離タンパク質。

【請求項 1 5】 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 2 に示すとおりである、タンパク質の単離変異体。

【請求項 1 6】 アミノ酸配列が、少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を持つ配列番号 2 を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 1 7】 アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 9 9 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 1 8】 アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 9 5 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 1 9】 アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 9 0 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 2 0】 アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 7 5 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 2 1】 アミノ酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 5 0 % 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 2 2】 アスペルギルス・オクラセウス 1 1 アルファ酸化還元酵素をコードする単離精製核酸。

【請求項 2 3】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離 DNA。

【請求項 2 4】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離 cDNA。

【請求項 2 5】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離遺伝子。

【請求項 2 6】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項 2 7】 核酸配列が配列番号 5 に示すとおりである単離精製核酸。

【請求項 2 8】 DNA 配列が配列番号 5 に示すとおりである単離 DNA。

【請求項 2 9】 cDNA 配列が配列番号 5 に示すとおりである単離 cDNA。

【請求項 3 0】 遺伝子配列が配列番号 5 に示すとおりである単離遺伝子。

【請求項 3 1】 遺伝子配列が配列番号 5 に示すとおりである、遺伝子の単離対立遺伝子。

【請求項 3 2】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を有する単離タンパク質。

【請求項 3 3】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を有する、タンパク質の単離変異体。

【請求項 3 4】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素のアミノ酸配列を含んでなる融合タンパク質。

【請求項 3 5】 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 6 に示すとおりである単離タンパク質。

【請求項 3 6】 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 6 に示すとおりである、タンパク質の単離変異体。

【請求項 3 7】 アミノ酸配列が、少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を持つ配列番号 6 を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 3 8】 アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 9 9 % 同一である配列

を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 39】 アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 95% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 40】 アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 90% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 41】 アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 75% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 42】 アミノ酸配列が、配列番号 6 に少なくとも 50% 同一である配列を含んでなる、精製ポリペプチド。

【請求項 43】 3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド); 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド); 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド); または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 11 アルファ水酸化を触媒可能な酵素をコードする、単離精製核酸。

【請求項 44】 前記酵素が、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドの 15 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 43 の単離精製核酸。

【請求項 45】 前記水酸化が:

- (a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン;
- (b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン;
- (c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ;
- (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD;
- (e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン;
- (f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン;
- (g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン;
- (h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン;
- (i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン;
- (j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン;
- (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン;
- (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン; および
- (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、請求項 43 または請求項 44 の単離精製核酸。

【請求項 46】 前記水酸化が:

- (a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン;
- (b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン;
- (c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ; および
- (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD

からなる群より選択される、請求項 45 の単離精製核酸。

【請求項 47】 前記水酸化が、カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノンである、請求項 46 の単離精製核酸。

【請求項 48】 3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 11 アルファ水酸化を触媒可能なタンパク質を発現する方法であって;

- (a) 前記タンパク質をコードする核酸に操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる発現カセットで、宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションし、そして
- (b) 前記宿主細胞において、前記タンパク質を発現することを含んでなる、前記方法。

【請求項 49】 前記タンパク質を回収する工程をさらに含んでなる、請求項 48 のタンパク質産生法。

【請求項 50】 前記タンパク質がアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素である、請求項 48 または請求項 49 の方法。

【請求項 51】 電子供与体タンパク質を発現することをさらに含んでなり、前記電子供与体タンパク質が、3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド; 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド; または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイドの 11 アルファ水酸化を触媒可能な前記タンパク質に、電子を供与することが可能である、請求項 50 の方法。

【請求項 52】 電子供与体タンパク質が、ヒト酸化還元酵素およびアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素からなる群より選択される、請求項 51 の方法。

【請求項 53】 前記電子供与体タンパク質がアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である、請求項 51 の方法。

【請求項 54】 前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素および前記電子供与体タンパク質をコードする核酸が、別個の発現カセット上にある、請求項 51 の方法。

【請求項 55】 前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素および前記電子供与体タンパク質をコードする核酸が、同一発現カセット上にある、請求項 51 の方法。

【請求項 56】 前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素がアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素であり、そして前記電子供与体タンパク質がヒト酸化還元酵素である、請求項 54 または請求項 55 の方法。

【請求項 57】 前記ステロイド 11 アルファ水酸化酵素がアスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素であり、そして前記電子供与体タンパク質がアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である、請求項 54 または請求項 55 の方法。

【請求項 58】 前記発現カセットが発現ベクター上にある、請求項 48 の方法。

【請求項 59】 前記発現ベクターがバキュロウイルスである、請求項 58 の方法。

【請求項 60】 前記バキュロウイルスが、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多核体病ウイルスおよびカイコガ (*Bombyx mori*) 核多核体病ウイルスからなる群より選択される、核多核体病ウイルスである、請求項 59 の方法。

【請求項 61】 前記核多核体病ウイルスがオートグラファ・カリフォルニカ核多核体病ウイルスである、請求項 60 の方法。

【請求項 62】 前記宿主細胞が昆虫細胞である、請求項 58 の方法。

【請求項 63】 前記昆虫細胞がスポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*)、トリコプルシア・ニ (*Trichoplusia ni*)、オートグラファ・カリフォルニカ、およびマンデュカ・セクスタ (*Manduca sexta*) 細胞からなる群より選択される、請求項 62 の方法。

【請求項 64】 前記昆虫細胞がスポドプテラ・フルギベルダ細胞である、請求項 63 の方法。

【請求項 65】 前記アスペルギルス・オクラセウス 11 アルファ水酸化酵素が配列番号 2 である、請求項 48 ~ 64 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 66】 前記ヒト酸化還元酵素が配列番号 4 である、請求項 48 ~ 64 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 67】 前記アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素が配列番号 6 である、請求項 48 ~ 64 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 68】 3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド); 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド); 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド); または 3 ケトデルタ 1, 2 デルタ 4, 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 11 アルファ水酸化を触媒可能である、単離精製ポリペプチド。

【請求項 69】 前記酵素が、3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイドの 1 5 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 68 の単離精製ポリペプチド。

【請求項 70】 前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;
- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ;
- (d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D ;
- (e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン ;
- (f) 6 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ;
- (g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;
- (h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン ;
- (i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン ;
- (j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン ;
- (k) プロゲステロンから 1 1 アルファヒドロキシプロゲステロン ;
- (l) メクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 6 , 7 - ビス - ラクトン ; および
- (m) メクスレノン 7 , 9 - ビスラクトンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン 7 , 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、請求項 68 または請求項 69 の単離精製ポリペプチド。

【請求項 71】 前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
 - (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;
 - (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ; および
 - (d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D
- からなる群より選択される、請求項 70 の単離精製ポリペプチド。

【請求項 72】 前記水酸化が、カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノンである、請求項 71 の単離精製酵素。

【請求項 73】 3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 4 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 4 デルタ 6 ステロイド) ; 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイド (3 ケトデルタ 6 ステロイド) ; または 3 ケトデルタ 1 , 2 デルタ 4 , 5 ステロイド (3 ケトデルタ 1 デルタ 4 ステロイド) の 1 1 アルファ水酸化を触媒可能なポリペプチドをコードする単離精製核酸に、操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる、発現カセット。

【請求項 74】 前記ポリペプチドが、3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイドの 1 5 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 73 の発現カセット。

【請求項 75】 前記水酸化が :

- (a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン ;
- (b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン ;
- (c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ ;
- (d) A D D (1 , 4 アンドロステンジエンジオン) から 1 1 アルファヒドロキシ A D D ;
- (e) メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシメクスレノン ;
- (f) 6 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ;
- (g) 9 アルファメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;
- (h) 1 2 ベータメクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシ 1 2 ベータメクスレノン ;
- (i) デルタ 1 2 メクスレノンから 1 1 アルファヒドロキシデルタ 1 2 メクスレノン ;
- (j) テストステロンから 1 1 アルファヒドロキシテストステロン ;

- (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン；
- (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン；および
- (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、請求項 7 3 または請求項 7 4 の発現カセット。

【請求項 7 6】 前記水酸化が：

- (a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；
- (b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；
- (c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；および
- (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD からなる群より選択される、請求項 7 5 の発現カセット。

【請求項 7 7】 前記水酸化が、カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノンである、請求項 7 6 の発現カセット。

【請求項 7 8】 アスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素をコードする単離精製核酸に、操作可能であるように連結したプロモーターを含んでなる、発現カセット。

【請求項 7 9】 前記核酸が配列番号 0 6 である、請求項 7 8 の発現カセット。

【請求項 8 0】 シトステロールからエブレノンへの合成の代謝経路由来の酵素をコードする異種 DNA を含んでなる発現カセットであって、前記酵素が：

- (a) カンレノンから 11 アルファヒドロキシカンレノン；
- (b) アンドロステンジオンから 11 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；
- (c) アルドナから 11 アルファヒドロキシアルドナ；
- (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD ；
- (e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン；
- (f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン；
- (g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン；
- (h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン；
- (i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン；
- (j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン；
- (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン；
- (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン；および
- (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、少なくとも 1 つの変換を触媒し、そして異種 DNA が、組換え宿主において、コードされる酵素を発現するのに必要な調節配列に、操作可能であるように連結されている、前記発現カセット。

【請求項 8 1】 異種 DNA コード配列が、以下の属および種：アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニダランス (*Aspergillus nidulans*)、リゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*)、リゾプス・ストロニファー (*Rhizopus stolonifer*)、ストレプトミセス・フラディエー (*Streptomyces fradiae*)、巨大菌 (*Bacillus megaterium*)、シュードモナス・クルシビエー (*Pseudomonas cruciviae*)、トリコテシウム・ロゼウム (*Trichothecium roseum*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、リゾプス・アーヒズス (*Rhizopus arrhizus*)、アブシディア・コイルラ (*Absidia coerulea*)、アブシディア・グラウカ (*Absidia glauca*)、アクチノムコール・エレガンス (*Actinomucor elegans*)、ア

スペルギルス・フラビペス (*Aspergillus flavipes*)、アスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*)、ボーベリア・バシアナ (*Beauveria bassiana*)、ボトリオスフェーリア・オブツサ (*Botryosphaeria obtusa*)、カロネクトリア・デコラ (*Calonectria decora*)、ケトミウム・コクリオデス (*Chaetomium cochliodes*)、コリネスポラ・カシコラ (*Corynespora cassicola*)、カニングハメラ・ブラケスリーアナ (*Cunninghamella blakesleeana*)、カニングハメラ・エキヌラタ (*Cunninghamella echinulata*)、カニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*)、カーブラリア・クラバタ (*Curvularia clavata*)、カーブラリア・ルナタ (*Curvularia lunata*)、シリンドロカルボン・ラディシコラ (*Cylindrocarpon radicicola*)、エピコッカム・フミコラ (*Epicoccum humicola*)、ゴングロネラ・ブトレリ (*Gongronella butleri*)、ヒポミケス・クリソスペルマス (*Hypomyces chrysospermus*)、モノスポリウム・オリバセウム (*Monosporium olivaceum*)、モルティエレラ・イサベリナ (*Mortierella isabellina*)、ムコール・ムセド (*Mucor mucedo*)、ムコール・グリセオシアヌス (*Mucor griseocyaneus*)、ミロテシウム・ベルカリア (*Myrothecium verrucaria*)、ノカルディア・コラリナ (*Nocardia corallina*)、パエシロミセス・カルネウス (*Paezilomyces carneus*)、ペニシリウム・パツルム (*Penicillium patulum*)、ピトミセス・アトルーリバセウス (*Pithomyces atrolivaceus*)、ピトミセス・シノドンティス (*Pithomyces cynodontis*)、ピクノスポリウム種 (*Pycnosporium sp.*)、サッカロポリスポラ・エリスレー (*Saccharopolyspora erythraea*)、セペドニウム・クリソスペルマム (*Sepedonium chrysospermum*)、スタキリディウム・ビコロール (*Stachylidium bicolor*)、ストレプトミセス・ヒクロスコピクス (*Streptomyces hygroscopicus*)、ストレプトミセス・パーブラセン (*Streptomyces purpurascens*)、シンセファラストラム・ラセモザム (*Syncephalastrum racemosum*)、タムノスティラム・ピリフォルメ (*Thamnostyllum piriforme*)、シエラビア・テリコラ (*Thielavia terricola*)、およびバーティシリウム・テオブロメー (*Verticillium theobromae*)、セファロスポリウム・アフイディコラ (*Cephalosporium aphidicola*)、コクリオボルス・ルナタス (*Cochliobolus lunatas*)、ティエグヘメラ・オルキディス (*Tieghemella orchidis*)、ティエグヘメラ・ヒアロスポラ (*Tieghemella hyalospora*)、モノスポリウム・オリバセウム、アスペルギルス・ウスツス (*Aspergillus ustus*)、フザリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、バーティシリウム・グラウカム (*Verticillium glaucum*)、およびリゾプス・ニグリカンス (*Rhizopus nigricans*) からなる群より選択されることで特徴付けられる、請求項 80 記載の発現カセット。

【請求項 82】 属および種が、アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニダランス、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、ストレプトミセス・フラディエー、巨大菌、シュードモナス・クルシビエー、トリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム、リゾプス・アーヒズス、およびモノスポリウム・オリバセウムからなる群より選択される、請求項 81 記載の発現カセット。

【請求項 83】 属種がアスペルギルス・オクラセウスである、請求項 82 記載の発現カセット。

【請求項 8 4】 請求項 8 0 記載の少なくとも 1 つの発現カセットを含んでなる、組換え宿主細胞およびその子孫。

【請求項 8 5】 宿主が微生物である、請求項 8 4 記載の組換え宿主細胞およびその子孫。

【請求項 8 6】 宿主が細菌である、請求項 8 5 記載の組換え宿主細胞およびその子孫。

【請求項 8 7】 システロールからエブレノンへの合成の代謝経路由来の 1 以上の酵素を作成する方法であって、異種 DNA にコードされる 1 以上の酵素が発現され、そして集積する条件下、栄養培地中で、請求項 8 6 の組換え宿主細胞をインキュベーションすることを含んでなる、前記方法。

【請求項 8 8】 化合物を水酸化産物に選択的に酸化する方法であって：(a) 水酸化しようとする化合物を、該化合物が水酸化され、そして水酸化産物が集積する条件下、請求項 8 6 の組換え宿主細胞の存在下でインキュベーションし、そして(b) 水酸化産物を回収する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 8 9】 *in vitro*で、化合物を水酸化産物に選択的に水酸化する方法であって：(a) 水酸化しようとする化合物を、該化合物が水酸化され、そして水酸化産物が集積する条件下、請求項 8 8 の方法で産生した酵素の存在下でインキュベーションし、そして(b) 水酸化産物を回収する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 9 0】 請求項 7 3 ~ 8 3 のいずれか 1 項の発現カセットを宿する宿主細胞。

【請求項 9 1】 前記発現カセットが、前記宿主細胞の染色体に組み込まれている、請求項 9 0 の宿主細胞。

【請求項 9 2】 前記発現カセットが発現ベクターに組み込まれている、請求項 9 0 の宿主細胞。

【請求項 9 3】 クローニングした 1 1 アルファ水酸化酵素の比活性を測定する方法であって；

(a) 前記 1 1 アルファ水酸化酵素をコードする核酸を含んでなる発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、

(b) 前記宿主細胞において、前記 1 1 アルファ水酸化酵素を発現し；

(c) 前記細胞から細胞成分膜分画を調製し、

(d) ステロイド基質と前記細胞成分膜分画ミクロソームをインキュベーションし、そして

(e) ステロイド基質の 1 1 アルファヒドロキシステロイド対応物への変換を監視する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 9 4】 酸化還元酵素をコードする発現ベクター核酸で宿主細胞を形質転換し、そして前記宿主細胞において、前記酸化還元酵素を発現することをさらに含んでなる、請求項 9 3 の方法。

【請求項 9 5】 前記酸化還元酵素がヒトまたはアスペルギルス・オクラセウスである、請求項 9 4 の方法。

【請求項 9 6】 前記酸化還元酵素がヒト酸化還元酵素である、請求項 9 5 の方法。

【請求項 9 7】 前記酸化還元酵素がアスペルギルス・オクラセウス酸化還元酵素である、請求項 9 5 の方法。

【請求項 9 8】 配列番号 2 に少なくとも 9 5 % 同一であり、そして 3 ケトデルタ 4 , 5 ステロイド； 3 ケトデルタ 4 , 5 デルタ 6 , 7 ステロイド； 3 ケトデルタ 6 , 7 ステロイド；または 3 ケトデルタ 1 , 2 デルタ 4 , 5 ステロイドの 1 1 アルファ水酸化を触媒し、前記水酸化が：

(a) カンレノンから 1 1 アルファヒドロキシカンレノン；

(b) アンドロステンジオンから 1 1 アルファヒドロキシアンドロステンジオン；

(c) アルドナから 1 1 アルファヒドロキシアルドナ；

- (d) ADD (1, 4 アンドロステンジエンジオン) から 11 アルファヒドロキシ ADD ;
- (e) メクスレノンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン ;
- (f) 6 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 6 ベータメクスレノン ;
- (g) 9 アルファメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 9 アルファメクスレノン ;
- (h) 12 ベータメクスレノンから 11 アルファヒドロキシ 12 ベータメクスレノン ;
- (i) デルタ 12 メクスレノンから 11 アルファヒドロキシデルタ 12 メクスレノン ;
- (j) テストステロンから 11 アルファヒドロキシテストステロン ;
- (k) プロゲステロンから 11 アルファヒドロキシプロゲステロン ;
- (l) メクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 6, 7 - ビス - ラクトン ; および
- (m) メクスレノン 7, 9 - ビスラクトンから 11 アルファヒドロキシメクスレノン 7, 9 - ビスラクトン

からなる群より選択される、配列番号 2 を有するタンパク質およびその変異体。

【請求項 99】 3 ケトデルタ 4, 5 ステロイド ; 3 ケトデルタ 4, 5 デルタ 6, 7 ステロイド ; または 3 ケトデルタ 6, 7 ステロイドの 15 ベータ水酸化を触媒しない、請求項 98 のタンパク質。

【請求項 100】 アミノ酸配列が、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25 からなる群より選択される、精製ポリペプチド。

【請求項 101】 アミノ酸配列が配列番号 2 の少なくとも 10 の連続する残基を含んでなる、精製免疫原性ポリペプチド。

【請求項 102】 配列番号 2 に示すようなアミノ酸配列を有する 11 アルファ水酸化酵素に結合特異性を有する、単離精製抗体。

- 【請求項 103】 (a) 配列番号 2 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 2 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ;
- (c) アミノ酸、配列番号 23 ;
- (d) アミノ酸、配列番号 24 ; および
- (e) アミノ酸、配列番号 25

からなる群より選択されるタンパク質領域に結合する、請求項 102 の抗体。

【請求項 104】 前記抗体がペプチドカラム上で精製され、前記ペプチドが :

- (a) 配列番号 2 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 2 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ;
- (c) アミノ酸、配列番号 23 ;
- (d) アミノ酸、配列番号 24 ; および
- (e) アミノ酸、配列番号 25

からなる群より選択される、請求項 102 または請求項 103 の抗体。

【請求項 105】 アミノ酸配列が配列番号 26 からなる群より選択される、精製ポリペプチド。

【請求項 106】 アミノ酸配列が配列番号 6 の少なくとも 10 の連続する残基を含んでなる、精製免疫原性ポリペプチド。

【請求項 107】 配列番号 6 に示すようなアミノ酸配列を有する 11 アルファ水酸化酵素に結合特異性を有する、単離精製抗体。

- 【請求項 108】 (a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 6 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ; および
- (c) アミノ酸、配列番号 26

からなる群より選択されるタンパク質領域に結合する、請求項 107 の抗体。

【請求項 109】 前記抗体がペプチドカラム上で精製され、前記ペプチドが :

- (a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 10 ;
- (b) 配列番号 6 の最後の 10 の C 末端アミノ酸 ; および
- (c) アミノ酸、配列番号 26

からなる群より選択される、請求項 107 または請求項 108 の抗体。

【請求項 110】 請求項 102、103、104、107、108、または 109 の抗体、および有効なキャリアー、ビヒクル、または補助剤を含んでなる組成物。

【請求項 111】 請求項 102、103、104、107、108、または 109 の抗体および溶液を含んでなる組成物。

【請求項 112】 ポリクローナル抗体である、請求項 102、103、104、107、108、または 109 の抗体。

【請求項 113】 モノクローナル抗体である、請求項 102、103、104、107、108、または 109 の抗体。

【請求項 114】 免疫親和性マトリックスにコンジュゲート化した、請求項 102、103、104、107、108、または 109 の抗体。

【請求項 115】 請求項 114 の免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法。

【請求項 116】 前記免疫親和性マトリックスが S E P H A R O S E 4 B である、請求項 114 の抗体。

【請求項 117】 請求項 116 の免疫親和性マトリックスを用いて、生物学的液体または細胞溶解物からポリペプチドを精製する方法。

【請求項 118】 ペプチドカラムを用いて抗体を精製する方法であって、前記ペプチドが：

- (a) 配列番号 2 の N 末端アミノ酸 1 - 10；
- (b) 配列番号 2 の最後の 10 の C 末端アミノ酸；
- (c) アミノ酸、配列番号 23；
- (d) アミノ酸、配列番号 24；および
- (e) アミノ酸、配列番号 25

からなる群より選択される、前記方法。

【請求項 119】 ペプチドカラムを用いて抗体を精製する方法であって、前記ペプチドが：

- (a) 配列番号 6 の N 末端アミノ酸 1 - 10；
- (b) 配列番号 6 の最後の 10 の C 末端アミノ酸；および
- (c) アミノ酸、配列番号 26

からなる群より選択される、前記方法。

【請求項 120】 生物学的液体において、第一のポリペプチドを検出する方法であって、前記の第一のポリペプチドが 11 アルファ水酸化酵素および酸化還元酵素からなる群より選択され、以下の：

- (a) 前記液体を、前記の第一のポリペプチドに結合特異性を有する第二のポリペプチドと接触させ、そして
- (b) 前記の第二のポリペプチドの存在をアッセイして、前記の第一のポリペプチドのレベルを決定する

工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 121】 前記の第二のポリペプチドが抗体である、請求項 120 の方法。

【請求項 122】 前記の第二のポリペプチドが放射標識されている、請求項 120 または請求項 121 の方法。

【請求項 123】 6 × S S C および 65 中で、配列番号 1 をゲノム DNA にハイブリダイズさせ、そして配列番号 1 で検出した核酸を単離することを含んでなる、単離核酸を産生する方法。

【請求項 124】 請求項 123 の方法にしたがって調製した、単離 DNA 核酸。

【請求項 125】 配列番号 1 に示す配列の相補体に、非常にストリンジェントな条件下で、特異的にハイブリダイズする、単離核酸。

【請求項 126】 細胞の染色体 DNA に挿入した際、通常は細胞で発現されない

ステロイド 11 アルファ水酸化酵素遺伝子の発現を改変する、DNA 構築物であって：

- a) ターゲティング配列；
- b) 制御配列；および
- c) ステロイド 11 アルファ水酸化酵素の構造遺伝子

を含んでなる、前記 DNA 構築物。

【請求項 127】 請求項 126 の DNA 構築物を宿する宿主細胞。

【請求項 128】 心臓疾患、炎症、関節炎、または癌を治療する、療法適用の医薬品製造のための、クローニングした 11 アルファ水酸化酵素を宿する宿主細胞の使用。

【請求項 129】 約 0.5 - 500 g / l 糖蜜 (molasses)、0.5 - 50 g / l トウモロコシ浸染 (corn steep) 液、0.5 - 50 g / l KH_2PO_4 、2.5 - 250 g / l NaCl 、2.5 - 250 g / l グルコース、および 0.04 - 4 g / l プロゲステロン、pH 3.5 - 7 を含んでなる組成物。

【請求項 130】 約 10 - 250 g / l 糖蜜、1 - 25 g / l トウモロコシ浸染液、1 - 25 g / l KH_2PO_4 、5 - 125 g / l NaCl 、5 - 125 g / l グルコース、および 0.08 - 2 g / l プロゲステロン、pH 4.5 - 6.5 を含んでなる組成物。

【請求項 131】 約 25 - 100 g / l 糖蜜、2.5 - 10 g / l トウモロコシ浸染液、2.5 - 10 g / l KH_2PO_4 、12.5 - 50 g / l NaCl 、12.5 - 50 g / l グルコース、および 0.2 - 0.8 g / l プロゲステロン、pH 5.5 - 6.0 を含んでなる組成物。

【請求項 132】 50 g / l 糖蜜、5 g / l トウモロコシ浸染液、5 g / l KH_2PO_4 、25 g / l NaCl 、25 g / l グルコース、20 g / l 寒天、および 0.4 g / l プロゲステロン、pH 5.8 を含んでなる組成物。

【請求項 133】 約 4 - 100 g / l 寒天をさらに含んでなる、請求項 129 ~ 132 のいずれか 1 項の組成物。

【請求項 134】 約 10 - 40 g / l 寒天をさらに含んでなる、請求項 129 ~ 132 のいずれか 1 項の組成物。

【請求項 135】 約 20 g / l 寒天をさらに含んでなる、請求項 129 ~ 132 のいずれか 1 項の組成物。

【請求項 136】 アスペルギルス・オクラセウス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニダランス、リゾプス・オリゼー、リゾプス・ストロニファー、およびトリコテシウム・ロゼウム、フザリウム・オキシスポルム、リゾプス・アーヒズス、モノスポリウム・オリバセウム、ペニシリウム・クリソゲヌム (*Penicillium chrysogenum*)、およびアブシディア・コイルラからなる群より選択される微生物から胞子を産生する、請求項 129 ~ 135 のいずれか 1 項の組成物の使用。

【請求項 137】 6 x SSC および 65 °C 中で、配列番号 5 をゲノム DNA にハイブリダイズさせ、そして配列番号 5 で検出した核酸を単離することを含んでなる、単離核酸を産生する方法。

【請求項 138】 請求項 137 の方法にしたがって調製した、単離 DNA 核酸。

【請求項 139】 配列番号 5 に示す配列の相補体に、非常にストリンジェントな条件下で、特異的にハイブリダイズする、単離核酸。

【請求項 140】 アスペルギルス・オクラセウスから胞子を産生する、請求項 129 ~ 135 のいずれか 1 項の組成物の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/51070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/02 C07K16/40 C12N15/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MADYASTHA K M ET AL: "THE MICROSOMAL 11-ALPHA HYDROXYLATION OF PROGESTERONE IN ASPERGILLUS-OSHRACEUS ISOLATION CHARACTERIZATION AND SOLUBILIZATION OF THE HYDROXYLASE SYSTEM" CANADIAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 62, no. 2-3, 1984, pages 100-107, XP009006125 ISSN: 0714-7511 the whole document --- -/-	1-136

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2003

Date of mailing of the international search report

11/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Guarinos Vifials, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/51070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN DEN BRINK J M ET AL: "Regulation of expression of the Aspergillus niger benzoate para-hydroxylase cytochrome P450 system." MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 263, no. 4, May 2000 (2000-05), pages 601-609, XP002232351 ISSN: 0026-8925 the whole document	1-136
A	SAMANTA T B ET AL: "CHARACTERIZATION OF PROGESTERONE 11-ALPHA-HYDROXYLASE OF ASPERGILLUS-OSHRACEUS TS A CYTOCHROME P-450 LINKED MONOOXYGENASE" JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY, vol. 28, no. 3, 1987, pages 327-332, XP009005936 ISSN: 0022-4731 the whole document	1-136
A	JAYANTHI C R ET AL: "MICROSOMAL 11-ALPHA HYDROXYLATION OF PROGESTERONE IN ASPERGILLUS-OSHRACEUS 1. CHARACTERIZATION OF THE HYDROXYLASE SYSTEM" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 106, no. 4, 1982, pages 1262-1268, XP009006233 ISSN: 0006-291X the whole document	1-136
A	GHOSH D K ET AL: "MICROSOMAL BENZO A PYRENE HYDROXYLASE IN ASPERGILLUS-OSHRACEUS TS ASSAY AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME SYSTEM" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 113, no. 2, 1983, pages 497-505, XP009006231 ISSN: 0006-291X tables I,III	1-136
A	VAN DEN BRINK HANS M ET AL: "Cloning and characterization of the NADPH cytochrome P450 oxidoreductase gene from the filamentous fungus Aspergillus niger." DNA AND CELL BIOLOGY, vol. 14, no. 8, 1995, pages 719-729, XP001146037 ISSN: 1044-5498	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/51070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NELSON D R ET AL: "P450 SUPERFAMILY: UPDATE ON NEW SEQUENCES, GENE MAPPING, ACCESSION NUMBERS AND NOMENCLATURE" PHARMACOGENETICS, CHAPMAN & HALL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 1-42, XP000196724 ISSN: 0960-314X ---	
A	BAK S ET AL: "CLONING OF THREE A-TYPE CYTOCHROMES P450, CYP71E1, CYP98, AND CYP99 FROM SORGHUM BICOLOR (L.) MOENCH BY A PCR APPROACH AND IDENTIFICATION BY EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI OF CYP71E1 AS A MULTIFUNCTIONAL CYTOCHROME P450 IN THE BIOSYNTHESIS OF THE CYANOGENIC GLUCOSIDE DHURRIN" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 36, no. 6, February 1998 (1998-02), pages 393-405, XP001002459 ISSN: 0167-4412 ---	
A	MILES J S: "STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY CONSERVED REGIONS OF CYTOCHROME P-450 REDUCTASE AS TARGETS FOR DNA AMPLIFICATION BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE CDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, vol. 287, 1992, pages 195-200, XP000569628 ISSN: 0264-6021 -----	

International Application No. PCT/US 01 51070

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-21, 43-77, 93-119, 123-136 completely and 80-92, 120-122 partially

a polynucleotide identified by SEQ ID NO:1 encoding the 11 α -hydroxylase from *Aspergillus ochraceus* identified by SEQ ID NO:2 and related methods and products.

2. Claims: 22-42, 78, 79 completely and 80-92, 120-122 partially

a polynucleotide identified by SEQ ID NO:5 encoding the oxidoreductase from *Aspergillus ochraceus* identified by SEQ ID NO:6 and related methods and products.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/51070

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
C 0 7 K 1/02	C 0 7 K 1/02	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/14	C 1 2 N 1/14	C
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 N 9/02	C 1 2 P 33/10	
C 1 2 P 33/10	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/26	G 0 1 N 33/536	B
G 0 1 N 33/536	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/573	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RD,RO,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 ボルテン, スザンヌ

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 2 2, カークウッド, イースト・モンロー 8 0 9

(72)発明者 クレイトン, ロバート

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 3 4 8, フォリステル, ディートリッチ 7 7 7

(72)発明者 イーストン, アラン

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 4 6, メリーランド・ハイツ, セヴン・パインズ・ドライブ 2 3 1 7, ナンバー 7

(72)発明者 エンゲル, レスリー

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 3 1, デス・ペアーズ, ブライアーブルック・トレイル 1 5 1

(72)発明者 メッシング, ディーン

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 1 3 9, セント・ルイス, タム・アベニュー 1 1 0 7

(72)発明者 ング, ジョン・エス

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 3 7 7, オーク・パーク, メデア・クリーク・レイン 3 9 9

(72)発明者 ウォーカー, マーク・シー

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 1 7, チェスターフィールド, ホワイト・ロード 1 3 6 1

(72)発明者 ライツ, ビヴァリー

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 1 4, チェスターフィールド, プレザント・リッジ・コート 1 4 8 1 4

(72)発明者 ウォン, ピン・ティー

アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 1 1, マンチェスター, テンビー・テラス 5 1 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA08 CA04 CA05 CA11 DA02 DA06 EA02 GA14
4B050 CC03 DD03 LL01
4B063 QA01 QQ08 QQ22 QQ75 QR02 QR41 QR77 QX10
4B064 AG27 AH07 BH20 CA10 CA19 CA20 CB12 CC24 CD04 DA01
DA13
4B065 AA26X AA60Y AA90X AB01 BA02 BA03 CA28 CA44 CA46
4C087 AA01 AA02 BC30 CA12 MA70 NA14 ZA36 ZA96 ZB11 ZB26
4H045 AA11 BA41 CA15 DA76 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	Aspergillus ochraceus11α羟化酶和氧化还原酶		
公开(公告)号	JP2005512502A	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2002548104	申请日	2001-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	法马西亚公司		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚公司		
[标]发明人	ボルテンスザンヌ クレイトンロバート イーストンアラン エンゲルレスリー メッシングディーン ングジョンエス ウォーカーマークシー ライツビヴァリー ウォンピンティー		
发明人	ボルテン,スザンヌ クレイトン,ロバート イーストン,アラン エンゲル,レスリー メッシング,ディーン ング,ジョン・エス ウォーカー,マーク・シー ライツ,ビヴァリー ウォン,ピン・ティー		
IPC分类号	G01N33/536 A61K35/74 A61P9/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 C07K1/02 C07K14/38 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/14 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N3/00 C12N5/10 C12N9/02 C12N15/09 C12P21/08 C12P33/10 C12Q1/26 G01N33/573		
CPC分类号	A61P9/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/38 C07K16/40 C12N1/14 C12N3/00 C12N9/0004 C12N9/0083 C12N2799/026 C12P33/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/74.A A61P9/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 C07K1/02 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/14.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12P33/10 C12Q1/26 G01N33/536.B G01N33/573.A C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA08 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/GA14 4B050/CC03 4B050/DD03 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ22 4B063/QQ75 4B063/QR02 4B063/QR41 4B063/QR77 4B063/QX10 4B064/AG27 4B064/AH07 4B064/BH20 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CB12 4B064/CC24 4B064/CD04 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA60Y 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA28 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC30 4C087/CA12 4C087/MA70 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA96 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA15 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/244300 2000-10-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，从赭曲霉孢子产生的cDNA文库中分离的mRNA涉及新的细胞色素P450样酶（赭曲霉）。当编码11α羟化酶的cDNA与编码人氧化还原酶的cDNA共同表达作为草地贪夜蛾（Sf-9）昆虫细胞中的电子供体时，羟化酶通过HPLC分析作为类固醇底物4-雄烯-3，成功催化17-二酮（AD）转化为11α-羟基-AD。本发明还包括与这些cDNA有关或源自这些cDNA的核酸分子，包括互补物，同系物和片段，以及使用这些核酸分子的方法，例如产生多肽及其片段以及。本发明还涉及识别赭曲霉11α羟化酶和氧化还原酶的抗体的制备及其在制备这些天然和重组聚并检测肽的存在。本发明还涉及一种在异源宿主细胞中表达曲霉属11α羟化酶基因的方法，所述基因与人或曲霉属氧化还原酶分开或与其组合以产生生物体至类固醇底物的11α羟基对应物也就是如何促进转化提供。

				特許庁 (P2005-512)	
				(43) 公表日 平成17年5月12日 (2005.5.12)	
(51) Int. Cl. ⁷	F 1		テーマコード (参考)		
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4		
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	A	4 B 0 5 0		
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00		4 B 0 6 3		
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02		4 B 0 6 4		
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00		4 B 0 6 5		
審査請求 有 予備審査請求 有				(全 154 頁) 最終頁1	
(21) 出願番号	特願2002-548104 (P2002-548104)		(71) 出願人	502427323	
(86) (22) 出願日	平成13年10月26日 (2001.10.26)		ファルマシア・コーポレーション		
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月19日 (2003.6.19)		アメリカ合衆国ミズーリ州63017		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/051070		732, チェスターフィールド, チェ		
(87) 国際公開番号	WO2002/046386		ーフィールド・パークウェイ・ウエス		
(87) 国際公開日	平成14年6月13日 (2002.6.13)		700		
(31) 優先権主張番号	60/244,300		(74) 代理人	100089705	
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000.10.30)		弁理士 社本 一夫		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人	100076691	
			弁理士 増井 忠武		
			(74) 代理人	100075270	
			弁理士 小林 泰		
			(74) 代理人	100080137	
			弁理士 千葉 昭男		
鳥取西工務					