

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-54652

(P2016-54652A)

(43) 公開日 平成28年4月21日(2016.4.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2014-180853 (P2014-180853)	(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(22) 出願日	平成26年9月5日(2014.9.5)	(74) 代理人	100112874 弁理士 渡邊 薫
申請有り		(72) 発明者	小林 達彦 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
		(72) 発明者	橋本 義輝 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
		Fターム(参考)	4B024 AA20 BA07 CA02 DA05 EA04 FA02 GA14 4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 4B065 AA44Y AA45X AA45Y AB01 AC14 BA02 BB40 CA24

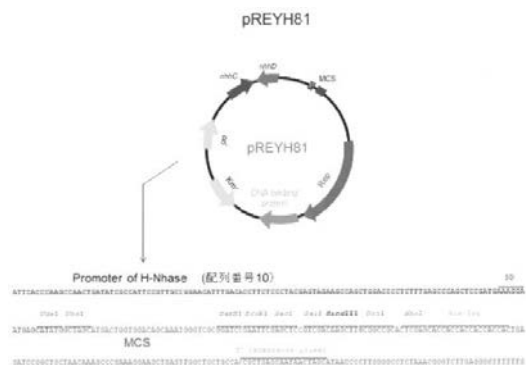
(54) 【発明の名称】 ロドコッカス属微生物用構成型発現ベクター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 H - N H a s e 代謝能力を保持しないロドコッカス属微生物でも、誘導剤を添加しない条件下で目的タンパク質を発現することを可能にするベクターの提供。

【解決手段】 以下の (a) ~ (c) のいずれかの DNA を含むベクター。(a) 特定の塩基配列からなる DNA (b) 特定の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得る DNA (c) 特定の塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得る DNA

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (c) のいずれかの DNA を含むベクター。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得る DNA

(c) 配列番号 1 に示される塩基配列に対して、90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得る DNA

10

【請求項 2】

受領番号が N I T E A P - 0 1 9 2 8 であるベクター。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のベクターによりロドコッカス属微生物を形質転換した形質転換体。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の形質転換体を、誘導剤を含まない培地で培養し、得られる培養物から目的タンパク質を採取することを含む、目的タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、ロドコッカス属微生物用構成型発現ベクターに関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、ニトリル代謝酵素遺伝子プロモーターを用いた、ロドコッカス属微生物用誘導型発現ベクターが構築されている。このベクターは、ロドコッカス属微生物を宿主とし、培養時にイソバレロニトリルや γ -カプロラクタム等の誘導剤を添加してタンパク質を異種発現させることができるものである (特許文献 1)。

【0003】

しかし、ニトリル代謝酵素遺伝子プロモーターを用いて、ロドコッカス属微生物を宿主とし、培養時に誘導剤を添加せずタンパク質を発現させるベクターの報告例は未だ無い。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2006 - 180843 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

そこで、本発明は、H - N H a s e 代謝能力を保持しないロドコッカス属微生物でも、誘導剤を添加しない条件下で目的タンパク質を発現することを可能にするベクターを提供することを主目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、ロドコッカス属微生物由来のニトリル代謝酵素遺伝子クラスターを、ニトリル代謝能力を保持しない他のロドコッカス属微生物に導入すると、誘導剤無添加条件でも目的タンパク質が発現することから、ニトリル代謝酵素遺伝子クラスターにマルチクローニングサイトを付与し、大腸菌とロドコッカス属微生物で複製可能なシャトルベクターに連結することで、本発明を完成するに至った。

【0007】

50

すなわち、本発明は、

- (a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA、
 - (b) 配列番号 1 に示される塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得る DNA、又は
 - (c) 配列番号 1 に示される塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得る DNA
- を含むベクターである。

【0008】

あるいは、本発明は、受領番号が N I T E A P - 0 1 9 2 8 であるベクターである。

【0009】

また、本発明は、上記 (a) ~ (c) のいずれかの DNA を含むベクターにより、ロドコッカス属微生物を形質転換した形質転換体である。

【0010】

また、本発明は、上記形質転換体を、誘導剤を含まない培地で培養し、得られる培養物から目的タンパク質を採取することを含む、目的タンパク質の製造方法を提供する。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、ロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せず目的タンパク質を発現させることができる。なお、ここに記載された効果は、必ずしも限定されるものではなく、本明細書中に記載されたいずれかの効果であってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】プラスミド p U C - R h o d o C o n s t の構築を示す図である。

【図 2】プラスミド p R E H S G 2 9 8 N B S 及びベクター p R E Y H 8 1 の構築を示す図である。

【図 3】ベクター p R E Y H 8 1 を示す図である。

【図 4】ベクター p R E Y H 8 1 へのレポーター遺伝子の挿入とロドコッカス属微生物への形質転換を示す図である。

【図 5】ベクター p R E Y H 8 1 により発現されたタンパク質の電気泳動を示す図である。

【図 6】ベクター p R E Y H 8 1 により発現されたタンパク質の電気泳動を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

(1) ベクター (p R E Y H 8 1) に含まれる DNA

以下、本発明に係るベクターを p R E Y H 8 1 と称することがある。

本発明のベクターは、代表的には、配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA を含む。

配列番号 1 に示される塩基配列は、プラスミド p H J K 1 9 と p H J K 2 0 に共通する、H - N H a s e の構成的発現に關与する領域を改変した DNA 配列である。H - N H a s e の構成的発現に關与する領域とは、プラスミド p H J K 1 9 の S c a I - S t u I 間で、N c o I - S a l I 間を欠失した領域である。

【0014】

配列番号 1 に示される塩基配列は、以下に示す部位を含む。

15bp/homology/pREHSG298dNBS(XhoI)misc_feature	1..15
mutation for Stulsitemisc_feature	18..19
nhhC	misc_feature
mutation for SacIdeletionmisc_feature	437..1522
	544..544

10

20

30

40

50

mutation for SalIdeletionmisc_feature	694..694
mutation for EcoRIdeletionmisc_feature	913..913
mutation for XhoIdeletionmisc_feature	1417..1417
nhdD misc_feature	1573..2019
mutation for NdeI site misc_feature	3719..3719
mutation for NdeI site misc_feature	3721..3721
MCS derived from pET-24a(+)-misc_feature	3722..3935
mutation for StuI site misc_feature	4229..4230
mutation for StuI site misc_feature	4233..4234
15bp/homology/pRHSG298dNBS(EcoRI)-misc_feature	4235..4249

10

【0015】

また、本発明のベクターは、配列番号1に示される塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得るDNAを含んでもよい。

【0016】

ここで、「1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列」とは、例えば、特定の塩基配列の1～5個、好ましくは3個、より好ましくは2個のDNAが欠失してもよく、特定の塩基配列の1～5個、好ましくは3個、より好ましくは2個のDNAが他のDNAに置換してもよく、あるいは特定の塩基配列に1～5個、好ましくは3個、より好ましくは2個のDNAが付加してもよいことを意味する。

20

【0017】

また、本発明のベクターは、配列番号1に示される塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつロドコッカス属微生物を宿主として培養時に誘導剤を添加せずに目的タンパク質を発現させ得るDNAを含んでもよい。

【0018】

ここで、「塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列」の「同一性」は、90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上である。

【0019】

更に、本発明のベクターには、目的タンパク質をコードするDNAが含まれていてもよい。当該DNAは、本発明のベクター中に存在するMCSに挿入することができる。本発明において、目的タンパク質は、特に限定されるものではなく、酵素、ホルモン、サイトカイン、調節タンパク質などを任意に挙げることができる。

30

【0020】

(2) ベクター(pREYH81)の構築

本発明のベクターpREYH81の構築方法を以下に述べる。なお、ベクターpREYH81は、平成26(2014)年9月4日付けで、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託されたものである(受領番号: NITE AP-01928)。

40

【0021】

ニトリル代謝能力を保持しないロドコッカス属微生物内では、誘導剤を添加しない条件でもH-NHaseを著量に発現し(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(9), 4267-4272(1996)参照)、ニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミドpHJK19(特開2005-151999号公報参照)とプラスミドpHJK20(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(9), 4267-4272(1996)参照)はともに、誘導剤を添加しない条件下で、H-NHaseを過剰発現する。このことから、プラスミドpHJK19とpHJK20とにおける、H-NHaseの構成的発現に関する領域は、これらプラスミドに共通に含まれる領域であることが示唆される。

50

そこで、その領域を遺伝子合成した改変型プロモーターDNA断片（配列番号1）を含むプラスミドpUC-RhodocConstを作製する（図1）。

【0022】

一方で、大腸菌とロドコッカスのシャトルベクターpREHSG298（特許文献1の段落番号[0051]及び図7参照）のNdeI、BamHI、SalIの各制限酵素サイトを破壊したプラスミドpREHSG298 NBSを作製する（図2）。

【0023】

次に、プラスミドpUC-RhodocConstをXbaIで切断した後に生じる、外側にpREHSG298 NBSと15bp一致するDNA配列を持つ改変型プロモーターDNA断片を含む断片と、pREHSG298 NBSをEcoRIとXhoIで切断した後に生じる大きいDNA断片とを連結し、pREYH81を構築する（図3）。

【0024】

本発明のベクターpREYH81は、EcoRI、XhoIで切断することが不可能であるため、当該ベクターのマルチクローニングサイト内にあるEcoRI、XhoIサイトがユニークサイトとなる。また、上記プラスミドpREHSG298 NBS構築時にNdeI、BamHI、SalIの遺伝子破壊を行っているため、これらの制限酵素サイトもユニークサイトとなる。

【0025】

(3) 形質転換体

本発明の形質転換体は、宿主を本発明のベクターで形質転換することで作製できる。宿主はロドコッカス属微生物である。形質転換を行うには、常法を用いればよく、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法を用いることができる。

【0026】

(3) 目的タンパク質の製造方法

本発明は、目的タンパク質の製造方法も提供することができる。すなわち、上記(3)の形質転換体を培養し、得られる培養物から目的タンパク質を採取することにより、目的タンパク質を製造することができる。形質転換体の培養方法は、宿主に用いるロドコッカス属微生物に適した方法を適宜選択すればよい。

【0027】

また、本発明において「培養物」とは、菌体、培養液、無細胞抽出液、細胞膜などの培養により得られるものを意味する。無細胞抽出液は、培養後の菌体を、例えばリン酸ナトリウム緩衝液を加えてホモジナイザーなどで物理的に破碎した後、遠心（例えば15,000rpm, 10min, 4℃）し、破碎できない菌体（細胞）が存在しないように上清を回収して得ることができる。細胞膜は、上記遠心で得られたペレットを溶解バッファーで懸濁することにより得ることができる。

【0028】

目的タンパク質は、培養物をそのまま用いてもよいし、透析や硫酸沈殿などの公知の方法、電気泳動、あるいはゲルろ過、イオン交換、アフィニティー等の各種クロマトグラフィーなどの公知の方法を単独又は適宜組み合わせることによって、濃縮、精製したものを

【実施例1】

【0029】

以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。なお、以下に説明する実施例は、本発明の代表的な実施例の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【0030】

<ベクターpREYH81の構築>

(1) プラスミドpUC-RhodocConstの構築

プラスミドpHJK19のScaI-StuI間で、NcoI-SalI間を欠失した

10

20

30

40

50

領域を遺伝子合成した改変型プロモーターDNA断片（配列番号1）を含むプラスミド pUC-RhodocConst を作製した（図1参照）。

その遺伝子合成の際に、以下の変更を追加した。

(i) 当該領域に含まれる SacI（配列番号1の544番目）、SalI（配列番号1の694番目）、EcoRI（配列番号1の913番目）、XhoI制限酵素サイト（配列番号1の1417番目）をNhhCのアミノ酸配列を変更せずに、かつ各制限酵素サイトを保持しなくなるようにDNA配列を変更した。

(ii) nhhBAG（H-NHase及びその翻訳後修飾に関わるNhhGをコードする）をpET24a（+）のマルチクローニングサイトに変更（配列番号1の3722-3935番目）した。

(iii) マルチクローニングサイトの最初の配列（配列番号1の3722-3724番目）がNdeIサイトの一部になるように、すぐ上流のDNA配列を変更した（配列番号1の3719番目と3721番目）。

(iv) 改変型プロモーターDNA断片の末端の制限酵素サイト（pHJK19のScaI及びStuI部分）をStuIサイトに変更した。（配列番号1の16-21番目と4229-4234番目）

(v) 改変型プロモーターDNA断片の末端の更に外側にpREHSG298 NBSと15bp一致するDNA配列をそれぞれ付与した（配列番号1の1-15番目：pREHSG298 NBSのXhoIサイト周辺）（配列番号1の4235-4249番目：pREHSG298 NBSのXhoIサイト周辺）。

(vi) 外側にpREHSG298 NBSと15bp一致するDNA配列を持つ改変型プロモーターDNAをpUC-RhodocConstから切り出せるように、両末端にXbaIサイトを配置した（配列番号1の5'側端と3'側端に、それぞれ塩基配列TC TAGAを配置）。このXbaIサイトは、最終的に、ベクターpREYH81を構築する段階で欠失する。

従って、改変型プロモーターDNA内にはXbaIサイトは存在しないので、改変型プロモーターDNA全体を本酵素で切り出せる。

【0031】

(2) プラスミドpREHSG298 NBSの構築

大腸菌とロドコカスのシャトルベクターpREHSG298（特許文献1の段落番号[0051]及び図7参照）のNdeI、BamHI、SalIの各制限酵素サイトを破壊したプラスミドpREHSG298 NBSを作製した（図2参照）。

各制限酵素の破壊方法は以下のとおりである。

NdeIサイトの破壊には、pREHSG298をNdeIで切断し、一般的な反応条件下でDNA polymerase反応を行い（KOD plus DNA polymeraseを使用）、切断後の1本鎖DNA部分を2本鎖にし、その後DNA ligaseにより両末端を連結することで当該プラスミドを作成した。

BamHI、SalIの破壊には、一般的な部位特異的変異法により、pREHSG298の複製に関わるタンパク質のアミノ酸配列を変更せずに、かつ各制限酵素サイトを破壊するようにプライマーを設計した。

【0032】

(3) ベクターpREYH81の構築

上記pUC-RhodocConstをXbaIで切断した後に生じる、外側に上記pREHSG298 NBSと15bp一致するDNA配列を持つ改変型プロモーターDNA断片を含む断片と、上記pREHSG298 NBSをEcoRIとXhoIで切断した後に生じる大きいDNA断片とを、ギブソンアセンブリ法（タカラバイオ社のキットIn-Fusion（登録商標）又はLife Technologies社のキットGeneArt（登録商標）を使用）により連結し、ベクターpREYH81を構築した（図3参照）。

【0033】

10

20

30

40

50

ベクター pREYH81 は、連結部分が EcoRI でも XhoI でも切断することが不可能である。そのため、当該ベクターのマルチクロニングサイト内にある EcoRI、XhoI サイトがユニークサイトとなる。pREHSG298 NBS 構築時に NdeI、BamHI、SalI の遺伝子破壊を行っているため、これらの制限酵素サイトもユニークサイトとなる。当該ベクターのマルチクロニングサイトは pET24a(+) と一緒であり、NdeI、NheI、BamHI、EcoRI、SacI、SalI、NotI、XhoI がユニークサイトとして利用可能である。本プラスミドのマルチクロニングサイト内の NdeI サイトの ATG は nhhB 遺伝子の ATG と同じ位置になるように設計し、nhhB 遺伝子上流の SD 配列は変更していないため、NdeI サイトを使用して目的タンパク質遺伝子の ATG コドンから導入した場合には Nh h B (H - NHase のサブユニット) と同様の高発現が期待できる。pET24a(+) のマルチクロニングサイトに含まれる His タグ領域を持つため、本 His タグ領域にインフレームで目的タンパク質遺伝子を導入すれば、His タグ付与の目的タンパク質を発現可能である。更に、マルチクロニングサイト下流に T7 ターミネーター配列が存在するため、マルチクロニングサイト内に目的タンパク質遺伝子が導入できたかどうかを確認 (コロニー PCR) したり、導入した目的タンパク質遺伝子の塩基配列を決定する際に、T7 ターミネータープライマーが使用可能である。

10

【実施例 2】

【0034】

<ベクター pREYH81 を利用したタンパク質発現>

20

(1) ベクター pREYH81 の機能解析

構築した pREYH81 に Rhodococcus rhodocrous J1 菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子 (nhhBAG)、Rhodococcus rhodocrous J1 菌由来のニトリラーゼ遺伝子 (nitA)、Pseudomonas putida 由来のカテコール 2, 3 ジオキシゲナーゼ遺伝子 (xylE)、並びに Pseudomonas putida N19-2 株由来イソニトリルヒドラーゼ遺伝子 (inhA) をレポーター遺伝子として組み込み、Rhodococcus 属における発現を SDS-PAGE で確認することでその機能性の検討を行った (図 4 参照)。

【0035】

組み込みの方法としては、まず pREYH81 をマルチクロニングサイト内の NdeI と EcoRI で切断した後に生じる大きい DNA 断片をベクターとして用いた。一方で、レポーター遺伝子を DNA polymerase 反応 (KOD plus NEO DNA polymerase を使用) で増幅し、インサート断片を得た。DNA polymerase 反応の条件は解離 94°C (10 秒)、アニーリング 合成 68°C (60 秒) を 1 サイクルとし、計 30 サイクル行った。このとき使用したプライマー配列を以下に示す。得られたベクターとインサートを Gene Art (登録商標) (Life Technologies 社のプロトコルに従った) で連結し、大腸菌 TOP10 を宿主として形質転換した。得られた形質転換体を、カナマイシン (50 µg/ml) を含む 5 ml の 2YT 培地 (ポリペプトン 1.6%、酵母エキス 1%、NaCl 0.5%) に植菌し 37 °C で一晩振とう培養した。培養後、遠心分離によって集菌した菌体より MagExtractor-Plasmid を用いてプラスミド抽出 (TOYOBO 社のプロトコルに従った) し、シークエンス (ファスマックに委託) によって目的のプラスミドが構築されたことを確認した。

30

40

【0036】

レポーター遺伝子増幅に用いたプライマーは以下のとおり (配列番号 2 ~ 9) である。

【0037】

inhA-S (配列番号 2)

gatgaaaggaatgagcatATGGCGTTGCAGATCGGTTTTCTGTTGTTTCCC

【0038】

50

inhA - AS (配列番号3)

ttgtcgcacggagctcgaattcTCAGCGCAGATTGAGCTTC
GCCG CAG

【0039】

nitA - S (配列番号4)

gatgaaagggaatgagcatATGGTCGAATACACA AACACAT
TCAAAGTTGCTGCGG

【0040】

nitA - AS (配列番号5)

ttgtcgcacggagctcgaattcTCAGATGGAGGCTGTCTGCC
CGGTC

10

【0041】

nhhBAG - S (配列番号6)

gatgaaagggaatgagcatATGGATGGTATCCACGACACAG
GCGGC

【0042】

nhhBAG - AS (配列番号7)

ttgtcgcacggagctcgaattcTCAGTTCGATGATGGCCATC
GATTC CATGCG

20

【0043】

xy1E - S (配列番号8)

gatgaaagggaatgagcatATGAACA AAGGTGTAATGCGAC
CGGGCCATG

【0044】

xy1E - AS (配列番号9)

ttgtcgcacggagctcgaattcTCAGGTCAGCACGGTTCATG
AATCGTTTCGTTG

【0045】

次に、pREYH81にそれぞれのレポーター遺伝子を連結したプラスミドを用いて *Rhodococcus fascians* DSM43985、*Rhodococcus erythropolis* PR4を宿主として、エレクトロポレーション法(2.5 kV, 25 μ F, 400)により形質転換を行った。得られた形質転換体を、以下の表1に示す抗生物質を含む10mlの2YT培地(ポリペプトン1.6%、酵母エキス1%、NaCl0.5%)に植菌し、28 で3日間振とう培養した。培養後、遠心分離によって集菌し、リン酸カリウム緩衝液を加え、超音波破碎で菌体を破碎した。破碎液を遠心し、回収した上清(無細胞抽出液)を用いてSDS-PAGEを行い、レポータータンパク質の発現を確認した。更に、同様の方法を用いて、pREYH81にxy1Eを連結したプラスミドを *Rhodococcus rhodocrous* ATCC12674並びに *Rhodococcus percolates* NBRC100626に導入し、発現を確認した。SDS-PAGEの結果を図5及び図6に示す。

30

40

【表 1】

培養液に添加した抗生物質の種類と濃度	
<i>R. fascians</i> DSM43985	カナマイシン 50 $\mu\text{g/ml}$
<i>R. erythropolis</i> PR4	カナマイシン 200 $\mu\text{g/ml}$
<i>R. rhodochrous</i> ATCC12674	ネオマイシン 50 $\mu\text{g/ml}$
<i>R. percolates</i> NBRC100626	カナマイシン 50 $\mu\text{g/ml}$

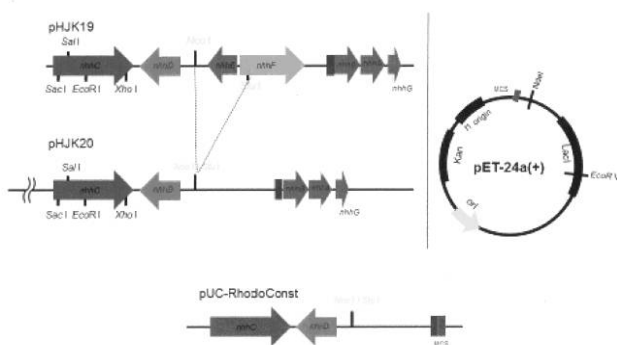
10

【0046】

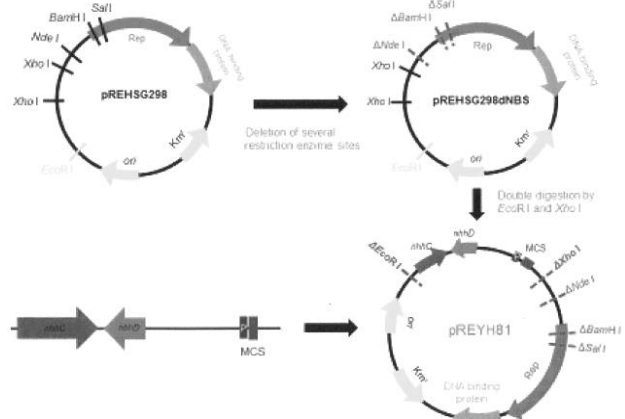
図5において、矢印で示したバンドがレポータータンパク質であり、本発明のベクターを用いることで、誘導剤を培地に添加せずにタンパク質を発現することが確認された。

また、図6のXy1Eのレーンにおいて、分子量マーカの30kDaから45kDaの間にある太いバンドがレポータータンパク質であり、本発明のベクターを用いることで、誘導剤を培地に添加せずにタンパク質を発現することが確認された。

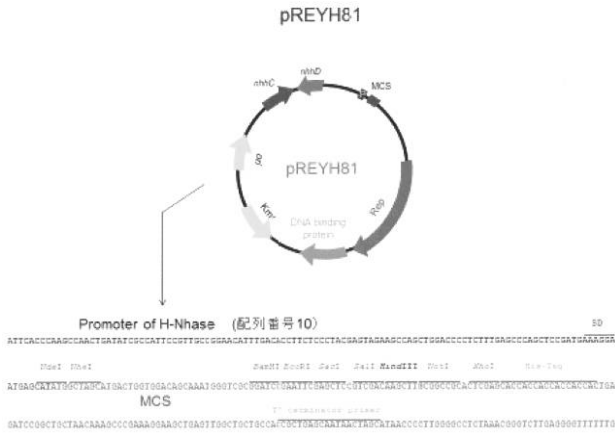
【図 1】

Construction of expression system based on H-NHase gene regulation mechanism for *Rhodococcus*

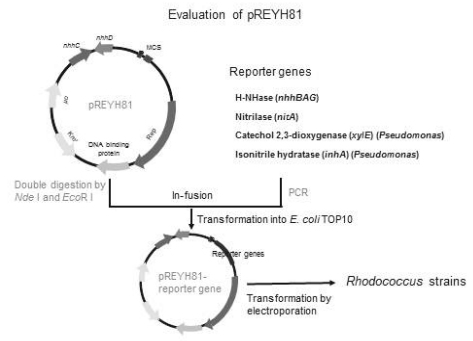
【図 2】

Construction of expression system based on H-NHase gene regulation mechanism for *Rhodococcus*

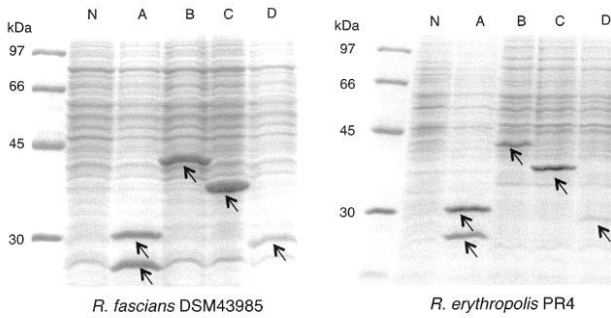
【 図 3 】



【 図 4 】

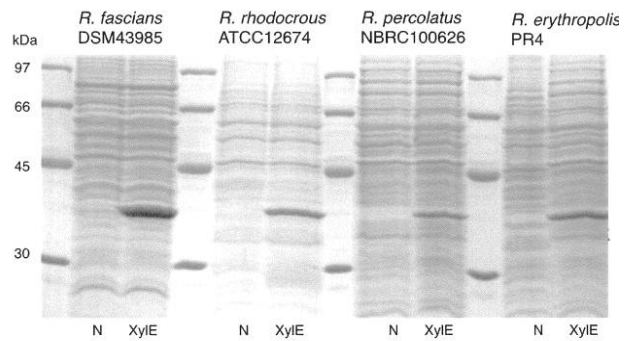


【 図 5 】



- N: pREYH81 (control)
- A: H-Nhase
- B: Nitrilase
- C: Catechol 2,3-dioxygenase

【 図 6 】



【配列表】

2016054652000001.app