

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 975**

51 Int. Cl.:

C07C 227/18 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2014** **PCT/EP2014/068612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15032751**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2014** **E 14765893 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3041820**

54 Título: **Genes y proteínas de biosíntesis de [S,S]-EDDS y método para la biosíntesis de [S,S]-EDDS**

30 Prioridad:

03.09.2013 DE 102013217543

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.03.2020

73 Titular/es:

STEGMANN, EFTHIMIA (25.0%)
Panoramastrasse 19
72108 Rottenburg/Wurmlingen, DE;
WOHLLEBEN, WOLFGANG (25.0%);
SPOHN, MARIUS (25.0%) y
WEBER, TILMAN (25.0%)

72 Inventor/es:

STEGMANN, EFTHIMIA;
WOHLLEBEN, WOLFGANG;
SPOHN, MARIUS y
WEBER, TILMAN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 745 975 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Genes y proteínas de biosíntesis de [S,S]-EDDS y método para la biosíntesis de [S,S]-EDDS

Campo de aplicación y estado de la técnica

5 [0001] La presente invención se refiere a ácidos nucleicos y proteínas o péptidos aislados para la biosíntesis de [S,S]-etilendiaminodisuccinato ([S,S]-EDDS), vectores de delección y de expresión, células huésped y mutantes de delección de la especie *Amycolatopsis japonicum*, método, así como un kit para la biosíntesis de [S,S]-EDDS.

10 [0002] El etilendiaminodisuccinato (EDDS, también denominado ácido etilendiaminodisuccínico) es un agente quelante hexadentado. El EDDS posee dos estereocentros y ocurre de manera correspondiente en tres estereoisómeros diferentes, es decir, [R,R]-EDDS, [S,S]-EDDS y [R,S]-(*meso*)-EDDS. Se ha demostrado que exclusivamente el estereoisómero [S,S]-EDDS se puede degradar de forma completamente biológica (Schowanek et al., Chemosphere (1997), 34(11): 2375-91).

15 [0003] El EDDS es además un isómero estructural del etilendiaminotetraacetato (EDTA), un agente quelante hexadentado también ampliamente extendido. Ambos compuestos son muy similares en cuanto a sus características químicas, particularmente en cuanto a su capacidad para la formación de complejos de iones metálicos. Así, el EDDS y el EDTA presentan para una serie entera de iones metálicos constantes de formación de complejos comparables.

20 [0004] El EDTA se usa ya desde hace muchos decenios a causa de su marcada capacidad para la formación de complejos en los ámbitos más variados para la eliminación de iones metálicos y actualmente es el agente complejante más frecuentemente utilizado. Forma complejos especialmente estables con iones de cobre (II), de níquel (II), de hierro (III) y de cobalto (II), pero también con iones de metales pesados, así como con iones de calcio y de magnesio.

25 [0005] El EDTA se añade por lo tanto particularmente como ablandador del agua a detergentes, sirve para la estabilización de blanqueadores en el ámbito de la industria papelera y textil y se utiliza como fertilizante en forma de sus complejos de hierro, de cobre y de zinc. Además, el EDTA se utiliza en el ámbito de la medicina para el tratamiento de intoxicaciones por metales pesados.

[0006] Una desventaja es que el EDTA no es degradable de forma biológica y por lo tanto puede detectarse entretanto ubicuamente en aguas. Se clasifica por eso como ecológicamente peligroso, dado que puede liberar metales pesados de sedimentos y de este modo hacerlos biodisponibles.

30 [0007] Ante estos antecedentes es deseable sustituir el EDTA, en términos de una política sobre sustancias químicas sostenible, por compuestos equivalentes pero biodegradables.

[0008] El EDDS en forma del estereoisómero biodegradable [S,S]-EDDS representa un sustituto fundamentalmente apropiado a causa de las constantes de formación de complejos comparables al EDTA.

35 [0009] Se conoce la síntesis química del [S,S]-EDDS partiendo de ácido L-aspartico y 1,2-dibromoetano en presencia de cobalto trivalente (Neal and Rose, Inorganic Chemistry (1968), 7(11): 2405-12). A este respecto es una desventaja el ácido bromhídrico producido como subproducto tóxico, que debe eliminarse de modo costoso. Además, la síntesis se realiza utilizando reactivos fósiles.

40 [0010] Además se conoce un método químico no enantioselectivo, donde se hace reaccionar ácido maleico o anhídrido maleico con etilendiamina, donde se obtienen además de *meso*-EDDS al 50 % [R,R]-EDDS y [S,S]-EDDS como mezcla racémica. A causa de solo un bajo rendimiento de [S,S]-EDDS y la separación del racemato fundamentalmente muy costosa, este método es sin embargo generalmente inadecuado para una aplicación industrial.

45 [0011] Se conoce un método para la fabricación biocatalizada de [S,S]-EDDS de la EP 0 731 171 A2. Mediante el método allí descrito puede obtenerse [S,S]-EDDS a partir de ácido fumárico y etilendiamina bajo influencia de microorganismos con actividad liasa con una pureza óptica de hasta un 97%. Se conoce otro método biocatalizado para la fabricación de [S,S]-EDDS de la EP 1 043 400 A1, donde puede obtenerse [S,S]-EDDS partiendo de ácido maleico y etilendiamina en presencia de microorganismos con actividad malatoisomerasa y iones metálicos con una pureza óptica de hasta un 98%. Ambos métodos biocatalizados se basan sin embargo en el uso de precursores sintéticos que no pueden proporcionar los propios microorganismos utilizados.

[0012] Además se conoce la biosíntesis de [S,S]-EDDS mediante la especie bacteriana *Amycolatopsis japonicum* (Zwicker et al., Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1997); 19(4): 280-285). Sin embargo, a este respecto es una desventaja que la biosíntesis esté sujeta a una dependencia del zinc y ya una concentración de zinc de 2 µM puede provocar en el medio de cultivo una interrupción casi completa de la síntesis de [S,S]-EDDS (Cebulla I., Dissertation (1995), Universidad de Tübingen).

[0013] Además se conoce el desarrollo de un sistema de clonación génica para *Amycolatopsis japonicum* (Stegmann et al.: "Development of three different gene cloning systems for genetic investigation of the new species *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17, the ethylenediaminedisuccinic acid producer", Journal of Biotechnology 92 (2001) 195-204).

[0014] Además se conoce que la cepa de los actinomicetos MG417-CF17 es *Amycolatopsis japonicum* y que esta cepa es capaz de producir [S,S]-EDDS (Goodfellow et al.: "Amycolatopsis japonicum sp. nov., an Actinomycete Producing (S,S)-N,N'-Ethylenediaminedisuccinic Acid", System. Appl. Microbiol. 20, 78-84 (1997)).

[0015] Además se conoce la producción de [S,S]-EDDS partiendo de etilendiamina y ácido fumárico utilizando cepas microbianas diversas (Takahashi et al.: "Production of (S,S)-Ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid from Ethylenediamine and Fumaric Acid by Bacteria", Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (7), 1269-1273, 1999).

[0016] Además se conoce el desarrollo de un *plug-in* de Cytoscape para el análisis de datos de secuenciación de alto rendimiento de genomas microbianos (Tang et al.: "ContigScape: a Cytoscape plugin facilitating microbial genome gap closing", BMC Genomics 2013, 14:289).

[0017] Además se conoce la secuencia de una proteína reguladora de la captación de hierro (n.º de acceso de UNIPROT del EBI: R4SX04).

[0018] Se describe un método bajo condiciones de reacción sin zinc para la producción de [S,S]-EDDS mediante *Amycolatopsis japonicum* utilizando un medio de cultivo optimizado en WO 96/36725 A1.

[0019] Particularmente problemático en los métodos de biosíntesis genéricos para [S,S]-EDDS es el hecho de que una aplicación de las síntesis a mayor escala resulta difícil o no rentable a causa de la dependencia del zinc y el bajo rendimiento ligado a la misma. Por lo tanto, generar un entorno sin zinc en medios de cultivo, así como en fermentadores está asociado con costes considerables o es casi imposible.

Objetivo y solución

[0020] Ante estos antecedentes es por lo tanto un objetivo de la invención proporcionar proteínas o péptidos, ácidos nucleicos, grupos de genes, vectores, células huésped, células bacterianas, así como método y un kit para la biosíntesis de [S,S]-EDDS.

[0021] Este objetivo se consigue mediante una proteína o un péptido según la reivindicación 1, mediante un ácido nucleico según la reivindicación 2, mediante un grupo de genes con las características de la reivindicación 4, mediante la utilización de una proteína o un péptido según la reivindicación 5, mediante un vector según la reivindicación 6, mediante una célula huésped con las características de la reivindicación 7, mediante un método con las características de la reivindicación 8, así como mediante un kit con las características de la reivindicación 9. Se describen formas de realización preferidas en las reivindicaciones dependientes. La redacción de todas las reivindicaciones se hace por la presente por referencia explícita al contenido de esta descripción.

[0022] Los inventores han logrado por primera vez, en el ejemplo de *Amycolatopsis japonicum*, identificar y proporcionar genes y proteínas responsables de la biosíntesis de [S,S]-etilendiaminodisuccinato, en lo sucesivo denominado [S,S]-EDDS.

[0023] Además, los inventores han logrado por primera vez aclarar el mecanismo de la dependencia del zinc subyacente a esta biosíntesis.

[0024] Por la presente es posible con particular ventaja una producción de [S,S]-EDDS más económica y más eficiente frente a métodos genéricos, particularmente con mayores rendimientos y mayor pureza. Los objetos de la invención descritos en lo sucesivo forman el fundamento para ello.

[0025] En un primer aspecto, la invención se refiere a una proteína o un péptido aislado, que es funcional preferiblemente para un paso de síntesis parcial de la biosíntesis de [S,S]-EDDS, es decir, permite la realización de un tal paso de síntesis parcial.

5 [0026] La expresión "biosíntesis" define en términos de la presente invención no solo una síntesis intracelular de [S,S]-EDDS, sino que comprende también la captación en una célula así como la descarga fuera de una célula (transporte a través de una membrana celular).

[0027] La expresión "proteína" puede, en términos de la presente invención, significar no solo una única proteína o péptido según la invención, sino también una combinación de varias proteínas o péptidos diferentes según la invención.

10 [0028] Una proteína o un péptido según la invención puede producirse químicamente o por recombinación, es decir, mediante biotecnología.

15 [0029] Alternativamente, una proteína o un péptido según la invención puede provenir de una bacteria, particularmente de una bacteria grampositiva, preferiblemente de una bacteria del género *Amycolatopsis*, de manera particularmente preferida de una bacteria de la especie *Amycolatopsis japonicum* o tomarse de una tal bacteria.

[0030] La proteína o péptido contiene o consiste en una secuencia aminoacídica, que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 53.

20 [0031] Preferiblemente, una proteína o un péptido según la invención, que contiene una de las secuencias aminoacídicas especificadas a continuación o consiste en una secuencia tal, presenta la actividad asignada respectivamente:

- SEQ ID NO 39 actividad N-acetiltransferasa,
- SEQ ID NO 41 actividad cisteína dioxigenasa (EC 1.13.11.20),
- SEQ ID NO 43 actividad reguladora de la transcripción de tipo HTH,
- 25 - SEQ ID NO 45 actividad amidasa (EC 3.5.1.4),
- SEQ ID NO 47 actividad ornitina cicloamidasa (EC 1.4.1.12),
- SEQ ID NO 49 actividad diaminopimelato descarboxilasa (EC 4.1.1.20),
- SEQ ID NO 51 actividad cistationina β -sintasa (EC 4.2.1.22),
- SEQ ID NO 53 actividad de proteína transportadora.

30 [0032] La proteína o péptido que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 53 es responsable particularmente del transporte de [S,S]-EDDS o el complejo de [S,S]-EDDS-zinc fuera de una célula y/o en una célula o al menos está implicado en este transporte.

35 [0033] La invención se refiere además a un ácido nucleico aislado, que codifica preferiblemente una proteína o un péptido, que es funcional para un paso de síntesis parcial de la biosíntesis de [S,S]-EDDS, es decir, permite la realización de un tal paso de síntesis parcial.

[0034] El ácido nucleico contiene o consiste en una secuencia aminoacídica, que se selecciona del grupo consistente en

- a) secuencia aminoacídica, codificante de una proteína o un péptido, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica, que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 53 y
- 40 b) secuencia aminoacídica, que corresponde a la cadena complementaria de la secuencia aminoacídica según a).

45 [0035] La expresión "ácido nucleico" puede significar, en términos de la presente invención, no solo un único ácido nucleico según la invención, sino también una combinación de varios ácidos nucleicos diferentes según la invención.

[0036] Además la expresión "ácido nucleico" puede significar, en términos de la presente invención, un ADN o un ARN. Un ácido nucleico según la invención se puede seleccionar particularmente del grupo consistente en un gen o marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF), ADNc y ARNm.

[0037] Un ácido nucleico según la invención puede producirse químicamente o por recombinación, es decir, por ingeniería genética.

[0038] Alternativamente, un ácido nucleico según la invención puede provenir de una bacteria, particularmente de una bacteria grampositiva, preferiblemente de una bacteria del género *Amycolatopsis*, de manera particularmente preferida de una bacteria de la especie *Amycolatopsis japonicum*, o tomarse de una tal bacteria.

[0039] En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado, que codifica preferiblemente para una proteína o un péptido, que es funcional para un paso de síntesis parcial de la biosíntesis de [S,S]-EDDS, es decir, permite la realización de un tal paso de síntesis parcial, donde el ácido nucleico contiene una secuencia aminoacídica o consiste en una tal secuencia, que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52 y SEQ ID NO 54.

[0040] Las secuencias de ácido nucleico citadas arriba codifican preferiblemente como sigue:

- SEQ ID NO 40 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 39,
- SEQ ID NO 42 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 41,
- SEQ ID NO 44 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 43,
- SEQ ID NO 46 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 45,
- SEQ ID NO 48 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 47,
- SEQ ID NO 50 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 49,
- SEQ ID NO 52 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 51,
- SEQ ID NO 54 para una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 53.

[0041] El ácido nucleico contiene o consiste en una secuencia aminoacídica, que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52 y SEQ ID NO 54.

[0042] La invención comprende además un grupo de genes o un operón aislado, que preferiblemente es funcional para la biosíntesis de [S,S]-EDDS, es decir, permite la realización de una tal biosíntesis.

[0043] El operón mencionado arriba contiene generalmente además un promotor, así como particularmente uno u opcionalmente varios operadores.

[0044] El grupo de genes u operón contiene o consiste en al menos dos secuencias de ácido nucleico, que se seleccionan del grupo consistente en SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 54 y combinaciones de las mismas.

[0045] El grupo de genes u operón puede contener particularmente todas las secuencias de ácido nucleico citadas en el párrafo precedente o consistir en estas secuencias.

[0046] La denominación grupos de genes proviene del conocimiento de que las bacterias y muchos eucariotas aplican generalmente un mecanismo coordinado para la regulación de tales genes, cuyos productos (proteínas o péptidos) están implicados en procesos relacionados, por ejemplo, una biosíntesis. Los genes de este tipo se encuentran juntos en un único cromosoma en estructuras que se denominan grupos de genes, y pueden transcribirse juntos bajo control de una única secuencia reguladora o varias secuencias reguladoras. Sin embargo, un grupo de genes también puede contener fundamentalmente varios promotores y estar controlado también por varios reguladores. Un grupo de genes, un promotor y opcionalmente otras secuencias, que cooperan en la regulación, pueden denominarse también operón.

[0047] En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína o un péptido aislado, que es funcional para una inhibición o represión de la biosíntesis de [S,S]-EDDS, es decir, permite una tal inhibición o represión. Preferiblemente, la proteína o péptido es un inhibidor o represor de la transcripción para la biosíntesis de [S,S]-EDDS.

[0048] La proteína o péptido contiene o consiste en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61.

[0049] La proteína es preferiblemente una proteína reguladora de la captación de zinc, una proteína llamada Zur (*zinc uptake regulator*), es decir, una proteína que presenta actividad reguladora para la captación celular de zinc. En general, una proteína Zur es capaz de unirse a iones de zinc a partir de una concentración determinada y regular el equilibrio de zinc en una célula bacteriana mediante una represión génica o expresión génica dependiente de

zinc. Esta regulación de genes dependiente de zinc está mediada en muchas bacterias, en tanto una proteína Zur saturada de zinc, una llamada *holoproteína* Zur, se une a secuencias de ácido nucleico específicas antes de los genes diana correspondientes, de modo que se impide a la enzima polimerasa de ARN esencial para la transcripción de genes diana el acceso a los mismos. Se impide de este modo la transcripción de los genes diana.

5 Las secuencias de ácido nucleico específicas que funcionan como el sitio de unión de Zur son generalmente promotores/regiones promotoras u operadores.

[0050] Puesto que la regulación dependiente de zinc de la represión génica o expresión génica depende de la concentración de los iones de zinc en el interior celular y fuera de la célula, los sistemas de este tipo sirven particularmente también como sistemas indicadores para la determinación de la concentración de iones de zinc.

10 [0051] Sorprendentemente ahora los inventores han constatado en el ejemplo de *Amycolatopsis japonicum*, como se explicará todavía más en detalle en la parte de ejemplo, que los genes diana, que se reprimen en presencia de zinc mediante la proteína o péptido según la invención, que contiene o consistente en la secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61, son entre otros genes de biosíntesis para la producción de [S,S]-EDDS. Respecto a las

15 secuencias de ácido nucleico de los genes de biosíntesis mencionados se hace referencia a las secuencias citadas en la descripción precedente.

[0052] En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión artificial o recombinante, es decir, producido por ingeniería genética, es decir, un vehículo para la transmisión de al menos un ácido nucleico en una célula receptora o huésped, que expresa entonces en el marco de una expresión génica al menos una proteína o un péptido, para la que codifica el al menos un ácido nucleico.

20 [0053] El vector de expresión contiene al menos un ácido nucleico según la invención. Sin embargo, puede preferirse que el vector de expresión no contenga ningún ácido nucleico que contiene o consistente en la secuencia según la SEQ ID NO 62, o una secuencia homóloga a tal objeto.

[0054] Alternativamente, el vector de expresión puede contener un grupo de genes o un operón o un elemento integrador según la invención.

25 [0055] El vector de expresión puede ser fundamentalmente un plásmido o un cósmido. Preferiblemente, un plásmido o cósmido puede integrarse en el cromosoma de actinomicetos o existir como plásmido o cósmido replicativo en la célula y contiene un promotor constitutivo o inducible (regulable) correspondiente.

[0056] En una forma de realización preferida, el vector de expresión es un plásmido de la familia pRM, particularmente un plásmido del tipo pRM4, en el que se inserta el al menos un ácido nucleico según la invención

30 o el grupo de genes según la invención.

[0057] Según una forma de realización particularmente preferida, el vector de expresión contiene un promotor sin represión por zinc (*None-Zinc-Repressed Promotor*), es decir, un promotor que no está sujeto a ninguna regulación por zinc.

35 [0058] El promotor puede ser fundamentalmente un promotor constitutivo o inducible (regulable). Preferiblemente, el promotor es un promotor expresado fuertemente de manera constitutiva o inducible, que sustituye a un promotor diana Zur existente intracelular. En este caso se realiza la expresión de ácidos nucleicos o grupos de genes según la invención con particular ventaja bajo el control de un promotor independiente de zinc. El promotor no presenta particularmente ningún sitio de unión para una proteína según la invención según la SEQ ID NO 61. Un promotor preferido sin represión por zinc es, por ejemplo, el promotor ermE (promotor de genes de resistencia a eritromicina, PermE).

40

[0059] El vector de expresión contiene un ácido nucleico según la invención, donde el ácido nucleico contiene o consiste en una secuencia aminoacídica, que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 54 y combinaciones de las mismas.

45 [0060] Secuencias de ácido nucleico particularmente preferidas se pueden seleccionar del grupo consistente en SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 54 y combinaciones de las mismas.

[0061] El vector de expresión según la invención es apropiado tanto para la realización de una expresión homóloga como también para la realización de una expresión heteróloga.

[0062] Con respecto a otras características y ventajas del vector de expresión, particularmente de los ácidos nucleicos según la invención, así como del grupo de genes y del operón según la invención, se hace referencia completamente a la descripción precedente.

5 [0063] En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped artificial o recombinante, es decir, producida mediante biotecnología.

[0064] Preferiblemente, la célula huésped es una célula huésped productora de [S,S]-EDDS.

[0065] La célula huésped se caracteriza así porque contiene un vector de expresión según la invención. En combinación, la célula huésped puede contener un genoma que, debido a una inserción al menos parcial, particularmente completa, del vector (o genoma del vector), existe modificado.

10 [0066] En vista de una biosíntesis de [S,S]-EDDS se prefiere que no sea posible en la célula huésped ninguna represión por zinc.

15 [0067] De manera particularmente preferida, la célula huésped no contiene ningún ácido nucleico codificante de una proteína Zur, particularmente ningún ácido nucleico según la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 62 o un ácido nucleico homólogo a tal objeto, y/o ninguna proteína Zur, particularmente ninguna proteína o péptido según la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 61 o una proteína o un péptido homólogo a tal objeto.

[0068] La célula huésped puede ser fundamentalmente una célula eucariota o procariota.

[0069] Además la célula huésped puede ser una célula huésped homóloga o heteróloga.

[0070] La célula huésped se puede seleccionar particularmente del grupo consistente en células bacterianas, células de levadura y células fúngicas.

20 [0071] En una forma de realización adicional, la célula huésped es una bacteria grampositiva, preferiblemente una bacteria del género *Amycolatopsis* o *Streptomyces*, de manera particularmente preferida una bacteria de la especie *Amycolatopsis japonicum* o *Streptomyces coelicolor*.

[0072] En otra forma de realización, la célula huésped puede producirse o ser producible mediante transformación, transducción, transfección o conjugación, particularmente aplicando un vector de expresión según la invención.

25 [0073] Las técnicas citadas en el párrafo anterior para la introducción de ácidos nucleicos (exógenos), particularmente de ADN y ARN, en células eucariotas y procariotas se conocen fundamentalmente como tales por la persona experta. Se trata de procedimientos estándar de la genética molecular. Para una descripción más detallada se remite por lo tanto a literatura especializada pertinente (por ejemplo, Mülhardt C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics* (2008); editorial Spektrum, 6ª ed. o Kieser T. et al., *Practical Streptomyces Genetics* (2000); John Innes Foundation o Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012); Cold Spring Harbor Laboratory, 4ª ed.).

30

35 [0074] Con respecto a otras características y ventajas de la célula huésped, particularmente de los ácidos nucleicos según la invención, del grupo de genes y del operón según la invención, de las proteínas o de los péptidos según la invención, así como de los vectores de expresión según la invención, se hace referencia completamente a la descripción precedente.

[0075] Además se divulga una célula bacteriana artificial o recombinante, es decir, producida mediante biotecnología, y preferiblemente productora de [S,S]-EDDS, preferiblemente del género *Amycolatopsis*, particularmente de la especie *Amycolatopsis japonicum*.

40 [0076] La célula bacteriana se caracteriza porque no expresa ninguna proteína o péptido que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61 y/o no contiene ningún ácido nucleico que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62.

45 [0077] La célula bacteriana puede producirse o ser producible particularmente mediante una delección al menos parcial, preferiblemente completa, de un ácido nucleico que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62, del genoma, particularmente genoma silvestre, de la célula bacteriana. La delección puede ser en ese caso el resultado de una transformación, transducción, transfección o conjugación. En otras palabras,

la célula bacteriana puede ser preferiblemente un mutante de delección. Alternativamente a la delección mencionada en este párrafo entra en consideración también el intercambio de un par de bases, una mutación puntual y/o una inactivación a través de una inserción.

5 [0078] Además la célula bacteriana puede producirse o ser producible también a través de la inserción de un ácido nucleico, por ejemplo, en forma de un plásmido o un casete génico, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62, en el genoma, particularmente genoma silvestre, de una célula bacteriana.

[0079] Con respecto a otras características y ventajas de la célula bacteriana, particularmente del ácido nucleico mencionado en los párrafos anteriores, así como de la proteína o péptido mencionados en los párrafos anteriores, se hace referencia completamente a la descripción precedente.

10 [0080] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la biosíntesis de [S,S]-EDDS, que incluye los pasos:

- 15 a) cultivo de una célula huésped productora de [S,S]-EDDS según la invención o de una célula bacteriana recombinante del género *Amycolatopsis*, particularmente de *Amycolatopsis japonicum*, que no expresa ninguna proteína o péptido que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61, y/o no contiene ningún ácido nucleico que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62, y
- b) purificación de [S,S]-EDDS a partir de la célula y/o un medio de cultivo utilizado para la célula.

20 [0081] En una forma de realización preferida, la célula bacteriana se produce mediante la introducción de un vector de delección según la invención en la célula bacteriana, particularmente en un tipo silvestre de la célula bacteriana. La introducción del vector puede ocurrir mediante transformación, transducción, transfección o conjugación.

[0082] La célula huésped se produce según otra forma de realización mediante la introducción en la célula de un vector de expresión según la invención.

[0083] Preferiblemente, la célula huésped se produce mediante la introducción de un vector de expresión según la invención en una célula bacteriana del género *Amycolatopsis*, particularmente la especie *Amycolatopsis japonicum*.

25 [0084] En una forma de realización alternativa, la célula huésped se produce mediante la introducción de un vector de expresión según la invención en una célula bacteriana del género *Streptomyces*, particularmente la especie *Streptomyces coelicolor*.

[0085] El cultivo de las células empleadas en el marco de un método según la invención puede ocurrir aplicando protocolos estándar conocidos por la persona experta.

30 [0086] En función de la célula huésped o célula bacteriana utilizada puede ser ventajoso cultivar la célula huésped o bacteriana bajo condiciones sin zinc, particularmente sin sales de zinc.

35 [0087] Según la invención puede proveerse añadir al menos un compuesto precursor para la biosíntesis de [S,S]-EDDS a un medio de cultivo provisto para el cultivo. Ejemplos para compuestos precursores adecuados pueden ser fundamentalmente aminoácidos proteinógenos y/o no proteinógenos. Se pueden seleccionar compuestos precursores adecuados particularmente del grupo consistente en L-ornitina, L-serina, L-prolina, ácido 2,3-diaminopropiónico, L-aspartato, L-lisina y combinaciones de los mismos.

40 [0088] Además según la invención puede proveerse que antes de la purificación del [S,S]-EDDS se realice en primer lugar una determinación de la concentración del [S,S]-EDDS producido. Esto puede ocurrir, por ejemplo, mediante HPLC (*high performance liquid chromatography* o cromatografía líquida de alta resolución), espectroscopia UV/vis o mediante una combinación de ambas técnicas.

[0089] Para una purificación adicional de [S,S]-EDDS puede realizarse un paso en un separador para la separación de componentes (celulares) sólidos. A este le puede seguir un aislamiento de [S,S]-EDDS mediante adsorción de intercambio iónico con una cristalización subsiguiente del precipitado.

45 [0090] Métodos de este tipo se conocen como tales del estado de la técnica. No juega fundamentalmente ningún papel para la purificación si el [S,S]-EDDS existe de forma intracelular y, por ejemplo, todavía debe hacerse accesible mediante una lisis celular o si se segrega en el sobrenadante por el sistema de exportación.

[0091] Con respecto a otras características y ventajas del método, particularmente de los ácidos nucleicos según la invención, del grupo de genes y del operón según la invención, de las proteínas o de los péptidos según la invención, así como de los vectores según la invención, en particular vectores de delección y de expresión, se hace referencia completamente a la descripción precedente.

5 [0092] En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para la biosíntesis de [S,S]-EDDS que incluye al menos un componente que se selecciona del grupo consistente en al menos una proteína o un péptido según la invención, al menos un ácido nucleico según la invención, un grupo de genes o un operón según la invención, un vector según la invención (vector de expresión y/o de delección), una célula huésped según la invención y combinaciones de los mismos.

10 [0093] Opcionalmente, el kit puede comprender otro componente que se selecciona del grupo consistente en medio de cultivo, tampones y combinaciones de los mismos.

[0094] Con respecto a otras características y ventajas del kit, particularmente de los ácidos nucleicos según la invención, del grupo de genes y del operón según la invención, de las proteínas o de los péptidos según la invención, así como de los vectores según la invención, en particular vectores de delección y de expresión, se hace referencia también completamente a la descripción precedente.

15 [0095] Otras características y ventajas de la invención resultan evidentes de los ejemplos siguientes en relación con las figuras y reivindicaciones secundarias. La invención se explica más en detalle particularmente a través de la descripción de la identificación y anotación del grupo de genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS. En las formas de realización pueden realizarse características individuales de la invención solas o en combinación con otras características.

Descripción de las figuras

[0096]

25 La **figura 1** muestra esquemáticamente la vía de biosíntesis hipotética de [S,S]-EDDS. (A) Vía de biosíntesis de [S,S]-EDDS. (I) Provisión del precursor Dap; transformación de L-serina con L-ornitina como donador de grupos amino y PLP como cofactor liberando L-prolina. Dap reacciona con oxalacetato hasta IM1. (II) L-aspartato y L-serina reaccionan en presencia de PLP como cofactor hasta IM1. (B) Estructura química de la zwittermicina A (izquierda). La caja discontinua indica el módulo Dap. Vía de biosíntesis de Dap (derecha), cataliza por la acción conjunta concentrada de la zwittermicina A5A (ZWA5A, homólogo de la cisteína sintetasa) y la zwittermicina A5B (ZWA5B, homólogo de la ornitina ciclodeaminasa).

30 La **figura 2** muestra la vía de biosíntesis de [S,S]-EDDS con genes de biosíntesis asociados y el grupo de genes correspondiente. (A) Organización génica del grupo de genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS. N-acetiltransferasa (SEQ ID NO 40 (orf1658)), cisteína dioxigenasa (SEQ ID NO 42 (orf 1659)), regulador transcriptómico de tipo HTH (SEQ ID NO 44 (orf1660)), amidasa (SEQ ID NO 46 (orf1661)), ornitina ciclodeaminasa (SEQ ID NO 48 (orf1662)), diaminopimelato descarboxilasa (SEQ ID NO 50 (orf1663)), Dap sintasa (SEQ ID NO 52 (orf1664)) y transportador de eflujo de múltiples fármacos (SEQ ID NO 54 (orf1665)). (B) Provisión de los precursores de Dap mediante la transformación de L-serina con L-ornitina como donador de grupos amino y PLP como cofactor, catalizada mediante una acción concentrada de ornitina ciclodeaminasa y una Dap sintasa. (C) Composición de los compuestos precursores Dap y de dos oxalacetatos hasta [S,S]-EDDS. Las flechas están marcadas con los correspondientes genes del grupo de genes (A).

40 La **figura 3** muestra el patrón de transcripción dependiente de metales traza recuperado mediante PCR-RT del grupo de genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS en *A. japonicum*. Se utilizó sigB como gen constitutivo (*Housekeeping gene*) para normalizar el ARN. Se obtuvieron ARN de cultivos que se cultivaron en medio definido en ausencia de cualquier tipo de oligoelementos (-) o suplementado con soluciones de 25 µM de Fe²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ o Mn²⁺. Se tomaron muestras tras 10 h y 70 h de incubación.

45 La **figura 4** muestra el análisis de HPLC-UV/vis de los sobrenadantes de *A. japonicum* WT (tipo silvestre) y de un mutante *A. japonicum* Δorf1662-64 tras 72 h de cultivo en medio M7. (Arriba) Patrón de [S,S]-EDDS [350 mg/l]. (Centro) *A. japonicum* WT. (Abajo) *A. japonicum* Δorf1662-64. (Derecha) Espectros específicos UV/vis de [S,S]-EDDS.

50 La **figura 5** muestra el análisis de HPLC-UV/vis de los sobrenadantes de *S. coelicolor* WT y *S. coelicolor*-pTWPL1-EDDS tras 72 h de cultivo en medio M7. (Arriba) Patrón de [S,S]-EDDS [350 mg/l]. (Centro) *S. coelicolor* WT. (Abajo) *S. coelicolor*-pTWPL1-EDDS. (Derecha) Espectros UV/vis específicos de [S,S]-EDDS.

- La **figura 6** muestra la comparación de secuencias aminoacídicas de Zur de *S. coelicolor* (Zur_{SC}) y ORF5768 de *A. japonicum* (SEQ ID NO 62). (Arriba) Monómero de Zur_{SC}: dominio de unión a ADN_N (restos 1-77) no subrayado; *hinge loop* (restos 78-85) con subrayado continuo; dominio de dimerización_C (restos 86-139) con subrayado discontinuo. Los aminoácidos idénticos están marcados con un asterisco (*); los restos similares están marcados por un círculo (°). Sitios de unión de zinc: flecha: Zur_{SC}: D65, C79, H85, H87 y ORF5768: D70, C84, H89 y H91. Desviación de distancias aa relativas en un sitio M (caracterizado con una M). Sitio D (caracterizado con una D): Zur_{SC}: H84, H86, E105, H122 y ORF5768: H88, H90, E109, H126. Sitio C (caracterizado con una C): Zur_{SC}: C90, C93, C130, C133 y ORF5768: C94, C97, C134, H137.
- La **figura 7** muestra la comparación BLAST de ZnuABC de *S. coelicolor* y MntABC de *B. subtilis* con homólogos de *A. japonicum*. (A) Organización génica de znuABC de *S. coelicolor*, de las estructuras similares a operones orf3699, orf3700, orf3702 y orf6504, orf6505, orf6506 de *A. japonicum*. (B) Comparación de secuencias aminoacídicas, (arriba) ORF3699, ORF3700 y ORF3702 (abajo) ORF6504, ORF6505 y ORF6506 frente a ZnuABC de *S. coelicolor* (izquierda); frente a MntABC de *B. subtilis* (derecha). X/X = % identidad/similitud.
- La **figura 8** muestra el patrón de transcripción dependiente de metales traza obtenido mediante RT-PCR del sistema de captación de metales de *A. japonicum*. Como gen constitutivo se utilizó sigB para normalizar el ARN. Se obtuvieron ARN de cultivos que se cultivaron en medio M7 definido en ausencia de cualquier oligoelemento (-) o suplementado con soluciones de 25 µM de Fe²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ o Mn²⁺. Se tomaron muestras tras 10 h y 70 h de incubación. Se eligieron orf3700 y orf6504 como sondas para representar todas las estructuras de tipo operón.
- La **figura 9** muestra esquemáticamente las sondas de ADN de EMSA utilizadas. (Arriba) Locus del gen znuABC de *A. japonicum* (orf3699-orf3702). (Abajo) Grupo de genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS orf1658-orf1665 (corresponde a las SEQ ID NO 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54). Las regiones promotoras con sitios de unión de ZurAJ están marcadas con un círculo abierto y las sondas de EMSA que se utilizaron para comprobar la unión His-ORF5768 están representadas por una línea negra.
- La **figura 10** muestra los resultados de los ensayos EMS (geles de poliacrilamida tras la tinción con bromuro de etidio): unión dependiente de zinc de His₆-ORF5768 purificado a regiones promotoras. Dos casos de unión claros con diferente movilidad se denominaron CF (complejo móvil rápido) y CD (complejo móvil lento). Para la confirmación de la especificidad de los complejos de unión se añadió a la mezcla de unión un fragmento sigB-RT. Se incubó His₆-ORF5768 purificado a diferentes concentraciones con aproximadamente 35 nM de sonda de ADN en ausencia o en presencia de zinc (ZnSO₄). (A) Ensayo de unión con sonda de znuCB (compárese con la figura 9). Caso de unión representado por la banda CF. (B) Ensayo de unión con la sonda intergénica orf1661/62 (compárese con la figura 9). Dos casos de unión están representados por la banda CF o la banda CS respectivamente. (C) Ensayo de unión con sondas de promotor de orf1658 y mayores concentraciones de His-ORF5768 (compárese con la figura 9). (D) Ensayo de unión con la sonda de promotor de orf1659/60 intergénica (compárese con la figura 9). Caso de unión representado por la banda CS.
- La **figura 11** muestra una representación esquemática del vector de delección pGusA21Δorf5768. (Arriba) orf5768 (corresponde a la SEQ ID NO 62) y genes circundantes. (Abajo) pGusA21Δorf5768. barra izquierda: región flanqueante 5' de orf5768; barra derecha: región flanqueante 3' de orf5768.
- La **figura 12** muestra la verificación de la integración de pGusA21Δorf5768 en el genoma de *A. japonicum* tras una transformación directa. (A) Verificación por PCR de la integración de pGusA21Δorf5768. Perfil WT esperado: 1677 pb (orf5768-SCO-wt-Frag); perfil de pGusA21Δorf5768 integrado esperado: 1293 pb (orf5768-SCO-single Frag). WT: molde de ADN_g silvestre; P: molde pGusA21Δorf5768 aislado. (B) Búsqueda de clones de *A. japonicum* con pGusA21Δorf5768 perdido con ayuda del sistema reportero Gus. El genoma de las colonias azules dispone del plásmido pGusA21Δorf5768 integrado, mientras que las colonias no teñidas lo han perdido.
- La **figura 13** muestra el análisis de HPLC-UV/vis de los sobrenadantes de *A. japonicum* WT y *A. japonicum* Δzur (corresponde a la ΔSEQ ID NO 62) tras 72 h de cultivo en medio M7 con y sin adición de 6 µM de ZnSO₄. (Arriba) Patrón de [S,S]-EDDS [350 mg/l]. (2º y 3º desde arriba) *A. japonicum* WT -/+ 6 µM de ZnSO₄. (Abajo) *A. japonicum* Δzur -/+ 6 µM de ZnSO₄. (Derecha) Espectros UV/vis específicos de [S,S]-EDDS.
- La **figura 14** muestra esquemáticamente la construcción del vector pRM4-Perme*orf1662-65. (Arriba) Grupos de genes de [S,S]-EDDS orf1658-1665 (corresponde a la SEQ ID NO 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54). (Abajo) Representación del vector de expresión homólogo pRM4-Perme*orf1662-65 como mapa plasmídico (orf1662 a orf1665 bajo el control de Perme*). Barra gris: operón orf1662 a orf1665.
- La **figura 15** muestra el análisis de HPLC-UV/vis de los sobrenadantes de *A. japonicum* WT y *A. japonicum* + pRM4-Perme*orf1662-65 tras 72 h de cultivo en medio M7 con una adición de 6 µM de ZnSO₄. (Arriba) Patrón de [S,S]-

EDDS [350 mg/l]. (Centro) *A. japonicum* WT + 6 μ M de ZnSO₄. (Abajo) *A. japonicum* pRM4-PermE*orf1662-65 + 6 μ M de ZnSO₄. (Derecha) Espectros UV/vis específicos de [S,S]-EDDS.

La **figura 16** muestra el análisis de HPLC-UV/vis de los sobrenadantes de *S. coelicolor* + pTWPL1-EDDS tras 72 h de cultivo en medio M7 con una adición de 6 μ M de ZnSO₄. (Arriba) Patrón de [S,S]-EDDS [350 mg/l]. (Centro) *S. coelicolor* + pTWPL1-EDDS - 6 μ M de ZnSO₄. (Abajo) *S. coelicolor* + pTWPL1-EDDS + 6 μ M de ZnSO₄. (Derecha) Espectros UV/vis específicos de [S,S]-EDDS.

Parte de ejemplo

1. Aclaración de la biosíntesis de [S,S]-EDDS

[0097] El genoma de la especie bacteriana productora de [S,S]-EDDS *A. japonicum* se secuenció en el marco de la presente invención. El genoma de *A. japonicum* comprende aproximadamente 9,18 MB y comprende 8674 marcos de lectura abiertos predichos (*Open Reading Frames*, orf). De acuerdo con la herramienta *web* Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) para la rápida identificación, anotación y análisis de grupos de genes de biosíntesis para metabolitos secundarios (Medema et al., 2011, *Nucleic Acids Res* (2011); 39:14 y Blin et al., *Nucleic Acids Res* (2013); 1-9), el genoma de *A. japonicum* presenta 26 grupos de genes únicos para metabolitos secundarios. Estos grupos contienen el potencial biosintético para la producción de metabolitos secundarios derivado de seis NRPS (péptido sintetasas no ribosomales), seis PKS (policétido sintasa) tipo I, dos híbridos PKS tipo I/NRPS y un híbrido PKS tipo III/NRPS (para la producción de un glicopéptido) además de cuatro terpenos, una ectoína, un aminoglicósido y un lantibiótico.

[0098] Se postuló en primer lugar una vía de biosíntesis hipotética de [S,S]-EDDS (figura 1), según la cual el aminoácido no proteinógeno 2,3-L-diaminopropionato (Dap) podría ser un compuesto precursor putativo de [S,S]-EDDS. Dap es, entre otros, un metabolito secundario en la biosíntesis de viomicina por *Streptomyces vinaceus* y la biosíntesis de zwittermicina A por *Bacillus thuringiensis*. Ambas vías sintéticas están aclaradas (Thomas et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2003); 47(9): 2823-2830 y Zhao et al., *FEBS Lett.* (2008); 528(20): 3125-3131).

[0099] Para *B. thuringiensis* y *S. vinaceus* se mostró que Dap se proporciona específicamente para la biosíntesis de zwittermicina A o viomicina. Dap se forma tanto en la biosíntesis de zwittermicina A como también de viomicina a través de la transformación de L-serina con L-ornitina como donador de grupos amino (figura 1). Esta reacción se cataliza a través de la acción concentrada de una Dap sintasa (VioB/ZWA5A) y de una ornitina ciclodeaminasa (VioK/ZWA5B), donde se necesita fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor (Thomas et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2003); 47(9): 2823-2830 y Zhao et al., *FEBS Lett.* (2008); 528(20): 3125-3131).

[0100] Un cribado del genoma de *A. japonicum* utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, en la versión vigente en el momento de la solicitud) con las secuencias aminoacídicas de VioB/ZWA5A o VioK/ZWA5B mostró la presencia de proteínas homólogas que están codificadas por genes que están en proximidad directa uno respecto al otro. El ácido nucleico según la SEQ ID NO 52 codifica así una proteína con un tamaño de 352 aa y presenta un 32/45 %, 26/44 % de identidad/similitud aa con VioB o ZWA5A. La SEQ ID NO 48 codifica una proteína con un tamaño de 327 aa y presenta un 25/39%, 21/40 % de identidad/similitud aa para VioK o ZWA5B. La SEQ ID NO 50 intermedia se denomina diaminopimelato descarboxilasa y la SEQ ID NO 54, transportador de flujo de múltiples fármacos. Las SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52 y SEQ ID NO 54 presentan una configuración génica solapada y están codificadas supuestamente como unidad de transcripción (figura 2).

[0101] Las proteínas o péptidos según las SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 43 y SEQ ID NO 45 están codificadas aguas arriba del extremo 5' de los genes organizados de tipo operón citados previamente y se denominan N-acetiltransferasa, cisteína dioxigenasa, regulador transcriptómico del tipo HTH o amidasa (figura 2).

[0102] Partiendo de las homologías determinadas arriba se hicieron las siguientes suposiciones:

- Las proteínas o péptidos según las SEQ ID NO 47 y SEQ ID NO 51 catalizan en acción concertada la síntesis del precursor Dap como un primer paso de la biosíntesis de [S,S]-EDDS (figura 2).
- La condensación de Dap con oxalacetato para el compuesto intermedio IM1 está catalizada por una proteína o un péptido según la SEQ ID NO 39 (ácido nucleico según la SEQ ID NO 40: denominado N-acetil transferasa).
- La descarboxilación sucesiva está catalizada por una proteína o un péptido según la SEQ ID NO 49 (SEQ ID NO 48: denominada diaminopimelato descarboxilasa).
- La nueva acetilación con oxalacetato a su vez por una proteína o un péptido según la SEQ ID NO 39.

- La reducción final está catalizada por una proteína o un péptido según la SEQ ID NO 41 (SEQ ID NO 42: denominada cisteína dioxigenasa).
- A efectos de la secreción el [S,S]-EDDS debe pasar además a través de la membrana celular. Esta exportación está mediada por el transportador de eflujo de múltiples fármacos putativo según la SEQ ID NO 53 (figura 2).

[0103] Para demostrar que la región identificada para la biosíntesis de [S,S]-EDDS es en efecto responsable, se utilizó la represión por zinc de la biosíntesis de [S,S]-EDDS. Puesto que el [S,S]-EDDS se forma exclusivamente bajo condiciones esencialmente sin zinc (ya una concentración de 2 μ M de zinc provoca una interrupción casi completa de la síntesis de [S,S]-EDDS (Cebulla I., Dissertation (1995), Universidad de Tübingen)), se determinó el patrón de transcripción de los genes de biosíntesis putativos mediante RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*), con presencia de zinc y en ausencia de zinc (figura 3).

[0104] Los genes de síntesis de Dap putativos con las secuencias de ácido nucleico según la SEQ ID NO 48 y SEQ ID NO 52, la secuencia intermedia según la SEQ ID NO 50, así como la secuencia según la SEQ ID NO 54 se expresaron exclusivamente durante un cultivo en ausencia de zinc (formación de [S,S]-EDDS), sin embargo, no en presencia de zinc. No se pudo constatar la represión de estos genes mediante otros iones metálicos bivalentes. Los ácidos nucleicos según las SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44 y SEQ ID NO 46 presentan un patrón de transcripción común que no se ve afectado por el zinc (figura 3).

[0105] El operón así identificado de la síntesis putativa de [S,S]-EDDS (SEQ ID NO 48, 50, 52 y 54) presenta por lo tanto una transcripción dependiente de zinc.

[0106] Para la detección de una participación de los genes fuertemente influidos por el zinc según las SEQ ID NO 48, 50 y 52, en la síntesis de [S,S]-EDDS se produjo además un mutante con una delección en el marco de lectura (delección en marco) de las regiones codificantes de las SEQ ID NO 48, 50 y 52.

[0107] En total se produjeron 12 mutantes de *A. japonicum* (*A. japonicum* Δ SEQ ID NO 48, 50 y 52) con una delección en marco de las regiones codificantes de las SEQ ID NO 48, 50 y 52. *A. japonicum* del tipo silvestre (*A. japonicum* WT) y todos los mutantes producidos se cultivaron en medio de producción de EDDS (compárese con la tabla 1).

Tabla 1: medios de cultivo, tampones

Medio M7 (medio de producción de EDDS)	11,3 g glutamato de sodio 8,0 g fosfato monopotásico 12,0 g fosfato disódico 1 ml antiespumante 25,0 g glicerina 1,2 sulfato magnésico 60 mg citrato de hierro(III)t
Medio M3	20,0 g glicerina 20,0 g harina de soja pH 7,5
Medio M2	50,0 g glutamato de sodio 50,0 g sacarosa 50,0 g dextrano pH 7,2
Medio TBS (Bacto® Tryptic Soy Broth Soybean-Casein Digest Medium; Becton, Dickinson, Co.)	30,0 g TSB en polvo
Tampón de unión de EMSA	80 mM Tris/HCl (pH 7,8) 200 mM KCl 20% glicerol

[0108] Mientras que la cepa *A. japonicum* WT forma [S,S]-EDDS bajo las condiciones elegidas, los 12 mutantes ya no fueron capaces de sintetizar [S,S]-EDDS (figura 4).

[0109] Se pudo demostrar por lo tanto que en *A. japonicum* es necesaria la estructura de operón que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según las SEQ ID NO 48, 50 y 52 para la biosíntesis de [S,S]-EDDS.

5 [0110] Para demostrar que el grupo de genes identificado contiene toda la información genética necesaria para la biosíntesis de [S,S]-EDDS, se expresó heterológamente un cósmido en *S. coelicolor* que comprende el grupo de genes entero. Este cósmido (pTWPL1-EDDS) contiene los genes según las SEQ ID NO 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 y 58, así como partes según la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 60 (tabla 2).

Tabla 2: 30 genes previamente no descritos de *A. japonicum*

orf	SEQ ID NO	Función hipotética
1639	2	2-Isopropilmalato sintasa
1640	4	Proteína de la familia de la fumarilacetoacetato hidrolasa
1641	6	ARNt uridina-5-carboximetilaminometil enzima de modificación mnmG
1642	8	Fosfoglicolato fosfatasa
1643	10	Proteína hipotética
1644	12	Proteína hipotética
1645	14	Superfamilia de alcohol deshidrogenasas, con contenido de zinc; L-treonina-3-deshidrogenasa
1646	16	Proteína hipotética
1647	18	Regulador transcriptómico, familia de tipo padr
1648	20	Proteína hipotética
1649	22	Superfamilia MFS_1 de facilitadores principales
1650	24	Superfamilia MFS_1 de facilitadores principales
1651	26	Regulador transcriptómico HTH, arsr
1652	28	Proteína reguladora de la vía de biosíntesis de Bialaphos
1653	30	Furina (EC=3.4.21.75)
1654	32	Proteína hipotética
1655	34	Hélice-giro-hélice tipo 3
1656	36	Proteína hipotética
1657	38	Regulador transcriptómico bicomponente, familia LuxR
1658	40	N-acetiltransferasa
1659	42	Cisteína dioxigenasa
1660	44	Regulador transcriptómico tipo HTH
1661	46	Amidasa
1662	48	Ornitina ciclodeaminasa
1663	50	Diaminopimelato descarboxilasa
1664	52	Cistationina-beta-sintasa
1665	54	Proteína transportadora
1666	56	Proteína de esporulación
1667	58	Proteína reguladora de la captación de hierro
1668	60	Catalasa/peroxidasa [hasta el nt 1512]

[0111] La cepa *S. coelicolor* del tipo silvestre (*S. coelicolor* WT) y la cepa *S. coelicolor* con el cósmido pTWPL1 - EDDS (*S. coelicolor*-pTWPL1-EDDS) integrado en el genoma se cultivó en medio de producción de EDDS. Mientras que la cepa *S. coelicolor* WT no es capaz de producir, bajo las condiciones elegidas, [S,S]-EDDS, *S. coelicolor*-pTWPL1-EDDS produce cantidades detectables de [S,S]-EDDS en medio de producción de EDDS sin zinc (figura 5).

[0112] La formación de [S,S]-EDDS a través de *S. coelicolor*-pTWPL1-EDDS muestra que todas las enzimas necesarias para la biosíntesis de [S,S]-EDDS están codificadas en la región génica orf1640-1667 o SEQ ID NO 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 y 58.

2. Aclaración de la represión por zinc de la biosíntesis de [S,S]-EDDS

[0113] La familia Fur (*Ferric uptake regulator*) de las proteínas reguladoras de metal globales se nombra según el *Ferric Uptake Regulator*, Fur, de *E. coli* (Hantke K., Mol Gen Genet (1981); 182(2): 288-292 y Bagg & Neilands, Biochemistry (1987); 26: 5471-5477). Además de la Fur selectiva para el hierro hay una gran variedad de selectividad de metal y funciones biológicas dentro de la familia Fur. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, sensores para el zinc (Zur), manganeso (Mur) y níquel (Nur).

[0114] Las proteínas Fur son generalmente represores de la transcripción que se unen a secuencias de ADN de operador correspondientes, cuando están unidas con sus efectores de iones metálicos cognados (por ejemplo, la Fur unida a hierro se denomina *holoFur*), por lo cual se impide el acceso de la polimerasa de ARN, lo que lleva a una inhibición (represión) de la expresión de genes subordinados (situados aguas abajo) (Lee & Helmann, Nature (2006); 440 (7082): 363-367). Las proteínas sin metal (por ejemplo, apoFur) poseen fundamentalmente una afinidad pequeña o despreciable para la secuencia del operador correspondiente, lo que lleva a una desinhibición (desactivación de la represión) de los genes diana.

[0115] La capacidad de los miembros de la familia Fur para servir fisiológicamente como sensores para iones de Zn (II) se descubrió coincidente en las *B. subtilis* grampositivas con un contenido de GC bajo (Zur_{BS}) y las γ -proteobacterias *E. coli* (Zur_{EC}) (Gaballa & Helmann, J. Bacteriol. (1998); 180:5815-21 y Patzer & Hantke, MolMicrobiol (1998); 28: 1199-1210). A continuación, los análisis genómicos han permitido asignaciones preliminares de regulones de Zur probables en numerosas otras bacterias, lo que demuestra la extensión de una regulación de la captación de zinc mediada por Zur en el reino de las bacterias (Panina et al., Proc Natl Acad Sci U S A (2003 ago 19); 100(17): 9912-7). Mientras tanto se caracterizaron bioquímicamente además de Zur_{BS} y Zur_{EC} una multitud de proteínas Zur, como para las gramnegativas *Yersinia pestis* (Zur_{YP}), *Salmonella enterica* (Zur_{SE}) y *Xanthomonas campestris* (Zur_{XC}), las Firmicutes grampositivas con bajo contenido de GC *Staphylococcus aureus* (Zur_{SA}), *Streptococcus suis* (Zur_{SS}) y *Listeria monocytogenes* (Zur_{LM}) y actinobacterias grampositivas con alto contenido de GC *Mycobacterium tuberculosis* (Zur_{MT}), *Corynebacterium diphtheriae* (Zur_{CD}), *Corynebacterium glutamicum* (Zur_{CG}) y *S. coelicolor* (Zur_{SC}) (Li et al., BMC Microbiol. (2009 Jun 25); 9:128, Feng et al., J Bacteriol. (2008); 190(22): 7567-78, Lindsay & Foster, Microbiology (2001), 147, 1259-66, Campoy et al., Infect. Immun. (2002); 70: 4721-5, Garrido et al., FEMS Microbiol. Lett. (2003); 221: 31-37, Tang et al., Mol. Plant-Microbe Interact. (2005); 18: 652-8, Maciag et al., J Bacteriol. (2007); 189(3): 730-40, Shin et al., Journal of Bacteriology (2007); junio: 4070-7, Dalet et al., FEMS Microbiol. Lett. (1999); 174: 111-6, Schröder et al., BMC Genomics (2010); 11: 12 y Smith et al., J Bacteriol. (2009); 191(5): 1595-603).

[0116] Se denomina regulón a un grupo de genes cuya actividad está controlada por el mismo regulador. Los regulones bajo el control de proteínas Zur comprenden genes que codifican funciones de adquisición de zinc, como, por ejemplo, sistemas de captación de zinc con afinidad alta (znuABC), zincóforos putativos y parálogos sin zinc de proteínas ribosómicas. Estos genes experimentan una represión a través de la unión de las proteínas *holoZur* unidas a zinc bajo condiciones ricas en zinc y la desactivación de la represión mediante la disociación de la proteína apoZur sin zinc por el ADN.

[0117] *S. coelicolor*, un organismo modelo de los actinomicetos con alto contenido de GC, regula la homeostasis de metales y la respuesta al estrés por peróxido entre otros con cuatro proteínas caracterizadas bioquímicamente de la familia Fur (Fur_{ASC}, CatR_{SC}, Nur_{SC} y Zur_{SC}) (Hahn et al., J Bacteriol. (2000); 182(13): 3767-74, Ahn et al., Mol. Microbiol. (2006); 59:1848-58 y Shin et al., Journal of Bacteriology (2007); junio: 4070-7).

[0118] Un análisis BLAST de *A. japonicum* con las secuencias aa de las cuatro proteínas individuales de la familia Fur de *S. coelicolor* mostró que el genoma de *A. japonicum* codifica tres homólogos de proteínas de la familia Fur, correspondientes a las secuencias de ácido nucleico orf1667 (corresponde a la SEQ ID NO 58), orf3462 y orf5768 (corresponde a la SEQ ID NO 62).

[0119] Los homólogos de la familia Fur ORF1667 (corresponde a la SEQ ID NO 57) y ORF3462 son muy similares a Fur_{ASC} de *S. coelicolor* (62/75 % y 67/79 % de identidad/similitud aa). Fur_{ASC} de *S. coelicolor* está implicada en

la respuesta adaptiva al estrés por peróxido y ejerce una regulación negativa sobre un operón con el gen *fur*^{Asc} mismo y *catC*, que codifica una catalasa-peroxidasa (Hahn et al., J Biol Chem. (2000); 275(49): 38254-60).

[0120] La tercera proteína homóloga de la familia Fur con una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61 es muy similar a Zur_{sc} de *S. coelicolor* y presenta respecto a esta un 67/85 % de identidad/similitud aa (figura 6).

5 [0121] La alta similitud de la Zur_{sc} de *S. coelicolor* caracterizada bioquímicamente y de homólogos de *A. japonicum* (Zur_{AJ}) codificados por una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62 (u orf5768) implica que esta proteína o péptido según la SEQ ID NO 61 es la proteína sensible al zinc de la familia Fur de *A. japonicum*, que media una represión dependiente de zinc de genes diana correspondientes.

10 [0122] Zur_{sc} es el regulador negativo del sistema de captación de zinc con alta afinidad (ZnuABC) en *S. coelicolor* (Shin et al., Journal of Bacteriology (2007); junio: 4070-7). Un análisis BLAST del genoma de *A. japonicum* con las secuencias aminoacídicas de ZnuABC de *S. coelicolor* mostró dos sistemas homólogos que están codificados por orf3699, orf3700 y orf3702 u orf6504, orf6505 y orf6506 (figura 7).

15 [0123] Se sabe que la expresión del operón znuABC de *S. coelicolor* está bajo la represión estricta de Zur_{sc}, donde el zinc es un cofactor (Shin et al., Journal of Bacteriology (2007); junio: 4070-7). Por lo tanto, se examinó la transcripción de orf3700 y orf6504 como representantes de todos los sistemas en dependencia de la presencia de zinc, así como otros metales diferentes, para detectar cuál de los dos sistemas de captación de zinc putativos media la captación de zinc altamente afín en *A. japonicum* (figura 8).

20 [0124] El segmento de ADN orf3700 se expresó bajo ausencia de metal, así como en presencia de hierro, níquel, cobalto y, sin embargo, no en presencia de zinc (figura 8). Este patrón de transcripción mostró claramente la represión rigurosa y mediada exclusivamente por zinc de orf3700 en *A. japonicum*. De esto se pudo concluir que el sistema de captación codificado por orf3699, orf3700 y orf3702 representa el sistema de captación de zinc con alta afinidad (ZnuABC) de *A. japonicum*.

25 [0125] Para confirmar que esta proteína homóloga a Zur_{sc} según la SEQ ID NO 61 (codificada por la SEQ ID NO 62) es la proteína reactiva al zinc de la familia Fur de *A. japonicum* y media la represión dependiente de zinc del sistema de captación de zinc (znuABC) y de los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS putativos, se realizaron análisis electroforéticos de afinidad (EMS-Assays, Electrophoretic Mobility Shift Assays).

30 [0126] La unión de la proteína o péptido según la SEQ ID NO 61 se examinó utilizando la región promotora situada aguas arriba en el extremo 5' de los genes represores de zinc orf3700 y orf1662 (corresponde a la SEQ ID NO 46) y también todas las otras regiones promotoras predichas en el grupo de genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS putativo (región aguas arriba de orf1658, región intermedia de orf1659 y orf1660, región intermedia de orf1661 y orf1662) en dependencia del zinc como cofactor (figura 9).

35 [0127] Para examinar si el regulador de la captación de zinc homólogo ORF5768 (Zur_{AJ}, corresponde a la SEQ ID NO 61) media la represión dependiente de zinc de orf3700, orf1662 y los otros genes dentro del grupo de genes de biosíntesis de [S,S] a través de la unión a las regiones promotoras correspondientes (círculos abiertos, figura 9), se realizaron ensayos EMS (Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMS Assay) o también Band Shift Assay). Para ello se proporcionó el regulador de la captación de zinc homólogo ORF5768 con una etiqueta de Histidina₆, se purificó y se aisló. Igualmente se proporcionaron las secuencias de ADN correspondientes (secuencias promotoras), que tuvieron que examinarse como promotores supuestamente regulados por zinc (círculos abiertos, figura 9).

40 [0128] La reacción de unión se realizó incubando las secuencias promotoras (aproximadamente 35 nM) con diferentes cantidades de His₆-ORF5768 en 10 µl de tampón de unión durante 20 min a 29°C con o sin adición de zinc (tabla 1). Para excluir uniones no específicas de His₆-ORF5768 se realizó la adición de un fragmento sigB-RT (258 pb) como control negativo (figura 10).

45 [0129] Así se pudo constatar mediante EMSA una unión dependiente de zinc (es decir, en presencia de zinc) de His₆-ORF5768 en aquellas sondas de EMSA que representan la región promotora znuABC, así como las regiones promotoras orf1659-60 y orf1661-62. No se constató ninguna unión en la región promotora orf1658 (figura 10).

3. Producción de una cepa productora de [S,S]-EDDS con desactivación de la represión por zinc

[0130] Para la producción de un cepa productora de [S,S]-EDDS de *A. japonicum* con desactivación de la represión por zinc se siguieron tres estrategias:

(1) Delección del gen regulador de la captación de zinc (y por ello de la proteína represora Zur) SEQ ID NO 62.

(2) Expresión de los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS bajo control de promotores sin represión por zinc (*None-Zinc-Repressed Promoters*). Intercambio de los promotores diana de Zur.

(3) Expresión heteróloga de los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS en células huésped en las que la represión por zinc ya no está disponible.

3.1 Delección del gen regulador de la captación de zinc SEQ ID NO 62

[0131] Bajo la suposición de que los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS experimentan una represión a través de Zur_{AJ} (ORF5768 o proteína o péptido según la SEQ ID NO 61) con zinc como cofactor, se realizó una delección de la región codificante según la SEQ ID NO 62 para producir una cepa productora de [S,S]-EDDS con desactivación de la represión por zinc.

[0132] Para lograr la delección en marco de la región codificante según la SEQ ID NO 62 (corresponde a orf5768) a través de una recombinación homóloga, se construyó el vector de delección pGusA21Δorf5768, que contiene la región aguas abajo y aguas arriba de orf5768, que es similar a pGusA21-us1662+ds1664 (AG Stegmann). Se obtuvo un pGusA21Δorf5768 no metilado negativo de *E. coli* ET12567 y se utilizó para la transformación directa de *A. japonicum* (figura 11).

[0133] Se transfirieron colonias resistentes contra la apramicina de *A. japonicum*, que se obtuvieron tras la transformación con pGusA21Δorf5768 no metilado, a placas HA. Las colonias en crecimiento se recubrieron con solución de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucoronido) y se seleccionaron colonias azules mediante PCR (figura 12, positivos para el gen reportero gusA: clon 1, 6, 7, 8, 12) para otro control de casos de entrecruzamiento único.

[0134] Se aisló ADN genómico de estos clones y se controlaron mediante PCR los casos de entrecruzamiento único de los plásmidos en el genoma de *A. japonicum* en presencia de un casete de resistencia a apramicina y se dedujeron específicamente con cebadores para confirmar una integración de pGusA21Δorf5768 en el genoma. Utilizando el par de cebadores de orf5768-SCO-FP y orf5768-SCO-RP se amplificó un fragmento con 1677 pb (orf5768-SCO-wt-Frag) y/o un fragmento con 1293 pb (orf5768-SCO-single Frag), que representa el genoma silvestre o el genoma con pGusA21Δorf5768 integrado (figura 12).

[0135] Los clones de *A. japonicum* con pGusA21Δorf5768 integrado en el genoma (clones 1, 6, 7 y 8) se unieron y utilizaron para la inducción de un entrecruzamiento doble (recombinación homóloga), donde las células se cultivaron bajo estrés térmico.

[0136] En total se produjeron tres mutantes de *A. japonicum* (*A. japonica* Δzur) en una delección en marco de la región codificante de la SEQ ID NO 62. *A. japonicum* WT y todos los mutantes producidos se cultivaron en medio de producción de EDDS (compárese con la tabla 1). Mientras que la cepa *A. japonicum* WT bajo las condiciones ricas en zinc no formó [S,S]-EDDS, ninguno de los tres mutantes mostró una represión por zinc (figura 13).

[0137] Por lo tanto pudo demostrarse que la delección del represor reactivo al zinc de *A. japonicum* (zur_{AJ} o secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62) lleva a una producción de [S,S]-EDDS independiente de zinc.

3.2 Expresión de los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS bajo el control de promotores sin represión por zinc

[0138] Una segunda estrategia para la producción de una cepa productora de [S,S]-EDDS con desactivación de la represión por zinc se provee para evitar la represión por zinc mediada por Zur (proteína o péptido según la SEQ ID NO 61) a través de un intercambio de los promotores diana de Zur por promotores expresados relativamente fuerte de manera constitutiva o inducibles. Para ello se eligió el conocido promotor expresado de manera constitutiva *PermE** para expresar el operón de [S,S]-EDDS (SEQ ID NO 48, 50, 52 y 54, corresponde a orf1662-65) bajo su control. El plásmido producido pRM4-PermE*orf1662-65 se transfirió a *A. japonicum* WT y así obtener *A. japonicum* + pRM4-PermE*orf1662-65 (figura 14).

[0139] *A. japonicum* WT y *A. japonicum* + pRM4-PermE*orf1662-65 se cultivaron entonces en medio de producción de EDDS (compárese con la tabla 1), suplementado con solución de 6 μM de ZnSO₄. Los datos según la figura 15 muestran que con *A. japonicum* WT bajo las condiciones elegidas no se produce ninguna producción de [S,S]-EDDS. Por el contrario, resulta ya una producción de [S,S]-EDDS detectable en presencia de zinc a través de la

cepa de *A. japonicum*, que expresa el operón de [S,S]-EDDS orf1662-65 bajo el control del promotor *ermE** no diana de Zur (figura 15).

[0140] Estos datos muestran que se puede lograr una clara producción de [S,S]-EDDS independiente de zinc intercambiando los promotores diana de Zur_{AJ} (SEQ ID NO 61), que controlan los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS.

3.3 Expresión heteróloga de los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS en células huésped heterólogas

[0141] El grupo de biosíntesis de [S,S] debe expresarse en cepas bacterianas ya aplicadas en biotecnología, por ejemplo, *S. coelicolor*.

[0142] Por lo tanto se cultivó la cepa *S. coelicolor* con el cósmido pTWPL1-EDDS integrado en el genoma en medio de producción de EDDS y se examinó la producción de [S,S]-EDDS (figura 16).

[0143] Los datos confirman que se puede sintetizar [S,S]-EDDS mediante una expresión heteróloga en el huésped *S. coelicolor* en medio de producción de EDDS sin zinc (figura 16, centro). Estos datos confirman además que los genes identificados en el marco de la invención son los genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS.

4. Cultivo y conservación de *A. japonicum*

[0144] Para la producción de cultivos de *A. japonicum* se cultivaron liofilizados sobre placas HA y se incubaron a 27°C de 4 a 5 días. Se inocularon luego 100 ml de medio M3 (compárese con la tabla 1) con el micelio y se incubaron 48 h a 27°C. Los cultivos se lavaron dos veces con solución salina (NaCl al 0,9%). El precipitado se suspendió en 50 ml de medio M2 (compárese con la tabla 1), se subdividió en porciones de 2 ml y se conservó a -20°C hasta 6 meses.

5. Cultivo de *A. japonicum* para el aislamiento de ADN

[0145] Se incubaron 20 ml de medio TSB (compárese con la tabla 1) con el micelio inoculado y durante dos días a 27°C. Se logró un crecimiento disperso y una oxigenación óptima en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con deflectores y una espiral de metal.

6. Cultivo de *A. japonicum* bajo condiciones de biosíntesis de [S,S]-EDDS

[0146] Se cultivó *A. japonicum* sobre placas HA y se incubó a 27°C durante 3 a 5 días. Luego aproximadamente 1 cm² de micelio de *A. japonicum* se quitó de la placa y se utilizaron 100 ml de medio M3 para la inoculación (compárese con la tabla 1). Tras 48 h de incubación a 27°C y 180 r.p.m. en un vibrador se utilizaron 5 ml para la inoculación de 100 ml de medio M7 (compárese con la tabla 1). M7 es un medio sintético pobre en zinc, en el que *A. japonicum* produce [S,S]-EDDS. Para evitar una biosíntesis de [S,S]-EDDS, se añadió ZnSO₄ hasta una concentración final de 6 µM. Para una RT-PCR se añadieron ZnSO₄, FeSO₄, MnSO₄, NiSO₄ y CoCl₂, respectivamente, hasta una concentración final de 25 µM (compárese, por ejemplo, con la figura 3).

[0147] Las secuencias aminoacídicas y de ácido nucleico citadas en la presente descripción corresponden a las secuencias especificadas en la lista de secuencias incluida.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eberhard Karls Universitaet Tuebingen

<120> Grupo de genes de biosíntesis de [S,S]-EDDS y método para la biosíntesis de [S,S]-EDDS

<130> P 53 563 WO

<160> 64

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 541

<212> PRT

<213> Amycolatopsis japonicum

ES 2 745 975 T3

<220>

<223> ORF 1639

5 <400> 1

	Met	Thr	Arg	Lys	Glu	Pro	Ala	Asp	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Ala	Phe	His
	1				5					10					15	
10	Leu	Tyr	Asp	Thr	Thr	Leu	Arg	Asp	Gly	Ala	Gln	Arg	Glu	Gly	Ile	Ser
			20						25					30		
	Tyr	Ser	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp	Glu	Leu
			35					40					45			
	Gly	Val	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Lys	Asp
	50					55						60				
15	Thr	Glu	Phe	Phe	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Leu	Lys	Leu	Arg	His
	65				70						75				80	
	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Phe	Gly	Ala	Thr	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Lys	Ala
				85					90						95	
20	Glu	Gln	Asp	Gln	Gln	Val	Arg	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Gln	Ala	Pro	Val
			100						105					110		
	Val	Thr	Leu	Val	Ala	Lys	Ser	Asp	Leu	Arg	His	Ile	Glu	Arg	Ala	Leu
			115					120					125			
	Arg	Val	Asp	Val	Asp	Glu	Ala	Cys	Glu	Met	Val	Arg	Asp	Thr	Val	Ala
	130						135					140				
25	Phe	Leu	Val	Gly	Glu	Gly	Arg	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	Ala	Glu	His	Phe
	145				150						155				160	
	Phe	Asp	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Pro	Asp	Thr	Ala	Leu	Lys	Val	Leu	Asp
				165					170						175	
30	Ala	Gly	Val	Asn	Ala	Gly	Ala	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Asp	Thr	Asn
				180					185					190		
	Gly	Gly	Gln	Leu	Pro	Leu	Gly	Leu	Ala	Glu	Thr	Val	Arg	Glu	Val	Lys
			195					200					205			
	Glu	Arg	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Ile	His	Cys	Gln	Asp	Asp	Thr	Ser
	210					215						220				
35	Cys	Ala	Val	Ala	Asn	Ser	Val	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Gly	Val	Thr	His
	225				230						235				240	
	Val	Gln	Cys	Thr	Ala	Asn	Gly	Tyr	Gly	Glu	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Asp
				245					250					255		
40	Leu	Phe	Ala	Val	Thr	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Lys	Leu	Gly	Met	Glu	Val
			260					265						270		
	Leu	Pro	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Arg	Val	Ser	His	Ala	Leu
			275					280					285			
	Ala	Glu	Ile	Ala	Asn	Ile	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Gln	Ala	Tyr	Val	Gly
	290					295						300				
45	Ala	Ser	Ala	Phe	Ala	His	Lys	Ala	Gly	Leu	His	Ala	Ser	Ala	Ile	Lys
	305				310						315				320	
	Val	Asp	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asn	His	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser	Val	Gly	Asn
				325						330					335	
50	Asp	Met	Arg	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Met	Ala	Gly	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu
			340					345						350		
	Leu	Lys	Gly	Arg	Glu	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Gly	Gln	Pro	Glu	Ala
			355					360					365			
	Leu	Thr	Ser	Ala	Val	Lys	Lys	Val	Lys	Arg	Leu	Glu	Ser	Glu	Gly	Trp
	370					375						380				
55	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Glu
	385				390						395				400	
	Val	Asp	Gly	Pro	Gln	Ser	Asp	Val	Leu	Asp	Glu	Pro	Pro	Phe	Glu	Leu
				405						410					415	
60	Glu	Ser	Tyr	Arg	Val	Val	Leu	Asp	His	Arg	Ser	Asp	Gly	Glu	Val	Val
			420						425					430		
	Ser	Glu	Ala	Thr	Val	Lys	Val	His	Val	Ala	Gly	Gln	Arg	Val	Ile	Ala
			435					440					445			
	Thr	Ala	Glu	Gly	Asn	Gly	Pro	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Arg
	450					455						460				
65	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Asp	Ser	Val	Glu	Leu	Ala
	465				470						475				480	
	Asp	Tyr	Lys	Val	Arg	Ile	Leu	Pro	Gly	His	Pro	Gly	Thr	Asp	Ala	Val
				485					490					495		
70	Thr	Arg	Val	Leu	Val	Glu	Thr	Ser	Asp	Gly	Glu	Arg	Glu	Trp	Thr	Thr
			500					505						510		
	Val	Gly	Val	His	Gly	Asn	Ile	Val	Glu	Ala	Ser	Trp	Leu	Ala	Leu	Cys
			515					520					525			
	Asp	Ala	Leu	Val	His	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	Ala			
	530					535						540				

75

ES 2 745 975 T3

	<210> 2	
	<211> 1626	
	<212> ADN	
	<213> Amycolatopsis japonicum	
5	<220>	
	<223> orf 1639	
10	<400> 2	
	gtgacccgca aggagcccgc cgatacacccg ctcggcgacg ccttccacct gtacgacacg	60
	acgttgcgcg acggtgcgca gcgtgagggg atctcctact cgcgcgcgga caaactggcg	120
15	gtggcgaggg tgctcgacga actcggggtc ggggttcacg aaggcggatg gccgggcgcg	180
	ctgcccaagg acacggaatt cttcgcccggt gcggcttcgg gcgagctgaa acttcgccat	240
20	gccgcgctcg tcgcgttcgg cgcgacgcgg aaggcgggca ccaaggccga gcaggatcag	300
	caggtgcggg ccctgctcga ctcgcaggca ccggtggtca cgctcgtggc caaatccgat	360
	ctgcggcaca tcgaacgcgc gctgcgggtc gacgtcgacg aagcttgca gatggtgcgc	420
25	gacaccgtcg cgttcctcgt cgggtgaagga cgtcgcgtct tccttgacgc ggaacacttt	480
	ttcgacggct acgcgttctc cccggacacc gcgctgaagg tgctcgacgc gggcgtgaac	540
30	gcgggtgcgg acgtcgcggt gctgtgcgac accaacggcg ggcaactgcc gctcggactc	600
	gcggaaaaccg tccgcgaggt caaggaaaagg accggattcc ggctcggaat ccattgtcag	660
	gacgacactt cctgcgcggt ggcggaattcc gtcgcgcgcg tgcaggccgg cgtgacgcac	720
35	gtccagtgea ccgccaatgg ttacggcgag cgggcgggta acgcgatct tttcgccgtg	780
	acaggggaatt tgggtgacaa gctcggtagt gaggtgctcc cgaccggagg cgccgccgag	840
40	ctcaccgccg tctcccatgc ctttgccgaa atcgcgaaaca tcgcccccta caccaccag	900
	gcttacgtag gggcgtcggc cttcgccac aaggcgggac tgcacgcgag cgcgatcaag	960
45	gtggatccgt tgctgtacaa ccacatcgat ccagcttctg tcggcaatga catgcgggta	1020
	ctgggtcaccg agatggccgg cagggccagc ctggagctca agggacgtga gctcggggtc	1080
	gaccttgccg gccagcccga ggcgctgacg agcgccgtga agaagggtgaa acgcctcgaa	1140
50	tccgaaggct ggtccttcga agccgcggac gcttcaactg aactgctgct gcggcgggag	1200
	gtcgacggcc cgcagagcga cgtcctcgac gaaccgccgt tcgaactcga gtcgtaccgg	1260
	gtcgtcctcg accaccggtc cgacggcgag gtcgtctccg aggcgacggt gaagggtcac	1320
55	gtcgccgggc agcgctgat cgcgaccgcc gagggcaacg ggcccgtgca cgcgctcgac	1380
	gccgccctgc gcgaggcgt cagcccgcat ctgtcctggt tggacagtgt cgagctggcc	1440
60	gactacaagg tgcggatcct gcccgcccat ccgggcaccg acgcggtcac ccgtgtgctc	1500
	gtcgagacca gcgacggcga gcgcgagtgg accaccgtcg gcgtgcacgg caacatcgtc	1560
	gaggcgagct ggctggcgct gtgcgacgcg ctcgtgcaca agtccctcag cgagggcccg	1620
65	gcgtga	1626
70	<210> 3	
	<211> 256	
	<212> PRT	
	<213> Amycolatopsis japonicum	
	<220>	
75	<223> ORF 1640	

ES 2 745 975 T3

<400> 3

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

<210> 4

<211> 771

<212> ADN

40 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>

<223> orf 1640

45 <400> 4

gtgcgctctag cccgaattgc tcatcccggt ggtgtcgcgt tcgcttcgat cgaaggggac 60
ggcgacgacg cccaggtact ggaaatcgcc gagcaccctc tcggcaaccc caacttcacc 120
50 ggcaaacgct ggccgctcgc cgacgtccgg ctgctcgcgc cgatcctgcc gtcgaaggtg 180
atcgcggtcg gccggaacta cgccaagcac gcggccgagt tcggcaacga ggtcccgcag 240
55 gaccgatgc tgttcatcaa gccgtcgacc acggtgatcg ggccgaacgt gccgatccgc 300
cgtccgcgcg gtgtcggccg tgctgaacttc gagggcgaac tggcgatcgt catcggccag 360
ccggtcaaga acgtgcccg cgcccgcgcg gcgagcgca tcctcggtta caccgtggcg 420
60 aacgacgtca gcgcgcgtga cctgcagaag tccgacggcc agtggggcag ggcgaagggt 480
ttcgacacct tctgcccgct gggcccggtg atcgagacct cgctcgacgc ggccgatctc 540
65 gcgctcaagt ccgaggtgga cgggtgtgctc aagcaggacg gccggacgtc ggacctggtg 600
cacaagatcc ccgagctggt cgaattcgtg tccgggggtga tgacctgtt gcccggtgac 660
gtcatcctga ccggcacgcc cgagggcgctc ggcccgatcg aggacggcca gtccgtgtcg 720
70 atcaccatcg agggcatcgg caccctgacg aaccgggttc aagacatcta g 771

<210> 5

<211> 411

75 <212> PRT

ES 2 745 975 T3

```

<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> ORF 1641

5
<400> 5

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

60
<210> 6
<211> 1236
<212> ADN
<213> Amycolatopsis japonicum

65
<220>
<223> orf 1641

<400> 6

70
atgaacgaac gtacgaactg cgtggtcgtc ggcggtggcc ccgcgggtat ggtcgccgga      60

ttgctgctgg ccagggccgg ggtcgaggtc accgtgctgg agaagcacca ggacttctg      120

75
cgggacttcc gcggcgacac cgtgcacccg tcgacgttga cgttctgga cgagctgggc      180

```

ES 2 745 975 T3

ctcagcgaga aattcctcag cctgccgcac agcgagatcg cctacgccgg cttccccgcc 240
5 gaggacggca cgatgatgcg cctcgccgac ctgaccaggc tgaaggtggc gcacccgtac 300
atcgccatgg tcccgcagtg ggacttcctg gacctgctcg ccgacgccgg ggcgaaggaa 360
cccacgttca cgctgcggca gagcaccgag atgaccgggc tgatcttcga acacggccgg 420
10 gtgagcgggg tccgctaccg cgacgccgac ggggaaggccg gcgaactgcg cgccgacctg 480
gtgatcgccg ccgacggacg ctggctcgctg gcccgcgcg aggcggggct catgacgaag 540
15 gactacccca tcccgttcga cgcggtggtg ttccggatct cacggcggga cggggaacgc 600
gaaggcatgc tgaccccgaa gatgcgggat cgccgcttcg ccgtgccgct gccccgcaag 660
ggctacttcc agatcgcta cctcagcccc aagggccagg acctgcgcga caaggcatc 720
20 gagcggttcc gggagaacgt ggccgcgac ctgcccgagc tggccgaccg cgtggacgag 780
ctgaagacga cggacgacgt caaattcctc gacgtcaaga tgaacctgct gcggaagtgg 840
25 catctcgacg ggctgctgtg catcggtgac gggcgcacg cgatgtcgcc ggtcggcggg 900
gtcggcatca acctcgcggt gcaggacgcg gtcgcggccg ccacctgct cgccgaaccg 960
ctgcgcccg gcaggccgtc ggtggcggtat ctggcgaagg tccgcaagcg ccgtctcgcg 1020
30 cccacgatgc tgggtgcagg gctgcagcgg attctgcaca agaactgat ggggccggtg 1080
atggcgggca agcgcaacgg cccgcccgcg ccgatggtga agctgttcag ccggttcccc 1140
gcgctgtcct acatccccgc gcggtgctg ggctggggc tgcggcccga gcacgccccg 1200
35 gccttcgcgc ggcgggcat ggaaccggcc ggtag 1236

<210> 7
40 <211> 244
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
45 <223> ORF 1642
<400> 7

Met Cys Leu Asp Ile Asp Asp Thr Leu Ile Asp Cys Thr Ala Ala Ile
1 5 10 15
50 Arg Leu Ser Leu Ser Ala Leu Thr Gly Gln Asn Asp Leu Trp Pro Leu
20 25 30
Trp Asp Leu Ile Thr Glu Glu His Val Ala Leu Val Val Ala Gly Glu
35 40 45
55 Ile Asp Tyr Ala Thr Met His Tyr Lys Arg Thr Glu Cys Phe Leu Ala
50 55 60
Glu Ile Gly Ile Leu Ala Asp Glu Gln Gln Val Ser Gly Phe Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Arg Glu Ile Leu Thr Arg Ser Trp Gln Leu Phe Glu Asp Val
85 90 95
60 Leu Pro Cys Leu Glu Trp Leu Arg Ala Ala Gly Val Leu Val Ala Ala
100 105 110
Val Thr Asn Ala Ser Gly Ala His Gln Arg Lys Lys Ile Ala Asp Leu
115 120 125
65 Gly Leu Ala Arg Phe Phe Asp His Val Ala Ile Ala Gly Glu Leu Gly
130 135 140
Val Ala Lys Pro Asp Pro Ala Met Phe His Ser Val Cys Leu Gly Leu
145 150 155 160
Gly Cys Asp Pro Ala Gln Ala Val His Val Gly Asp Lys Leu Asp Thr
165 170 175
70 Asp Ala Ile Gly Ala Arg Asp Ala Gly Leu Gly Ala Val Trp Leu Asp
180 185 190
Arg Asp Gly Ile Ala Glu Arg Ala Pro Ala Gly Val His Thr Ile Ser
195 200 205
75 Gly Leu Asp Glu Leu Pro Glu Leu Leu Val Ser Glu Phe Ala Lys Leu
210 215 220

ES 2 745 975 T3

Gly Val Pro Ala Gln Arg Ala Thr Glu Thr Pro Ala Phe Thr Val Arg
 225 230 235 240
 Asn Ser Val Leu

5
 <210> 8
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

10
 <220>
 <223> orf 1642

15
 <400> 8

gtgtgcctcg acatcgatga cacgttgatc gactgcacgg cggcgatccg cctcagcctg 60
 agcgccctca ctggccagaa cgacctttgg ccgctgtggg atctcatcac cgaagagcat 120
 20 gtcgcgctgg tggtcgcggg cgaaatcgat tacgcgacca tgcattacaa gcgtacggaa 180
 tgtttcctcg ccgagatcgg cattttggcc gacgaacagc aggtcagcgg cttcgaaaga 240
 cgtcgtcgtg aaattctcac ccgttcgtgg caattgttcg aagatgtcct cccatgcctt 300
 25 gaatggctgc gggccgcccgg tgtttctcgtc gccgcggtca cgaacgcctc gggcgcgcat 360
 cagcgcaaga agatcgccga cctcggcctc gcccggttct tcgatcacgt ggccatcgcc 420
 30 ggtgaactcg gagtagccaa acccgaccgg gcgatgttcc actcgggtctg cctcggcctc 480
 ggctgcgacc cggcgagggc cgtccacgtc ggcgacaaac tcgacaccga cgccatcggc 540
 gcgcgcgacg ccggcctggg ggccgtctgg ctcgaccggg acggcatcgc cgagcgcgcc 600
 35 ccggcgggcg tgcacaccat ctcgggcctc gacgagctgc ctgagctgct cgtttccgag 660
 ttcgcgaagc tcggcgtgcc cgctcagcgc gctactgaga cccccgcttt cacggtgcgg 720
 40 aacagcgtgc tctag 735

<210> 9
 <211> 70
 <212> PRT
 45 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
 <223> ORF 1643

50
 <400> 9

Met Val Glu Gly Arg Gln Thr Thr Pro Ala Thr Phe Asp His Pro Leu
 1 5 10 15
 55 Val Thr Ser Gly Ser Arg Leu Asn Asp Gly Gly Val Val Val Glu His
 20 25 30
 Gly Phe Ala Gly Ala Gly Ala Leu Thr Leu Ser Val Ala Ala Ile
 35 40 45
 Ala Thr Ile Pro Ala Ala Phe Asp Ala His Val Pro Val Thr Pro Val
 50 55 60
 60 Leu Lys Ala Glu Thr Ala
 65 70

<210> 10
 <211> 213
 65 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
 <223> orf 1643

70
 <400> 10

gtggttgaag gccgccagac gacaccagcc accttcgacc acccgctggg gacttccgga 60
 75 agccggctga acgacggcgg cgtggtggtc gaacacggtt tcgccggggc cggggccggc 120

ES 2 745 975 T3

ctcacgtctt ccgctgcccgc gatcgccacc atccccgccg ccttcgacgc acacgtcccg 180

gtcactccgg tactcaaagc ggagaccgct tag 213

5 <210> 11
<211> 135
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

10 <220>
<223> ORF 1644

15 <400> 11

Met Arg Gln Ala Gly Phe Asp Gly Glu Leu Pro Asp Arg Ile Arg Ala
1 5 10 15
Phe Asp Glu Ile Val Lys Thr His Glu Trp Ser Glu Ser Ala Gly Ser
20 20 25 30
Ile Thr Gln Pro Ile Asp Tyr Tyr Arg Gln Phe Arg Gly Arg Pro Glu
35 40 45
Gly Pro Asn Arg Val Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Pro Gly Val Gly Tyr
50 55 60
Thr Arg Gln Val Ala Asp Thr Thr Arg Met Gly Leu Gly Glu Ser Trp
25 65 70 75 80
Thr Glu Ala Gly Gln Pro Val Arg Glu His Pro Glu Pro Ser Ser Asp
85 90 95
Leu Phe Thr His Thr Ser Gly Pro Asn Gln His Ala Leu Ile Thr Glu
100 105 110
30 Gln Leu Thr Arg His His Tyr Val Met Thr Leu Thr Met Ser Thr Arg
115 120 125
Gln Thr Tyr Pro Thr Cys Arg
130 135

35 <210> 12
<211> 408
<212> ADN
<213> Amycolatopsis japonicum

40 <220>
<223> orf 1644

<400> 12

45 gtgctggcaag caggcttcga cggcgaactg cctgaccgga tccgagcttt cgacgagatc 60
gtcaagacac acgagtggct tgaagtgcga ggctcgatca cacaacccat cgactactac 120
cgccagttcc ggggtcgccc ggaaggaccg aaccgggtct acgacgagcg cgacctcccc 180
ggcgtcggct acacccggca ggtggccgac accacccgca tgggactcgg cgagtctctg 240
accgaagcgg gacagccggt acgggagcac cccgagccgt cgtcagacct tttcacccat 300
55 accagcggac cgaaccagca tgccttgatc accgagcagc tgacccgaca ccattacgtg 360
atgaccttga ccatgagcac caggcagacc tatccgacgt gtcggtga 408

60 <210> 13
<211> 325
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

65 <220>
<223> ORF 1645

<400> 13

Met Thr Met Arg Ala Ala Tyr Leu Ala Glu Pro Gly Val Val Ala Val
1 5 10 15
Gly Arg Phe Pro Ile Pro Arg Pro Glu Glu Gly Gln Val Leu Val Glu
20 25 30
Met Arg His Ala Ser Ile Cys Gly Ser Asp Val His Ile Val Phe Asp
35 40 45
75 Gly Phe His Asp Gln Glu Arg Leu Gly Ser Pro Gly Tyr Pro Gly His

ES 2 745 975 T3

[illegible]

ES 2 745 975 T3

```

ggagacatcg ccgaggcggt cgcgtccgcc cgccgccacg gtgatggcca cccgaagggtg      960
ggaatcattc tgcgctga      978
5
<210> 15
<211> 448
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum
10
<220>
<223> ORF 1646
15
<400> 15
Met Asn Trp Ser Gln Leu Leu Val Pro Val Thr Ser Gly Val Ser Val
1 5 10 15
Ala Leu Ile Val Ala Thr Val Arg Phe Leu Trp Arg Arg Thr Arg Leu
20 20 25 30
Pro Thr Gly Leu Ser Gln Arg Met Thr Arg Arg Asn Tyr Leu Ala Glu
35 40 45
Met Leu Val Ile Ser Lys Asn Asp Asn Val Asp Arg Leu Asp Ala Leu
50 55 60
Val Pro Asn Leu Leu Pro Ala Gln Gly Ser Pro Val Leu Val Glu Ile
65 70 75 80
Gln Glu Ser Trp Thr Gln Ile Asn Gly Arg Arg Gly Val Arg Val Ile
85 90 95
Thr Arg Thr Glu Pro Ala Ser Leu Thr Ala Gly Ala Glu Leu Leu Ala
100 105 110
30 Ala Gly Ile Glu Val Arg Val Ser Arg Ala Leu Thr Ala Asp His Leu
115 120 125
Ser Tyr His Leu Phe Ser Gly Ser Glu His His Thr Val Leu Asn Arg
130 135 140
35 Arg Asn Gly Gly Lys Asp Arg Pro Glu Arg Leu Asp Glu Ile Ser Ala
145 150 155 160
Ala Lys Val Phe Arg Ser His Phe Asp Glu Thr Trp Ser Glu Ser Glu
165 170 175
Pro Ile Glu Ser Phe Leu Ala Gly Gln Leu Leu Ala Gly Pro Asp Ser
180 185 190
40 Gly Leu Ala Asp Arg Ile Arg Glu Gln Arg Ala Ala Tyr Gln Leu Pro
195 200 205
Ala Lys Ala Glu Asp Ala Ile Leu Arg His Leu Ala Phe Arg His Arg
210 215 220
45 Ala Pro Val Val Phe Val Thr Gly Leu Pro Gly Ala Gly Lys Ser Leu
225 230 235 240
Val Arg Arg Ala Leu Ala Glu Glu Leu Arg Arg Trp Arg Met Gln Val
245 250 255
Asp Glu Leu Asn Asp Tyr Val Tyr Ala Phe Glu Glu Phe Leu His Ala
260 265 270
50 Leu Met Leu Leu Gly Asp Gly Arg Gly Ala Gly Phe Ser Ala Gln Gln
275 280 285
Gly Gly Ala Phe Gln Val Glu Arg Glu Asp Asp Leu Arg Pro Ala Leu
290 295 300
55 His Thr Leu Gly His Arg Val Trp Glu Asn Arg Arg Ser Asn Pro Ile
305 310 315 320
Thr Ile Val Glu Phe Ala Arg Ala Asp Thr Ile Gly Ala Leu Gln Val
325 330 335
Phe Gly Asp Glu Val Leu Ala Ala Ser Gln Ile Ile His Val Arg Ala
340 345 350
60 Ser Asp Thr Glu Arg Ser Ala Arg Leu Ala Arg Arg Gly Glu Pro Pro
355 360 365
Lys Ile Ser Val Ala Gly Gln Ser Ile Ser Leu Glu Val Ser Asp Glu
370 375 380
65 His Arg Leu Pro Ser Asn Ala Ala Asp Thr Leu Tyr Ser Arg Asp Asp
385 390 395 400
Phe Ala Leu Leu Lys Ala Gln Lys Asn Ile Ala Asn Arg Leu Phe Leu
405 410 415
Val Glu Asn Asp Ala Glu Glu Lys Ala His Val Asp Glu Gln Val Thr
420 425 430
70 Ala Phe Val Glu Ala Val Val Arg Pro Tyr Arg Val Leu Ala Arg Thr
435 440 445
<210> 16
<211> 1347
75 <212> ADN

```

ES 2 745 975 T3

```

<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> orf 1646

5
<400> 16

atgaactgga gtcagctcct cgttcccgtg accagcgggtg tgtccgtcgc cctcatcgtg      60
10 gcgaccgtca ggttcctgtg gcggcgacacc cgtctgccga ccggcctctc ccagcggatg      120
acccggcgga actacctggc ggagatgtc gtcactctcca agaacgacaa cgtcgaccgg      180
ctcgacgcac tgggtccgaa tctgtgtccg gcacaaggct cccccgtgct cgtcgagatc      240
15 caggagtcgt ggacgcagat caacggcccg gcggcgctcc gggtgatcac ccggaccgag      300
cccgcgctcc tgaccgcccg agccgagttg ctcgcagcgg ggatcgaggt tcgctgtgtcc      360
20 cgcgcactga ccgcggatca cctgtcgtac cacctgttct ccggttcgga acaccacacg      420
gtgtctcaacc gccgcaacgg cggaaggac cgcccgaac gactggacga gatctccgca      480
25 gccaaggtgt tccgcagcca cttcgacgag acgtggagcg agtccgaacc catcgaatcg      540
ttcctggccg ggcaactcct ggccgggccc gactccggcc tcgcggaccg gatccgggag      600
cagcgcgcgg cgtaccagct gcccgccaag gcggaggacg cgatcctgcg gcatctggcg      660
30 ttccgccacc gggcgccggt cgtcttcgtc accggcctgc cgggtgccgg caagtcaactg      720
gttcgacgag ctctcgccga agagcttcgg cgggtggcga tgcaggtcga cgagctgaac      780
gactacgtct acgcgttcga ggaattcctc cacgccttga tgctcctcgg cgacggtcgc      840
35 ggtgccggct tcagcgccca gcaggcgccg gcgttccagg tggagcgcga ggacgatctc      900
cgccccgccc tgcacacgct cggccaccgc gtctgggaaa accgcccggag caacccgatc      960
40 acgatcgtcg agttcgccag ggccgacacg atcggagcgc tccaggtgtt cggcgacgag      1020
gtactggcgg cgtcgcagat catccacgtc cgcgcctccg acaccgagcg ctccgcccgg      1080
ctggccagac ggggcgaacc accgaagatc tcggtggcgg gtcagtcgat cagtctcgaa      1140
45 gtgtccgacg agcatcggt gccagcaac gccgcggaca ccctgtacag cagggatgac      1200
ttcgcactcc tgaaggcaca gaagaacatc gccaacggcc ttttcctcgt cgagaacgac      1260
50 gccgagggaa aggcgcacgt cgacgaacag gtcacggcgt tcgtcgaggc ggtcgtgcgc      1320
ccctaccgag tactcgcgcg tacctag      1347

<210> 17
55 <211> 110
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
60 <223> ORF 1647

<400> 17

Met Thr Glu Gln Ala Phe Phe Val Leu Thr Ala Leu Val Asp Thr Pro
65 1 5 10 15
Arg His Gly Tyr Gly Ile Val Gly Glu Val Ser Gly Leu Ser Asp Gly
20 25 30
Arg Val Lys Leu Lys Val Gly Thr Leu Tyr Gly Val Leu Asp Arg Leu
35 40 45
70 Val Ala Asp Gly Leu Val Glu Pro Asp Arg Glu Glu Val Ala Asn Gly
50 55 60
Arg Leu Arg Arg Tyr Tyr Arg Leu Thr Glu Asp Gly Arg Thr Ala Leu
65 70 75 80
Ala Ala Glu Val Gln Arg Gln Ala Ser Asn Ala Arg Ala Ala Ser Glu
75 85 90 95

```

ES 2 745 975 T3

Arg Leu Arg Ala Trp Arg Pro Ala Asp Thr Gly Gly Leu Ala
100 105 110

<210> 18
5 <211> 333
<212> ADN
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
10 <223> orf 1647

<400> 18

atgacggagc aggcgttctt cgtgctcacc gcgctggtgg acacgccgcg gcatgggtac 60
15 gggatcgtcg gcgaggtgag cggctctctcg gacggccggg tgaagctgaa ggtcggcacg 120
ctgtacggcg tgctggatcg gctggtcgcg gacggtttgg tcgagccgga tcgggaggag 180
20 gtcgccaaacg ggcggctccg ccggtactac cggctgaccg aggacggccg cacggcgctc 240
gcggccgagg tccaacggca ggcctcgaac gcccgcgccg cctcggaacg gctgcgcgcg 300
tggcggcccg cggaacccgg gggcctggcg tga 333

<210> 19
25 <211> 331
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
30 <223> ORF 1648

<400> 19

35 Met Asn Arg Leu Glu Glu Arg Tyr Arg Arg Val Leu Arg Leu Leu Pro
1 5 10 15
Ala Ser Tyr Arg Gln Ala Trp Glu Glu Asp Met Val Ala Thr Phe Leu
20 25 30

40 His Ser Glu Met Pro Glu Asp Ala Glu Asp Ala Glu Phe Ala Val Asp
35 40 45
His Gly Arg Pro Ser Trp Pro Glu Val Ala Ser Val Val Ala Leu Ala
50 55 60
Val Arg Leu Arg Leu Gly Gly Asp Gly Ala Pro Leu Arg Tyr Leu Val
45 65 70 75 80
Trp Gly Glu Thr Val Arg Arg Leu Ala Leu Val Gly Leu Leu Val Gln
85 90 95
Ala Val Ala Ala Leu Val Gly Ile Gly Ala Trp Leu Trp Ser Pro Ser
100 105 110

50 Val Thr Asn Pro Ile Pro Ala Asp Val Gln Thr Leu Leu Gly Leu Val
115 120 125
Trp Val Ala Ala Tyr Leu Cys Leu Val Thr Gly Arg Arg Ala Ala
130 135 140

55 Arg Trp Leu Ala Val Thr Ala Leu Ala Gln Ala Ser Val Phe Phe Gly
145 150 155 160
Val Asp Leu Val Ala Val Glu Gly Ala Tyr Gly Leu Ser Gly Thr Val
165 170 175
Gly Leu Leu Leu Glu Ala Leu Pro Val Val Ala Leu Val Ala Phe His
180 185 190

60 Arg Gln Ala Pro Pro Val Lys Ala Arg Pro Trp Leu Val Ala Leu Leu
195 200 205
Ala Gly Val Gly Leu Leu Thr Val Ala Met Ser Val Thr Tyr Val Ser
210 215 220

65 Val Pro Ala Leu Val Asp Trp Pro Gly Val Asp Cys Ala Ala Val Phe
225 230 235 240
Val Ala Ala Val Val Tyr Leu Ser Val Pro Arg Leu Gly Trp Arg Ser
245 250 255
Ala Ala Val Ser Trp Ser Thr Thr Leu Ala Ser Leu Ala Leu Val Ala
260 265 270

70 Leu Val Gln Arg Val Val Thr Leu Leu Asp Tyr Leu Arg Leu Ala Ala
275 280 285
Arg Thr Ala Glu Leu Asp Ile Met Ile Ala Ile Ala Ala Gly Gln Thr
290 295 300

75 Val Ala Val Leu Ala Ile Ser Val Pro Leu Ala Met Leu Ala Val Lys
305 310 315 320

ES 2 745 975 T3

Ala Val Arg Ala Leu Pro Pro Val Ala Ala Arg
325 330

5 <210> 20
<211> 996
<212> ADN
<213> Amycolatopsis japonicum

10 <220>
<223> orf 1648

<400> 20

15 gtgaaccgcc tggaggagcg gtaccggcgg gtgctgcggc tgctccccgc ctctatcgt 60
caggcgtggg aggaggacat ggtcgccacc ttcctgcaca gcgagatgcc ggaggacgcc 120
gaggacgcgg agttcgccgt cgaccacggc aggccgagct ggccggaggt ggcgagcgtc 180
20 gtggcgctgg cgggtcggct gcggctggga ggcgacggcg cgcccctccg ctacctcgtg 240
tggggtgaga cgggtccggcg gctggcgctg gtgggggtgc tcgtgcaggc ggtggccgcg 300
25 ctggtcggta tcggggcggt gctgtggtct ccctcggtga cgaatccgat cccggccgac 360
gtgcagaccc tgctcggtt ggtctgggtg gcggcttata tgtgcctggt gaccggcagg 420
cggcgcgcgg cgcggtggct cgcggtgacg gcgctggctc aagcctcggg cttcttcggc 480
30 gtggatctcg tggccgtcga gggcgcgtag gggctgtccg ggaccgtcgg actcctgctg 540
gaggcgctgc cgggtgtggc actggtcgcg ttccatcggc agggcccacc ggtgaaagcg 600
35 cggccgtggc tcgtcgcgct gcttgccggt gtcggcctcc tgacggtcgc gatgtcggtc 660
acctatgtca gcgttcggc gctcgtggac tggccgggcg tggactgtgc ggcggttttc 720
gtcgccgcgg tcgtctactt gagcgtgcct cgctggggt ggcggaagtgc cgcggtgtcg 780
40 tggtcgacga cgctcgcttc gctcgcgctg gtcgcccctg tgcagcgggt cgtgacgctg 840
ctggactacc tccggctcgc ggcccgcacc gcggaactgg acatcatgat cgcgatcgcc 900
45 gccgggcaga ccgtggcggt tctggcgata tcggtgccgc tcgcgatgct cgccgtcaag 960
gccgtgcgcg cgctgccgcc ggtggctgcc cgggtga 996

<210> 21
<211> 339
50 <212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> ORF 1649

55 <400> 21

60 Met Val Leu Ala Leu Pro Phe Val Asp Gln Val Trp Gln Ile Tyr Val
1 5 10 15
Leu Ile Val Ile Leu Gln Ser Ala Ser Ala Ser Phe Thr Pro Ala Phe
20 25 30
Gln Ala Val Leu Pro Asp Leu Leu Pro Asp Glu Arg Asp Tyr Thr Lys
35 40 45
65 Ala Leu Ser Leu Ser Gln Leu Ala Ser Thr Met Glu Ser Leu Leu Ser
50 55 60
Pro Leu Leu Ala Ala Ala Val Leu Ser Leu Val Ser Phe His Trp Leu
65 70 75 80
Phe Thr Gly Thr Ser Leu Gly Phe Ala Ala Ser Ala Ala Leu Val Leu
85 90 95
70 Ser Thr Arg Ile Pro Asp Ala Ala Arg Gly Asp Arg Gly Gly Ala Trp
100 105 110
Asp Arg Thr Met Ala Gly Ile Lys Met Tyr Leu Ala Thr Pro Arg Leu
115 120 125
75 Arg Gly Thr Leu Gly Leu Asp Leu Val Val Ala Ala Ala Gly Ser Val
130 135 140

ES 2 745 975 T3

Val Met Val Asn Thr Val Asn Tyr Val Arg Asp Thr Leu Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Leu Ala Ala Asn Gly Ala Gly Thr Ile
 165 170 175
 5 Leu Ala Ala Leu Leu Leu Pro Arg Val Leu Asp Gly Ile Pro Asp Arg
 180 185 190
 Thr Val Met Leu Thr Gly Gly Gly Thr Leu Leu Ala Gly Leu Thr Gly
 195 200 205
 10 Ala Ile Ala Leu Ser Thr Val Glu His Gly Ala Ala Ala Pro Val Val
 210 215 220
 Trp Ala Val Ile Gly Leu Gly Thr Gly Leu Val Leu Thr Pro Val Gly
 225 230 235 240
 Arg Val Leu Arg Arg Ser Ser Arg Pro Ala Asp Arg Pro Ala Ile Phe
 245 250 255
 15 Ala Ala Arg Phe Ser Leu Ser His Ala Cys Trp Leu Leu Ala Tyr Pro
 260 265 270
 Ile Ala Gly Arg Leu Ala Thr Asp Ala Gly Phe Thr Val Thr Trp Leu
 275 280 285
 20 Val Leu Gly Ala Leu Gly Val Ile Gly Leu Val Thr Ala Val Arg Ala
 290 295 300
 Trp Pro Arg Asn Asp Asp Glu Asp Arg Pro Arg Pro Lys Ser Arg Pro
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Phe Glu Asp Ile Thr Gly Gln Pro Pro Ala Ala Ala Arg
 325 330 335
 25 Ala Arg Pro

<210> 22
 <211> 1020
 30 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
 <223> orf 1649

35 <400> 22

gtggtgctcg cctgcccctt cgctcgaccag gtctggcaga tctacgtcct gatcgtgatc 60
 40 ctccagtcctg cgctcggcctc gttcaccccg gcgttccagg ccgtgctccc cgatctcctt 120
 cccgacgaac gcgactacac gaaggcactg tcgctgtccc agctggcttc gacgatggag 180
 45 agcctctctca gtccgctcct ggccgcccgc gtgctcagtc tcgtgtcctt ccaactggctg 240
 ttcaccggca cttcgtctcg tttcgcggcc tccgcgcac tgggtgtgag caccgggatc 300
 ccggacgcgg cgcgcggcga ccgcggcggg gcctgggatc gcacatggc cgggatcaag 360
 50 atgtacctcg cgaccccgcg cctgcggggc accctcgcc tcgacctggt ggtcgcggcg 420
 gccggctcctg tggatcatgt caataccgtg aactacgtcc gagacaccct cggcggaaca 480
 55 cagtccgacg tcgccctgct cctggcggcc aacggcgccg gcaccatcct ggccgcgctc 540
 ctgctccccc gtgtactcga cgggatcccc gaccgcaccg tcatgtcac cggcgcgga 600
 accctgctcg ccggactgac cggcgccatc gactgtcca cagtggagca cggggccgcg 660
 60 gcgcgggtcg tatgggcccgt catcgggctc ggcaccgggc tcgtcctcac tcccgtcggc 720
 cgggtactgc gcagatccag ccgtcccgcg gaccggcccc cgatcttcgc cgcccgggtc 780
 tccctttccc acgcctgctg gctactcgcc taccgatcg ccggacggct cgccaccgac 840
 65 gccgggttca ccgtcacctg gctcgtctc ggcgactcg gcgtcatcgg cctcgtcacg 900
 gccgtccgcg cgtggccacg aaacgacgac gaggaccgac cgcggccgaa atcccgcca 960
 70 ggtcaaccct tcgaggacat caccgggcag ccaccggcgg cagcgcgcgc acggccttga 1020

<210> 23
 <211> 103
 <212> PRT
 75 <213> Amycolatopsis japonicum

ES 2 745 975 T3

<220>
<223> ORF 1650

5 <400> 23

Met Ser Leu Phe Gly His Arg Asp Tyr Arg His Leu Phe Gly Ala Gln
1 5 10 15
Leu Val Ala Leu Phe Gly Thr Gly Leu Thr Thr Val Ala Leu Gly Leu
10 20 25 30
Leu Ala Tyr Asp Leu Ala Gly Ser Asp Ala Gly Ala Val Leu Gly Thr
35 40 45
Ala Leu Ala Ile Lys Met Ile Thr Tyr Val Thr Val Ala Pro Leu Ala
50 55 60
15 Val Ala Tyr Ala Ala Thr Gly Cys Arg Ala Val Ser Ser Ser Ser Arg
65 70 75 80
Trp Thr Arg Ser Ala Arg Trp Trp Cys Ser Pro Cys Pro Ser Ser Thr
85 90 95
Arg Ser Gly Arg Ser Thr Ser
20 100

<210> 24
<211> 312
<212> ADN
25 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> orf 1650

30 <400> 24

atgtcgctgt tcggtcatcg tgactatcgg catctgttcg gggcgagct ggtcgcgctg 60
ttcggcactg gattgacgac cgtagcgctc gggctgctgg cctacgactt ggcggggtcc 120
35 gacgcgggcg ccgtcctggg caccgcgctg gccatcaaga tgatcaccta cgtcacggtg 180
gcgcgcgctg ccgtcgcgta cgccgcgacc ggggtgccg cggtttcttc ctgcgcacgc 240
40 tggacgcgat ccgcgcgctg gtggtgctcg ccctgccctt cgtcgaccag gtctggcaga 300
tctacgtcct ga 312

<210> 25
<211> 116
<212> PRT
45 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
50 <223> ORF 1651

<400> 25

Met Tyr Ala His Asp Glu Ser Gly Gly Gln Trp Ser Arg Leu Pro Pro
1 5 10 15
Asp Asp Gln Ile Glu Ala Ala Ser Thr Ala Leu Arg Met Leu Ala Asp
20 25 30
Pro Thr Arg Met Arg Met Leu Trp Leu Ile Ser Gly Glu Glu Tyr Asp
35 40 45
60 Val Ala Ser Leu Ala Ala Ala Val Gly Ile Ala Arg Pro Ala Val Ser
50 55 60
Gln His Leu Ala Lys Leu Lys Leu Ala Gly Leu Val Thr Gln Arg Arg
65 70 75 80
Asp Gly Arg Arg Ile Leu Tyr Arg Ala Arg Gly Gly His Val Arg Arg
65 85 90 95
Leu Leu Ala Glu Val Met Asn Ala Ala Asp His His Leu His Gly Ile
100 105 110
Pro Asp His Asp
70 115

<210> 26
<211> 351
<212> ADN
75 <213> Amycolatopsis japonicum

ES 2 745 975 T3

<220>
<223> orf 1651

<400> 26

5 atgtacgcac atgacgaatc aggcggccaa tgggtccggc tgccgccgga cgaccagatc 60
gaagccgcgt ccacggcggt gcggatgctc gcggatccca cccggatgcg gatgctgtgg 120

10 ctgatcagcg gcgaggagta cgacgtcgcg tcaactggcg ccgcggtggg catcgcgcggt 180
ccggcgggtgt cccagcatct ggccaagctc aagctggccg gattgggtcac ccagcgcagg 240
gacggccgcc ggatccttta ccggggccgc ggcgggcacg tccggaggct gctggcggag 300

15 gtcatgaacg cggccgatca ccaccttcac gggatccccg accacgactg a 351

<210> 27
<211> 375
<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> ORF 1652

25 <400> 27

30 Met Asp Gly Pro Asp Ala Thr Arg Ser Leu Leu Pro Ala Gly Phe Gln
1 5 10 15
Arg Tyr Gly Arg Thr Lys Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Asp Leu
20 25 30
Leu Asp Ile Ile Gly Leu Ser Glu Thr Asp Val Glu Val Tyr Asp Ala
35 40 45
Phe Ala Gly Thr Gly Ser Leu Thr Val Ala Glu Ile Arg Arg Arg Thr
50 55 60
Gly Ile Pro Gln Gln Arg Leu Leu Arg Val Leu Gly Ala Leu Thr Glu
65 70 75 80
Lys Gly Leu Leu Val Arg Leu Pro Gly Arg Ala Glu Val Tyr Ser Ala
85 90 95
40 Val Arg Pro Glu Ile Ala Leu Glu Ala Met Leu Arg Leu Lys Glu Gln
100 105 110
Glu Leu Ala Ser Ala Arg Leu Val Ala Asp Arg Leu Arg Glu Arg Tyr
115 120 125
Arg Ala Thr Ser Gly Glu Arg Ala Val Asp Leu Ile Glu Val Ile His
130 135 140

45 Gly Asp Ala Leu Ile Ala Glu Arg Ala Asp Gln Leu Leu Arg Ser Ala
145 150 155 160
Glu Arg Glu Val Ala Phe Val Asp Lys Pro Tyr Ala Arg Thr Pro
165 170 175
50 Ser Val Leu His Pro Ala Glu Arg Asp Leu Leu Gly Arg Gly Val Arg
180 185 190
Phe Arg Gly Val Tyr Glu Arg Ser Ala Leu Glu Met His Asp Leu Ser
195 200 205
Ser Asp Leu Glu Ala Gly Leu Ala Leu Gly Glu Glu Ala Arg Val Val
210 215 220

55 Thr Ser Ala Pro Leu Lys Met Ile Val Val Asp Gln Arg Val Gly Leu
225 230 235 240
Val Pro Leu Arg Ser Asp Arg Pro Glu Val Gly Ala Ala Leu Val Ile
245 250 255
60 His Pro Cys Ala Leu Leu Asp Ala Leu Gly Ala Val Phe Ala Phe Leu
260 265 270
Trp Gln Ser Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ala Glu Leu Ala
275 280 285
Asp Val Ala Pro Ser Asp Asp Ala Arg Leu Leu Ala Leu Leu Thr Thr
290 295 300

65 Gly Leu Pro Asp Arg Ser Ile Ala Lys Gln Leu Gly Met Ser Tyr Arg
305 310 315 320
Thr Phe Gln Arg Arg Leu Arg Asp Leu Met Thr Ala Leu Gly Ala Thr
325 330 335
70 Thr Arg Phe Gln Ala Gly Leu Gln Val Ala Thr Arg Gly Trp Val Thr
340 345 350
Leu Pro Ser Thr Gln Pro Pro Ile Glu Asp Asp Val Ser Glu Arg Ala
355 360 365
75 Gly Ser Pro Ser Pro Arg Pro 375

ES 2 745 975 T3

<210> 28
 <211> 1128
 <212> ADN
 5 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 <223> orf 1652

 10 <400> 28

 gtggacggtc cggacgcgac gcgggtccett ttgcccgcgc gattccagcg gtatggtcgcg 60
 acgaaggcga ccgcgggtgc ggccggagac gatttgcctg acatcatcgc tctgagtga 120
 15 accgacgtcg aggtctacga tgccttcgcc ggcaccggtt cgctgaccgt ccccgaaatc 180
 cggcggcgaa ccgggattcc gcaacaacgg ctgctgcgcg tactggggcg gctgacggaa 240
 20 aaaggtttgc tcgtcaggct tcccggcccg gcggaggtgt attcggcggg gcggccggag 300
 atcgcgctgg aggcgatgct ccggctgaag gaacaggaac tcgcgagcgc gcggtggtc 360
 gccgaccggt tgcgcgagcg gtaccgggcg acgtccggcg aacgcgcggg cgatctcatc 420
 25 gaagtgatcc acggcgacgc gctgatcgcc gagcgggccc atcagctgct gcgctcggcc 480
 gagcgggagg tcgccttcgt cgacaaacgg ccttacgcgc gaacgccgag tgtgctgcat 540
 30 cccgccgaac gtgatctcct cggccggggg gtgcgctttc gcgggggtta cgagcgcagt 600
 gcgctggaaa tgcacgacct gtcacccgac ctggaggcag gcctcgcgct cggcgaggag 660
 gcccgcgctg tcaccagcgc cccgctcaag atgatcgtg tcgaccagcg cgtcggactg 720
 35 gtaccactgc ggtccgatcg ccccgaggtc ggccgcggct tggatgatcca cccgtgcgca 780
 ctgctcgacg cgtcggcgcc ggtcttcgct ttcctttggc agagcgggct tccgctgcgc 840
 40 ctgcccgggt cggccgaact ggccgacgct gcccttccg acgacgcccg cctgctcgcc 900
 ttgctgacca cgggcctgcc ggaccggagc atcgccaaac aactcggcat gagctaccgg 960
 accttccagc gacgggtccg cgacctcatg accgcgctcg gcgcgaccac ccggttccag 1020
 45 gccgggcttc aggtcgccac gcgggggttg gtcaccttgc cgtcgaccca acccccgatc 1080
 gaggacgacg tcagcgagcg cgcgggttcg ccttcgccac gtccgtga 1128

 50 <210> 29
 <211> 1347
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum

 55 <220>
 <223> ORF 1653

 <400> 29

 60 Met Phe Pro Arg Ser Pro His Leu Thr Arg His Pro Trp His Pro Val
 1 5 10 15
 Ala Ile Leu Ala Ala Ser Ala Leu Val Ala Leu Thr Pro Leu Pro Val
 20 25 30
 Ile Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Val Ser Gly Pro Ala Pro Val Thr
 35 40 45
 65 Gly Arg Pro Asp Val His Arg Val Thr Leu Leu Thr Gly Asp Val Val
 50 55 60
 Thr Tyr Glu Arg Asp Gly Ala Gly His Gly Thr Ala Gln Val Glu Pro
 65 70 75 80
 70 Ala Val Arg Pro Asp Arg Pro Ser Pro Ala Phe Gln Ile Thr Thr Thr
 85 90 95
 Ala Glu Gly Leu Met Val Tyr Pro Ser Asp Ala Leu Pro Phe Val Gly
 100 105 110
 75 Lys Gly Leu Leu Ser Pro Asp Leu Phe Asn Val Thr Thr Leu Val Gly
 115 120 125

ES 2 745 975 T3

	Asp	Arg	Arg	Asp	Asp	Ala	Ala	Ser	Thr	Thr	Ile	Pro	Val	Ile	Val	Arg
	130					135					140					
	Tyr	Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Asp	Ala	Lys	Ala
	145					150					155					160
5	Lys	Ala	Leu	Pro	Gln	Thr	Gln	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Ala	Asn
					165					170					175	
	Gly	Val	Gly	Val	Gln	Val	Lys	Lys	Ala	Gly	Thr	Gly	Glu	Phe	Trp	Arg
				180						185				190		
10	Ser	Leu	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Pro	Val	Leu	Asn	Gln	Gly
		195						200					205			
	Ile	Ser	Gln	Val	Arg	Leu	Asp	Arg	Lys	Val	Arg	Val	Thr	Leu	Asp	Lys
	210						215					220				
	Ser	Thr	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Pro	Ser	Ala	Trp	Ser	Gly	Gly	Trp	Thr
	225				230					235						240
15	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Glu	Asn
				245						250				255		
	His	Pro	Asp	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Asp	Phe	Ser	Gly
			260						265					270		
20	Glu	Gly	Asp	Val	Val	Asp	Arg	His	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Ser
		275						280					285			
	Ile	Val	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Arg	Tyr	Lys	Gly	Val
	290					295						300				
	Ala	Pro	Asp	Ala	Asn	Leu	Val	Val	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Ala	Ser	Gly
	305				310						315					320
25	Glu	Gly	Asp	Thr	Ala	Gln	Val	Met	Ala	Gly	Ile	Asp	Trp	Ala	Val	Ala
				325						330				335		
	Gln	Gly	Ala	Lys	Ile	Val	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ala	Gly	Val	Ser	Asp
			340					345						350		
30	Gly	Ala	Asp	Pro	Met	Ser	Glu	Gln	Ile	Asp	Ser	Leu	Ser	Ala	Lys	Ser
		355					360						365			
	Gly	Thr	Leu	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Asp	Arg
	370					375						380				
	Thr	Val	Thr	Thr	Pro	Gly	Ala	Ala	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Gly	Ala
	385				390					395						400
35	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Lys	Ile	Ala	Trp	Phe	Ser	Ser	Arg	Gly	Pro	Arg
				405					410					415		
	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	Val	Lys	Pro	Glu	Ile	Thr	Ala	Pro	Gly	Val	Gly
			420						425					430		
40	Ile	Val	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Leu	Gly	Glu	Pro	Val	Asp
		435						440					445			
	Asp	Ser	Tyr	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val
	450					455						460				
	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Thr	Gly
	465				470					475						480
45	Gln	Ala	Leu	Lys	Asn	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Ala	Lys	Asp	Val	Gly	Leu
				485					490					495		
	His	Trp	Phe	Glu	Gln	Gly	Ala	Gly	Ile	Leu	Asp	Val	Ala	Arg	Ala	Val
			500						505					510		
50	Ser	Gln	Lys	Ala	Thr	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Ser	Phe	Gly	Arg	Asn	Glu
		515						520					525			
	Arg	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Ala	Gln	Val	Val	Arg	Gln	Leu	Ser	Tyr	Thr
	530					535						540				
	Asn	Thr	Gly	Asp	Gln	Pro	Leu	Asn	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Thr	Val	Arg
	545				550						555					560
55	Pro	Trp	Asp	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	Thr	Gly	Met	Arg	Leu	Ala	Lys
			565						570					575		
	Thr	Asp	Leu	Ser	Ile	Pro	Pro	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Ala
			580						585					590		
60	Val	Asn	Pro	Asn	Glu	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Tyr	Gly	Gly	Ala	Val	Val
		595						600					605			
	Ala	Thr	Thr	Ala	Asp	Gly	Thr	Asn	Ala	Val	Arg	Thr	Pro	Val	Ser	Thr
	610					615						620				
	Tyr	Asn	Ala	Ala	Glu	Leu	Phe	Pro	Val	Thr	Ile	Arg	Val	Arg	Asp	Ser
	625				630						635					640
65	Ala	Gly	Gly	Pro	Ala	Gln	Ser	Ala	Ser	Ala	Gln	Leu	Ile	Asp	Asp	Ala
				645						650				655		
	Ala	Gly	Ala	Gly	Asn	Arg	Asn	Asp	Pro	Phe	Leu	Asp	Gln	Val	Ser	Gln
			660						665					670		
70	Gln	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Gly	Arg	Val	Leu	Val	Pro	Ala	Gly
		675						680					685			
	Arg	Tyr	Ser	Ala	Leu	Gly	Trp	Val	Met	Glu	Arg	Gly	Leu	Thr	Val	Arg
	690					695						700				
	Arg	Trp	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Thr	Gln	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Pro	Ala
	705				710						715					720
75	Glu	Ile	Ala	Leu	Asn	Ala	Ala	Asn	Ala	Val	Pro	Ala	Gly	Leu	Ile	Thr

ES 2 745 975 T3

				725					730				735				
	Pro	Thr	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Asp	Arg	Thr	Val	Met	Leu	Arg	Arg	Val	
				740					745					750			
5	Ile	Pro	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Asn	Gly	Tyr	Val	Gly	Glu	Ala	Gly	Leu	
			755					760					765				
	Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Trp	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Ala	Thr	
			770				775					780					
	Ser	Ala	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	Ala	Thr	Leu	Ser	Gln	Thr	
	785					790					795					800	
10	Ala	Val	Glu	Met	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Asn	Pro	
					805					810					815		
	Ala	Tyr	Asp	Val	Pro	Thr	Leu	Thr	Ala	Lys	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Thr	
				820					825					830			
15	Leu	Pro	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Val	
			835					840					845				
	Arg	Gly	Lys	Ala	Val	Leu	Val	Arg	Ile	Pro	Val	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	
			850				855					860					
	Asp	Pro	Val	Ser	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Ile	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Ala	
	865					870				875						880	
20	Val	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Leu	Ile	Pro	Tyr	Ala	Gly	Ser	Pro	
					885					890					895		
	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Pro	Gly	Leu	Ser	Ser	Ala	Val	Val	Pro	Thr	Leu	
					900				905					910			
25	Ser	Leu	Gly	Trp	Asp	Glu	Gly	Glu	Lys	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Ala	Val	
			915					920					925				
	Ser	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Ser	Ala	Pro	Asp	Ala	Met	Tyr	Asn	Leu	
			930				935					940					
	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Pro	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Arg	Val	
					950						955					960	
30	Asp	Gln	Lys	Thr	Leu	Val	Ala	Thr	Lys	Thr	Gly	Tyr	Gln	Ala	Glu	Lys	
					965					970					975		
	Pro	Gly	Leu	Thr	Gly	Gln	Lys	Asn	Trp	Tyr	Ala	Phe	Pro	Thr	Gly	Leu	
					980				985					990			
35	Trp	Lys	Thr	Gln	Ala	Val	Gln	Gly	Thr	Lys	Ile	Pro	Val	Pro	Gly	Ser	
			995					1000					1005				
	Trp	Thr	Glu	Tyr	Thr	Gly	Pro	Ala	Asn	Asp	Arg	Leu	Val	Trp	Lys	Arg	
			1010				1015					1020					
	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Gly	Asn	Asp	Thr	Ala	Gly	Arg	Arg	Ala	Ala	Leu	
					1030					1035						1040	
40	Ser	Met	Asn	Ala	Gln	Asn	Val	Tyr	Arg	Ala	Gly	Glu	Arg	Ser	Arg	Pro	
					1045					1050					1055		
	Asp	Glu	Phe	Trp	Phe	Arg	Ala	Pro	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	
					1060				1065					1070			
45	Pro	Ala	Asp	His	Pro	Ala	Arg	Tyr	Pro	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	
			1075					1080					1085				
	Val	Leu	Cys	Ser	Met	Cys	Arg	Gly	Gly	Thr	Asp	Pro	Asp	Leu	Phe	Leu	
			1090					1095				1100					
	Pro	Gly	Leu	Gln	Trp	Met	Asp	Gly	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	His	Tyr	
					1110					1115					1120		
50	Ala	Asn	Pro	Tyr	Glu	Asn	Ala	Arg	Tyr	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Arg	
					1125					1130					1135		
	Leu	Tyr	Arg	Asp	Gly	Thr	Glu	Ile	Pro	Arg	Ser	Asn	Ala	Asp	Asp	Pro	
					1140				1145					1150			
55	Leu	Ala	Leu	Ile	Pro	Glu	Phe	Arg	Leu	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Thr	Tyr	
			1155					1160					1165				
	Arg	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	Val	Leu	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Val	Gly	Ile	
			1170				1175					1180					
	Pro	Ser	Gly	Ala	Leu	Phe	Gln	His	Ala	Pro	Arg	Thr	Asp	Thr	Ser	Trp	
					1190					1195						1200	
60	Thr	Phe	Ala	Ser	Ala	Arg	Ser	Asp	Ala	Ala	Pro	Leu	Gly	Phe	Ser		
					1205					1210				1215			
	Cys	His	Asn	Ala	Gly	Lys	Ser	Cys	Ser	Phe	Gln	Pro	Leu	Ile	Gln	Leu	
					1220				1225					1230			
65	Asp	His	Arg	Leu	Pro	Leu	Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Ala	Gly	Arg	
			1235					1240					1245				
	Pro	Phe	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	His	Ser	Gly	Ala	Arg	Gly	
			1250					1255				1260					
	Gly	Gly	Pro	Val	Thr	Arg	Leu	Gln	Val	Ser	Ala	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	
					1270					1275					1280		
70	Arg	Thr	Trp	Thr	Ala	Ala	Thr	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Trp	
					1285					1290					1295		
	Ser	Val	Thr	Val	Ala	His	Pro	Pro	Leu	Ala	Ala	Thr	Asp	Gly	Phe	Val	
					1300				1305					1310			
75	Trp	Leu	Arg	Ser	Glu	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Thr	Gln	
			1315					1320					1325				

ES 2 745 975 T3

Thr Val Gln Arg Ala Tyr Ala Leu Thr Asp Val Ala Lys Ala Asn Pro
 1330 1335 1340
 Arg Ala Arg
 1345

5
 <210> 30
 <211> 4044
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

10
 <220>
 <223> orf 1653

15
 <400> 30

atgttccccc gttcccctca cctgacgaga cacccttgge acccggtggc gatcctggcg 60
 gcctccgcac tggtcgccct cacccttca cgggtgatcg cgaccgccgc gaccgccgcc 120
 gtatccggcc ccgctcccgt caccggggcg cgggacgtcc atcgcgtcac gttgctcacc 180
 ggcgacgtgg tgacctacga acgagacggc gccgggcacg gcaccgcaca ggtcgaaccg 240
 gcggtgcggc cggaaccggc gagcccgcg ttccagatca cgaccacggc cgaagggctg 300
 atggtgtatc cgtcggacgc gcttccgttc gtcggcaagg gactgctgag cccggacctg 360
 ttcaacgtca ccacgctcgt cggagaccgg cgtgacgacg cggcgagcac cacgatcccc 420
 gtcacgtgc gttacggcga ccggctgggg ctgtccgccc ggactctgga cgcgaaggcg 480
 aaggcgctcc cgcagaccca gcggctcacc ccgctggtca cggccaacgg agtgggggtt 540
 caggtcaaga aagcggggac gggcgaattc tggcgctccc tcgtcgcggt cgatgcgagc 600
 gggaaaccgg ttttgaacca agggatttcg caagtccggc tggacaggaa ggtccgggtg 660
 acgctggaca agagcacccg gcgggtcggg gcgccgtcgg cgtggagcgg tgggtggacc 720
 gggaagggga ccacggtcgc ggtggtggac accgggatcg acgagaacca tcccgaacctg 780
 gcgggcaaga cggtcgcctc cgcggacttc agcggcgagg gcgacgtcgt ggaccgccac 840
 ggccacggca cgcacgtcgc gtcgatcgtc gccggtaccg gcgcggcatc gggcggccgg 900
 tacaaggggtg tggcaccgga cgcgaatctg gtggtggcca aggttttcga cgcgtccggc 960
 gagggtgaca ccgcacaggt gatggccggg atcgactggg ccgtcgcgca gggcgcgaa 1020
 atcgtgaacc tcagcctcgg gcgccgctc agcgacgggg ccgaccgat gagcgagcag 1080
 atcgactcgc tttcggcgaa gtccggcacg ctgttcgtgg tcgcggccgg gaactcgggg 1140
 ccgggcgacc ggacagtac gacaccgggg gcggcgacgt ccgcgctcac cgtcggagcg 1200
 ctcgaccggg aggacaagat cgcgtggttc agcagccggc gcccgcggtt gcgggacgcc 1260
 tcggtcaaac cggagatcac cgcgccgggc gtcgggatcg tcgccgccag ggtcgggac 1320
 acggcgctgg gcgaaccggt ggacgactcc tacaccgccg cgtcgggcac ctcaatggcg 1380
 acaccgatg tcggggcgcc cgcggcgatc ctgctgcagc agcgaccggg actgaccggg 1440
 caggcactga agaaccacct cgtcaccacg gccaaaggac tcggtcttca ctggttcgag 1500
 cagggcgccg gaatcctcga cgtcgcgcg gccgtgtctc agaaggcgac cggcaccgcc 1560
 gtcgagagct tcggccgcaa cgaacggacg accaacgcct cggcacaggt cgtccggcag 1620
 ctgtcctaca ccaacaccgg ggaccagccg ctgaacctca acctgaagct gaccgtgcga 1680
 ccttgggacg gcggcgccgc gccgggtacc gggatgcgcc tggcgaagac ggatctgtcg 1740
 atcccgcga agtcgagtac caccgtcgac ctgcgcgtga acccgaacga aggaacggcg 1800

75

ES 2 745 975 T3

	ggcgtctacg gcggcgccgt ggtggccacg accgcggacg ggaccaacgc ggtgcggact	1860
	cccgtagaca cctacaacgc ggccgaactg ttcccggatga cgatccgggt cggggactcg	1920
5	gcggggcgggc ccgctcagtc cgcgtcggcc cagctgatcg acgacgcggc cggtagcgggt	1980
	aaccgcaacg acccgttcct cgaccaggtc agccagcagg tcggcctggt ggacggggtc	2040
10	ggccgggtgc tcgtgccagc cggacgctat tcggcgctcg gctgggtgat ggagcgcggg	2100
	ctgacggtgc gccgctggtc ggcgatgagc gcgacgcagg tcgctgtcag cggcccggcg	2160
	gagatcgcgc tgaacgcggc gaacgcgctc ccggcggggc tgatcacgcc cactcccacc	2220
15	gatctgcggg atcgcacggt gatgctgcgg cgcgtgatcc ccggcggagc cgggtgtgaac	2280
	ggttacgtcg gcgaagccgg gctggcttcg ggcgcgggct gggagggtgc cgtgaccccc	2340
20	gcggccgcca cctcggcggg cgcgatttcg ttgcaggaca gcgcgacact gtcccagacc	2400
	gcggtcgaga tcgggatcgt cggtagcggt ccggccgtgc tgaaccggc gtacgacgtg	2460
	ccgacgttga cggcgaagtc gcccggtgag cgaacgctgc cggtcgtgtt cggtagcgcg	2520
25	ggtgatctca ccggtctcga cgtccgcgga aaggccgtcc tggttaaggat tccggtcccg	2580
	gccggggcac cggacccggt gagcgcggtc tcgcgggca tcgcgaacgc ttcacgcgcg	2640
30	gtgtccgcgc cgggtggggc ggcgttgatc ccctacgcgc gttctccggg ttcgctgagc	2700
	gttccgggtc tcagcagcgc ggtggtgccg accttgctcc tcggctggga cgaaggcgaa	2760
	aagttgcgga ccgcgggtgc cgtttcggtg cgttgctgg tgcgctcggc tccggacgcg	2820
35	atgtacaacc tcagctatct cgacgccaac ggctgcca aggagctcgt ccggcgggtc	2880
	gaccagaaga ccttggtcgc cacgaaaacc ggctaccagg ccgaaaaacc gggactgacc	2940
40	ggacagaaga actggtacgc cttcccagacc ggctgtgga agacacaggc ggtgcagggc	3000
	acgaagatcc cggttcccgc ctccgggacc gaatacaccc gcccgcgaa cgatcggctg	3060
	gtctggaaac gggtcgtcac cctgtccggc aacgacacc cggggcgccg cgcgcgctg	3120
45	agcatgaacg cgcagaacgt ctaccgcgcg ggcgagcggc cgagaccgga cgagttctgg	3180
	ttccgcgcgc cactgcacag cggcacggtg gaactgcccg ccgatcatcc ggcccggtag	3240
50	ccggcgacgg cctccggtg ggcggtgctg tgctcgatgt gccgtggtgg cacggatccc	3300
	gacctgttcc tccccgcct cgagtggatg gacggcacga ccggggcggg cgggcattac	3360
	gcgaatccct acgagaacgc gcggtacttc gcggcgacca cggcacggct gtaccgggac	3420
55	gggaccgaga tcccgcggtc caatgcggac gatccgctcg cgctcatccc ggagttccgg	3480
	ctcgcgccga cccccgccac ctaccggctg gacgtgaccg acgtgctgcc cggccaggcg	3540
60	caggtcggca tcccgagcgg ggcgctgttc cagcacgcc cgaggacgga cacgtcgtgg	3600
	acgttcgcct cggcgcggtc agacgcgcg gcaccgctcg gcttctctg ccacaacgcg	3660
	ggcaagtcgt gttccttcca gccactcatc cagctggacc accggttgcc gctcgatctc	3720
65	ggcggccgcg ccccggccgg acgcccgttc accttcgacg tgctccgcgg ctcgcacagc	3780
	ggcgcgcggg gcggcgacc ggtgacgcgg ctgcaggtgt cggcgctgac ggacggcggg	3840
70	cgtacctgga cggcgcgac cgtccggccg ggcggaacg ggctgtggtc ggtgacggtg	3900
	gccacccgc cactcgcggc gacggacggg ttcgtctggc tgcgctcgga agcacgggac	3960
	agctcgggca acaccgtgac gcagacggtc cagcgggcct acgcgctcac ggacgtggcg	4020
75	aaggcgaacc cgcgcgctcg ctga	4044

ES 2 745 975 T3

<210> 31
 <211> 197
 <212> PRT
 5 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 <223> ORF 1654

 10 <400> 31

 Met Leu Ala Met Gly Met Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Glu Gly Thr Glu Ala Ala Pro Leu Val Ser Ser Thr Val Val Ile
 15 20 25 30
 Asn Glu Val Ser Thr Arg Gly Val Asn Gly Leu Leu Asp Glu Phe Ile
 35 40 45
 Glu Leu Arg Asn Val Ser Asn Gln Pro Gln Asp Val Ser Gly Tyr Val
 50 55 60
 20 Ile Arg Ile Tyr Ser Pro Ser Asn Val Val Thr Asp Thr Ile Val Leu
 65 70 75 80
 Pro Ala Gly Thr Ile Leu Gln Pro Lys Gly Asn Ala Gly Gln Tyr Ala
 85 90 95
 Val Leu Val Gly Gln Asn Phe Ser Gly Thr Val Val Asp Gln Thr Tyr
 100 105 110
 25 Val Ile Pro Phe Thr Leu Thr Gly Ala Glu Gly Ile Pro Thr Ala Gly
 115 120 125
 Gly Leu Ser Leu Gln Asn Met Ala Ala Ala Lys Ile Asp Gly Val Ala
 130 135 140
 30 Phe Ser Asn Ala Val Val Ala Pro Arg Glu Gly Gln Ala Ala Ile Pro
 145 150 155 160
 Glu Asn Val Ile Thr Asp Gln Leu Asn Ala Ala Asn Thr Arg Asn Ile
 165 170 175
 35 Leu Ser Thr Asp Thr Asp Asn Asn Arg Gln Asp Phe Ser Leu Gln Leu
 180 185 190
 Arg Thr Pro Gly Leu
 195

 <210> 32
 40 <211> 594
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 45 <223> orf 1654

 <400> 32

 atgctggcga tgggtatggc cgggtggtgtc gcgaacgcgg caggcgagag cgagggcacc 60
 gagggccgcc cgctcgtgtc gtccaccgtg gtcatacaac aggttttcgac ccgcggcggtg 120
 aacgggtctgc tcgacgagtt catcgagctg cgcaacgttt cgaaccagcc gcaggacgtg 180
 55 agcggctacg tgatccggat ctactcgcg tcgaacgtcg tgaccgacac gatcgtcctg 240
 ccggcgggca cgatcctgca gccgaagggc aacgcggggc agtacgcggt gtcgctcggg 300
 cagaacttct ccggcaccgt cgtcgaccag acctacgtca tccccttcac cctgaccggc 360
 60 gccgagggca tcccgcaggc cgggtggcctt tcgctgcaga acatggcggc cgcgaagatc 420
 gacggtgtgg ccttcagcaa gcgcgtcgtg gccccgcgtg aaggccaggc cgcgatcccg 480
 65 gagaacgtca tcaccgatca gctcaacgcg gcgaacaccc gcaacatcct gagcaccgac 540
 accgacaaca accggcagga cttctcgtg cagctgcgca ccccggttct gtaa 594

 <210> 33
 70 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 75 <223> ORF 1655

ES 2 745 975 T3

<400> 33

5 Met Thr Ala Asn Ser Glu Arg Gly Ala Ala Ala Pro Leu Cys Glu Leu
1 5 10 15
Leu Ala Glu Gln Arg Ile Ala Lys Gly Trp Ser Gln Gly Asp Leu Val
20 25 30
Val Lys Leu His Thr Arg Ser Gly Asn Asp Ser Val Thr Arg Glu Glu
35 40 45

10 Ile Ser Arg Trp Glu Arg Gly Lys Arg Ile Pro Gly Pro Tyr Trp Arg
50 55 60
Gln Trp Leu Ser Asp Val Leu Asp Thr Ser Ser Arg Glu Leu Glu Leu
65 70 75 80
Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Asn Ile Ile Ala
15 85 90

<210> 34
<211> 285
<212> ADN
20 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> orf 1655

25 <400> 34

gtgaccgcga acagcgaacg cggggccgcg gccccgcttt gcgaactgct cgccgaacaa 60
cgaatcgcga aaggatggtc acaaggcgat ctggctcgtga agttgcacac ccgctccggc 120
30 aacgacagtg tcaccaggga agagatttcc cgctgggagc ggggaaaacg cattcccggc 180
ccctattggc ggcagtggct cagcgatgtg ctggacacct ccagccgcga gctcgaactc 240
35 gccgcgcgg tcgcgagaag gcggcgccgg aacattatcg cgtga 285

<210> 35
<211> 166
<212> PRT
40 <213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> ORF 1656

45 <400> 35

Met Thr Lys Pro Gly Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ala Leu Ala Gly Thr
1 5 10 15
50 Pro Ala Pro Asp Thr Val Arg Ala Ser Ser Ala Lys Ile His Glu Val
20 25 30
Leu Gly Gly Pro Ala Gly Tyr Ile Asp Leu His Asn Thr Gly Ala Thr
35 40 45
Thr Leu Asp Ile Gly Gly Trp Ser Val Gln Ala Cys Thr Gly Gly Ala
50 55 60
55 Thr Pro Val Glu Leu Ala Ala Met Pro Ala Gly Ser Glu Ile Pro Ala
65 70 75 80
Gly Asp His Phe Leu Ile Thr Ala Gln Gly Phe Gly Gly Thr Met Gln
85 90 95
60 Gln Val Val Val Glu Ala Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Leu Leu Asp
100 105 110
Arg Arg Gly Ala Arg Val Asp Ser Val Gly Trp Ala Pro Ser Ser Pro
115 120 125
Cys Arg Glu Asn Gln Ala Ala Val Ser Cys Pro Gly Leu Ala Gln Ser
130 135 140
65 Arg Asp Ala Val Ser Arg Asp Thr Asp Asn Asn Lys Ala Asp Phe Gly
145 150 155 160
Cys Val Arg Pro Ala Gly
165

70 <210> 36
<211> 501
<212> ADN
<213> Amycolatopsis japonicum

75 <220>

ES 2 745 975 T3

<223> orf 1656

<400> 36

5 atgacgaagc cagggttccct gttcctgctc ctcgcactcg ccggaacccc ggccccggac 60

accgtccggg cttcgtcggc caagatccac gaggtgctcg gcggcccggc aggctacatc 120

gacctgcaca acaccggcgc caccaccctt gacatcggcg gctgggtcgt tcaggcgtgc 180

10 acgggcgggg cgacaccgt cgaactggcc gccatgcccc ccgggagcga gatccccgcc 240

ggtgaccatt tcctcatcac cgcacagggt ttcggcggga cgatgcagca ggtggtcgtc 300

15 gaggctatcg tcggggacgg cgagatactg ctggaccggc gcggggcgag ggtcgacagc 360

gtcggatggg cgccgtcgtc gccctgccgc gagaaccagg ccgccgtctc ctgccccggg 420

ctcgcccagt cgagggacgc cgtcagccgc gacaccgaca acaacaaggc cgacttcggc 480

20 tgtgtacggc cggccggctg a 501

<210> 37

<211> 231

25 <212> PRT

<213> Amycolatopsis japonicum

<220>

<223> ORF 1657

30 <400> 37

Met Asn Arg Val Thr Thr Leu Val Val Asp Asp Gln Pro Leu Ile Arg

1 5 10 15

35 Tyr Ala Leu Ser Arg Leu Leu Arg Asp Ser Ala Gly Val Gly Ala Val

20 25 30

Ala Glu Ala Ala Ser Glu Pro Glu Ala Leu Trp Gln Cys Glu Lys Ser

35 40 45

40 His Pro Asp Met Val Ile Thr Glu Leu Ser Ile Trp Gly Glu Pro Ala

50 55 60

Gly Thr Ala Ile Cys Arg Phe Val Lys Glu Gln Phe Glu Arg Ala Ala

65 70 75 80

Val Leu Val Phe Ala Gly Asp Ser Ser Pro Ser Ala Ile Ala Met Ala

85 90 95

45 Leu Asn Ala Gly Ala Asp Ser Phe Val His Lys Ser Ala Ser Gly Gly

100 105 110

Gln Val Met Ser Ala Val Arg Ser Thr Leu Ala Gly Gln Arg Val Cys

115 120 125

50 Leu Gln Ala Gly Gly Thr Pro Pro Ala Val Thr Glu Ala Val Arg Tyr

130 135 140

Ala Ser Ala Met Thr Arg Arg Glu Glu Glu Ile Leu Ala Leu Ile Leu

145 150 155 160

Tyr Arg Trp Ser Asn Asp Glu Ile Ala Glu Glu Leu His Leu Ala Thr

165 170 175

55 Gln Thr Val Lys Asn Tyr Val Ser Arg Ile Leu Gln Lys Leu Gly Phe

180 185 190

Gly Ser Arg Arg Asp Leu Phe Arg Ala Leu Arg Phe Arg Pro Gly Gly

195 200 205

60 Asn Leu Leu Pro Arg Leu Glu Thr Thr Glu Arg Glu Gly Glu Leu His

210 215 220

Thr Ala Asp Gly Tyr Arg Gly

225 230

<210> 38

65 <211> 696

<212> ADN

<213> Amycolatopsis japonicum

<220>

70 <223> orf 1657

<400> 38

atgaaccgcg tcaccacgct cgtagtagac gatcaacccc tcatcagata cgcgctcagc 60

75

ES 2 745 975 T3

	aggctgttgc gggattcggc gggggtgggg gcggtggccg aagccgcgag tgagcctgaa	120
	gcgttgtggc agtgcgaaaa gagccatccc gacatggtea tcaccgagct gtcgatctgg	180
5	ggtgagcctg ccgggaccgc gatctgccgg ttcgtgaagg aacagttcga acgcgctgcc	240
	gtcctggtct tcgccggtga ttcgtcgcca tcggccatcg cgatggcgct gaacgcgggt	300
10	gcggacagct tcgtgcacaa gtcggccagc ggccggccagg tgatgtcggc ggtgcgctcg	360
	acgctcgcgg gccagcgggt gtgcctgcag gcgggcggaa ccccgccggc ggtcaccgag	420
	gccgtgcgct acgcgagcgc gatgaccaga cgggaggagg agatcctcgc gctgacctc	480
15	taccggtggt cgaacgacga gatcgccgag gaactgcata tcgccacgca gaccgtgaag	540
	aactacgtca gccggatcct gcagaactcg ggcttcggca gcagacgca cctcttcggt	600
20	gcgctgcgtt tccggccggg cggaacactg ttgccgcgcc tggagacgac cgagcgcgaa	660
25	ggcgagttgc acacggcgga cgggtaccgg ggctag	696
	<210> 39	
	<211> 139	
	<212> PRT	
	<213> Amycolatopsis japonicum	
	<220>	
	<223> ORF 1658	
30	<400> 39	
	Met Asp Asp Ser Tyr Arg Leu Glu Ala Gly Ser Pro Ser Val Asp Asp	
35	1 5 10 15	
	Tyr Leu Arg Leu Arg Arg Glu Ala Gly Leu Ser Glu Pro Pro Arg Glu	
	20 25 30	
	Gln Ala Glu Arg Gly Val Arg Gly Ala Trp Thr Ser Val Arg Val Val	
	35 40 45	
40	His Arg Pro Thr Gly Glu Thr Val Gly Met Gly Arg Val Ile Ser Asp	
	50 55 60	
	Gly Gly Trp Tyr Phe His Ile Val Asp Met Ala Val Leu Pro Ala His	
	65 70 75 80	
	Gln Arg Arg Gly Ile Gly Asp Ala Val Leu Glu Ala Leu Leu Ala Ala	
	85 90 95	
45	Ile Asp Thr Ala Ala Pro Gly Ala Tyr Val Asn Leu Leu Gly Asp Pro	
	100 105 110	
	Pro Gly Trp Arg Leu Tyr Lys Arg His Gly Phe Val Glu Thr Ala Pro	
	115 120 125	
50	Gly Thr Ile Gly Met Arg Arg Gln Asn Ala Gly	
	130 135	
	<210> 40	
	<211> 420	
	<212> ADN	
55	<213> Amycolatopsis japonicum	
	<220>	
	<223> orf 1658	
60	<400> 40	
	atggacgact cttaccgcct ggaagcaggc tccccgtcgg tcgacgacta cctgcggctg	60
65	cgccgcgagg ccggtctcag cgaaccgccg agggaaacagg cggagcgagg ggttcgcggc	120
	gcctggacgt ccgtccgggt ggtccaccgg cccaccggcg agaccgtcgg gatgggccgg	180
	gtgatcagcg acggtgggtg gtacttcac atcgtcgaca tggccgttct gcccgccat	240
70	cagcgccgcg gcatcgggga cgccgtcctc gagggccttc tcgcgcgat cgacaccgcg	300
	gcgcccgggtg cgtacgtcaa tctgctcggc gatccaccgg gatggcggct ctacaaacgc	360
75	cacggtttcg tggagaccgc tcccgggacc atcggcatgc ggccgcaaaa cgccggataa	420

ES 2 745 975 T3

<210> 41
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum
 5
 <220>
 <223> ORF 1659
 <400> 41
 10
 Met Thr Val Thr Thr Leu Arg Pro Gly Leu Pro Glu Leu Ile Lys Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Gln Cys Thr Gly Arg Pro Ser Glu Pro Leu Val Thr Ala Gln
 20 25 30
 15
 Ala Val Ala Asn Val Leu Thr Glu Leu Arg Pro Thr Pro Gln Leu Leu
 35 40 45
 Thr Ala Thr Glu Arg Ala Gly Ser Pro Asp Gly Tyr Thr Arg Thr Thr
 50 55 60
 20
 Leu His Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Val Gly Leu Val Trp Arg Pro
 65 70 75 80
 Gly Gln Leu Thr Glu Ile His Asp His Leu Val Trp Cys Thr Phe Leu
 85 90 95
 Val Leu Gln Gly Thr Glu Thr Glu Thr Ile Phe Asp Ile Asp Asp Asp
 100 105 110
 25
 Arg Leu Val Arg Lys Ala Gln Arg Gln Arg Pro Ala Gly Ser Val Ser
 115 120 125
 Gly Val Ala Pro Pro Asp Asp Ile His Gln Val His Asn Ala Gly Asp
 130 135 140
 30
 Thr Val Ala Ile Thr Leu His Val Tyr Gly Ala Asp Leu Ser Lys Gly
 145 150 155 160
 Thr Ser Val Arg Arg Asn Tyr Arg Met Arg Ala Thr Ser Arg
 165 170
 <210> 42
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum
 <220>
 <223> orf 1659
 <400> 42
 45
 atgaccgtca cgaccctcag accaggcctt ccggagctga tcaaacgtct ggcccaatgc 60
 accggaagac catccgaacc ccttgctcacc gcacaagccg tggcgaacgt tctcaccgaa 120
 ctccgcccga ctccgcaact gctcaccgcg acggaacgcg ccggctcccc cgacggctac 180
 50
 acccgcacca ccttgcaagc cgagtcggcc ttttcgatcg tcggactggt ctggcggccc 240
 ggtcagctca ccgagatcca cgatcacctg gtgtggtgta cattccttgt cctgcaagga 300
 accgagaccg agaccatctt cgacatcgac gacgatcggc tggtcgggaa ggcccagcgg 360
 55
 caacgccccg cggggtcggt gagcggcgtc gcgccccc acgacatcca ccaggtgcac 420
 aacgcgggcg acaccgtcgc catcaccttg cacgtgtacg gcgccgacct gagcaaggga 480
 60
 accagcgtgc gccgcaatta ccggatgcgc gccacttcgc ggtga 525
 <210> 43
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum
 <220>
 <223> ORF 1660
 <400> 43
 70
 Met Leu Asn Leu Val Gln Leu Thr Val Leu Ala Ala Val Ala Arg His
 1 5 10 15
 Gly Ser Met Thr Ala Ala Ala Lys Glu Leu His Tyr Thr Gln Pro Ala
 20 25 30
 75

ES 2 745 975 T3

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

<210> 44
35 <211> 867
<212> ADN
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
40 <223> orf 1660

<400> 44

atgctgaatc tgggtgcagct cacggtgctg gcggcggtcg cgcggcacgg ttcgatgacc 60
45 gcggcgggcga aggaactgca ctacacgcag ccgcggtga gccaccatct cgcgaggttg 120
gaggcgggcga cgggcgcgaa gctggtccag cggatcggcc gcggcatccg gctcacaccg 180
50 gaaggggaac tgctcgccgc ccgcgcggcc gagatcgctg gccgggtcga aggcgcgcaa 240
gccgagttgg ccgcgcaggt gggcttgccg gccggggcgg tccggatggc ggggttccag 300
tcgatcctga gcacgatcgt ccccgacgcg gccgcgacgc tggcccgtgc gcatcccgga 360
55 ctcgaaactcg ggctggtgga cgaacatccg ggcgaggcgc tgcgcatgct gcgggagggg 420
cggatcgacg tcgccctgat ctcccggtac gcggacacgc ccgcgagga acaggggctc 480
60 cggctcgtgc acctgctgga ggacccgac tacctgctca ccagcgaacc ggggcagacc 540
atcgccgac atcgtgactc gacctggatc ggcggtgcg ccgatgccg ggacgaactc 600
gtcacgatct gcgggcgggc cgggttcgcc ccgcgtatct cgatggtcag cgacgacatc 660
65 gtgggtcatgc aggcgctggt ccgcggcccgg atgggcgtca ccacgctgcc ccggtggcg 720
ctgcgtgcgc atcggatgcc cgggtgtcac gccacggagc tggccgaaga cccgcgtcag 780
70 atctatgccg tcacctatgg cgacccgccc gatcctccgg ccgcagcggc gttgatcgac 840
gcgcttcaga cgagcatccg ggcttag 867

<210> 45
75 <211> 411

ES 2 745 975 T3

<212> PRT
<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> ORF 1661

<400> 45

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

<210> 46
<211> 1236
<212> ADN

<213> Amycolatopsis japonicum

<220>
<223> orf 1661

<400> 46

gtgcggcatc tcaacgcgat cggccacctg gcgccgcacg atcacgcggc cgcgccggcc 60
ggcccgc tca gcgggatccc gttggtggtc aaggacaaca tccacgtcgc cgggatgccg 120

ES 2 745 975 T3

	aacaccgcgg gtaccccggc gctggcgggc cacgttcgcg gcgagcacgc gaccgtggtc	180
	cgacggctga ccgacgcggg cgccgtcgtc gtcggcaagg cgaccatgca cgaactcgcc	240
5	ctcggcatca cctgcgacac gaccccgctc ggcccggtgc gcaacgcgtg cgacccgtcc	300
	cggttcgccg ggggcagcag cggcgggacc gcggtcgccg tcgcggcggg catcgtgccc	360
10	gcgggtctgg gcaccgacac cggcgggttc gcccggttc ccgcgcgct caacgggggtt	420
	tgcggcttcc ggccgaccac gggccgctac ccgtccgacg gcatgacgcc gctgagcagc	480
	acgcggggaca cggccggggc gatcgccgcg acggtcgccg atctcgcgct cctcgacgcg	540
15	gtcctcgcgg cggaagagcc gacacccctg atcgagagca cgtcggtcag gctgggtgtg	600
	ccgcacgggtt tcctgaccgg cgacctgtcc gaggacgtcg aagaactctg ggaagccgcg	660
20	cttgcccgtc tgggcgcggc aggcgtcacc ctggtgccg tcgacgacac gccgctcgcc	720
	gaactcgctg tcgatcaggg aatgccgtg gtgatccacg aagcaggcgt cgggctccgc	780
	tcctacctg ccgagcacgt acccgagggt tcgttcgagc ggctcgttcg cgagatcgcc	840
25	gcgcccgaag tccgggcgat ctccgcccga gcggtcgtgc cgggcgtcga acccgccgtc	900
	tacgaagcgg ccatcaccac ccgctccgcc ttgcgtcgcg cctacgcgaa gatcttcgac	960
30	gagagcggca tcgacgcgct ggccttcccc accacaccgg cgacggcccg ggacttctcg	1020
	gccgtcggga gcttcgtgca ccgagggcgc gaggtcccga ccttccccac cttcatccgc	1080
	aactgccagc ccggcagtat cgcgggattc cccggcctga ccgtcccgat ggggcgcgca	1140
35	cgcgacggcc tgcccgcggg gctggcgctc gacggcctgg tcggggacga ccggaagtgt	1200
	ctgggcgtgg gggtttcgt cgaacggggt ctgtag	1236
40	<210> 47 <211> 327 <212> PRT <213> Amycolatopsis japonicum	
45	<220> <223> ORF 1662 <400> 47	
50	Met Ser Ser Gly Pro Ser Leu His Val Leu Thr Arg Ser Asp Leu His 1 5 10 15 Ser Leu Glu Leu Thr Pro Gly Glu Ala Ile Thr Met Val Glu Asp Gly 20 25 30 Tyr Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Ala Ser Arg Asn Pro Ala Lys Leu Met 35 40 45	
55	Val Pro Ile Pro Asp Pro Ala Arg Asp Ala Val Ala Tyr Ser Met Leu 50 55 60 Gly Tyr Asp Gly Ser Leu Glu Gln Ala Ala Phe Lys Thr Ser Tyr Arg 65 70 75 80 Gln Gly Ser Thr Ser Ala Glu Lys Tyr Tyr Thr Thr Ile Thr Leu Tyr 85 90 95	
60	Asp Asp Thr Thr Gly Leu Pro Phe Ala Leu Met Asp Cys His Arg Val 100 105 110 Gly Ala Thr Arg Thr Pro Ala Ser Thr Ala Leu Ile Ala Arg Ser Cys 115 120 125	
65	Ala Arg Pro Gly Ala Arg Ser Ala Leu Met Val Gly Thr Gly Ala Gln 130 135 140 Gly Ile Arg Thr Leu Pro Tyr Leu Leu Thr Ala Leu Pro Glu Leu Glu 145 150 155 160 Arg Leu Arg Leu Phe Gly Thr His Pro Asp Gly Leu Arg Asp Ser Val 165 170 175	
70	Ala Ala Leu Lys Glu Arg Phe Pro Asp Arg Glu Val Glu Leu Val Asp 180 185 190 Asp Val Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ser Asp Ile Val Val Ala Ala Ser 195 200 205	
75	Gly Arg Ala Ala His Pro Lys Ile Arg Leu Gly Trp Leu Pro Pro Gly	

ES 2 745 975 T3

210 215 220
 Gly Leu Leu Ile Ser Val Ala Ser Lys Gly Val Gln Glu Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ala Glu Ala Asp Tyr Thr Val Ala Thr Ser Gly Ala Gln Val Glu Val
 5 Thr Gly Gln Arg Met Ala Gly Pro Asp Gly Val Phe Arg Ile Asp Ala
 245 250 255
 Glu Leu Pro Glu Ile Leu Ala Gly Lys Ala Pro Gly Arg Arg Gly Asp
 260 265 270
 10 Glu Asp Arg Val Phe Ala Phe Ser Ser Gly Met Ile Ile Thr Asp Ile
 275 280 285
 Pro Val Ala His Ala Leu Ala Ala Arg Ala Ile Ala Ala Gly Arg Gly
 290 295 300
 15 Arg Glu Val Ala Leu Trp Thr 310 315 320
 325
 <210> 48
 <211> 984
 <212> ADN
 20 <213> Amycolatopsis japonicum
 <220>
 <223> orf 1662
 25 <400> 48
 atgagctccg gtccctcgct gcacgtactc acgcgctcgg atctgcacag cctcgaactc 60
 acccctggcg aggcgatcac gatggtcgaa gacggctatc tggcctacgc ggccggggcc 120
 30 tcgcggaacc cggcgaagct gatggtgccg atcccggatc ccgcgcggga cgccgtcgcg
 tactcgatgc tcggctacga cggttccctc gaacaggccg cgttcaagac gagctaccgc 240
 35 caaggcagca cgtcggccga gaagtactac acgaccatca ccctgtacga cgacaccacg
 ggctgcccgt tcgcgctcat ggactgccac cgcgtcggcg ccaccgcac gcccgcgagc 360
 accgcgttga tcgcgcggtc tcgcgctcgg cggggcgcgc gatccgcgct catggtcggc 420
 40 accggcgcgc aggggatccg gacgctgccg tacctgctca ccgcgctgcc ggagctggaa
 cggctgcggc tgttcggcac gcatcccgcac ggtcttcgcg acagcgtcgc cgcgctgaag 540
 45 gagcgcttcc cggaccgcga ggtcgaactc gtcgacgacg tggaggccgc ggcgcgcgag
 tccgacatcg tggtcgcgcg gtcggggccg gcgggcccacc cgaagatccg tctcggctgg 660
 ctgccgcccg gcgggctgct gatctccgtc gccagcaagg gaggccagga aggcacgctc 720
 50 gccgaggccg actacacggt ggccaccagc ggcgcgcagg tcgaggtgac cgggcagcgg
 atggcgggtc cggacggcgt gttccggatc gacgccgaac tcccggagat cctcgcgggc 840
 55 aaggcccccg gccgcgcg cgcgaagac cgggtgttcg ccttcagcag cggcatgatc 900
 atcaccgaca tcccgtggc gcacgcgctg gccgcccgcg ccatcgccgc cggccgcggc 960
 60 cgcgaggtgg ccctgtggac ctga 984
 <210> 49
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum
 65 <220>
 <223> ORF 1663
 <400> 49
 70 Met Asp Leu Ile Asp Thr Leu Ser Pro Pro Leu Pro Ala Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Pro Trp Ala His Arg Leu Arg Ala Ser Glu Thr Leu Trp Glu Ile Ala
 20 25 30
 75 Arg Gly Val Gly Gly Gly Pro Phe His Val Val His Pro Ala Thr Phe

ES 2 745 975 T3

[illegible]

ES 2 745 975 T3

	gagctggaac gcgtcgcccc gctggccacc gaactcgggg agaccgccga agtgetgctg	480
5	cgagtgcggc cgccgtccgc gccggagagc cggttcgggt tcgcgccga cgcggtgaaa	540
	gcggccgtgc gacagtgcgg cgccccggtc gtcctcgggg gtttctcggt ccacctcgac	600
	ggctacgacc ccgtgccgag ggcggaactc gccgcatacc tgatcgatct gtgtcacgac	660
10	gcccgcgcg tcggacatcc cgcgtcgaag atcagtgcgg gcggcgggat cgctgtgtcc	720
	tatgtggacg ccggtgactg ggcgcggttc gagtccggca ggcacgacgg ctggttcac	780
15	gccggccgta atccggccag gacctatcca taccaccagg cgccgaccgg ggccggcgatg	840
	gtgaccgcga tcctccggca cgagatcgcc gggaagacac tggccgagcg cctgcgcgcg	900
	gccgggatcg agctgctgct cgaaccgggc cgagccctcg tcgacggcgc cgggttctcg	960
20	gtgttccccg tgctgggctg caaacccggc gaagaccacc tgatcaccac ggtcgccggc	1020
	ctgtccatga gcctgtccga acagtgaag ggcagcgagt tcctgccga cccgtgctc	1080
25	gtgcgcaggg acggaccggg cggtagcca gtgcggacca tcgtcgggg gtcgagctgc	1140
	atggagtacg acgtgctgac ctggcgcgcg gtggagctgc ccgcgaacc gaggaccggc	1200
	gacctgctcg tgtacccaa caggccggc taccagatgg acaagaacga gagcggttc	1260
30	caccagcttc cgttgccgc gaaagtgtg gtcgacggc accgctggca cctcgacacc	1320
	gaccaccga tccaggagat ccgatga	1347
35	<210> 51	
	<211> 352	
	<212> PRT	
	<213> Amycolatopsis japonicum	
40	<220>	
	<223> ORF 1664	
	<400> 51	
45	Met Thr Ile Val Arg Arg Ala Ser Asp Leu Ile Gly Asn Thr Pro Leu	
	1 5 10 15	
	Leu Glu Leu Ala Arg Thr Gly Thr Gly Thr Arg Leu Leu Leu Lys Leu	
	20 25 30	
	Asp His Leu Asn Pro Thr Gly Ser Cys Lys Val Arg Met Ala Arg Gln	
	35 40 45	
50	Met Ile Asp Glu Ala Glu Leu Asp Gly Arg Leu Arg Pro Gly Gly His	
	50 55 60	
	Ile Val Glu Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Asn Gly Leu Ala Leu Val	
	65 70 75 80	
55	Ala Leu Glu Arg Gly Tyr Arg Phe Thr Ala Val Val Asp His His Ala	
	85 90 95	
	Ala Arg Glu Lys Leu Gly Met Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Leu Val	
	100 105 110	
	Phe Val Glu Cys Pro Pro Asp Gly Gly Val Ser Ser Val Gln Arg Arg	
	115 120 125	
60	Arg Val Ala Ala Arg Ile Ala Ala Glu Thr Gly Ala Tyr His Pro Asp	
	130 135 140	
	Gln His Asn His Pro Gly Asn Gly Asn Gly Tyr Thr Gly Leu Ala Arg	
	145 150 155 160	
	Glu Leu Val Glu Gln Leu Gly Asp Val Asp Val Leu Val Ala Ala Ile	
	165 170 175	
65	Gly Thr Gly Gly Ser Leu Cys Gly Thr Ala Arg Ala Leu Arg Ala Ala	
	180 185 190	
	Gly Ala Ser Thr His Ala Val Ala Val Glu Pro Val Gly Ser Ile Ile	
	195 200 205	
70	Phe Gly Gly Ala Pro Gly Ile Tyr His Gln Thr Gly Ala Gly Ser Pro	
	210 215 220	
	Ala Gly Phe Pro Ile Gly Asp Asn Val Asp Arg Ser Val Ile Gly Glu	
	225 230 235 240	
75	Ala His Arg Val Ser Asp Ser Asp Ala Phe Ala Gly Ala Arg Val Val	
	245 250 255	

ES 2 745 975 T3

	Ala Arg Arg Thr Gly Val Leu Val Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Ile	
	260 265 270	
	His Val Ala Leu Arg Arg Leu Tyr Ala Tyr Pro Ala Gly Ser Val Val	
	275 280 285	
5	Val Val Leu Cys Asn Asp Ala Gly Glu Lys Tyr Leu Asp Ser Val Tyr	
	290 295 300	
	Asp Asp Glu Trp Leu Arg Ala Arg Gly Val Leu Asp Glu Leu Ala His	
	305 310 315 320	
10	Arg Arg Met Asp Arg Trp Phe Ala Thr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Val	
	325 330 335	
	Ala Thr Arg Asp Arg Ala Val Arg Arg Thr Pro Val Ala Val Gly Gly	
	340 345 350	
15	<210> 52	
	<211> 1059	
	<212> ADN	
	<213> Amycolatopsis japonicum	
20	<220>	
	<223> orf 1664	
	<400> 52	
25	atgacgatcg tccggcgcgcg gtccgacctg atcggaaca cgccgtgct ggagctcgcg	60
	cgtaccggca ccgggacgcg tctgtgtctc aaactcgacc acctcaacc caccggctcg	120
	tgcaaggtac gcatggcgag gcagatgatc gacgaggcgg agctggacgg acggctgcgg	180
30	ccgggcgggc atatcgtcga acccacgtcc ggcaacaccg ggaacgggct cgccctggtc	240
	gcgctggaac gcggctaccg gttcacccgc gtggtcgtac accacgccgc ccgcgagaaa	300
35	ctcgggatgc tgcgcgcgct gcggcgcgaa ctggtgttcg tcgaatgcc gccggacggc	360
	gggggtcagtt cggtccagcg gcggcgggtc gcggcccgca tcgcgcgga aaccggtgcc	420
	taccatcccg atcagcacia ccatcccggc aacggcaacg ggtacaccg gctggcgcg	480
40	gaactcgtcg agcagctcgg cgacgtcgac gtgctcgtcg cggcgatcgg caccggcggc	540
	tcctgtgtcg gtacggcccc gcacctgcgc gcggcgggag cgagcaccca cgcggtggcg	600
45	gtcgaacctg tcggctcgat catcttcggt ggtgcgccgg ggatctacca ccagaccggg	660
	gcgggcagcc cgcccggttt ccgcatcggg gacaacgtcg accggtcggg gatcggcgaa	720
	gcccaccgcg tttccgacag cgacgcgttc gccggggccc gcgtcgtcgc caggcgcacc	780
50	ggcgtgctgg tcggcgggac caccggcggc gcgatccacg tcgcgtcgc gcggctttac	840
	gcgtatccgg ccggaagcgt cgtcgtggtg ctgtgcaacg acgcggggga gaagtacctc	900
55	gattcgggtg acgacgacga atggctgcgc gccaggggag tactcgacga actggccac	960
	cgccggatgg accgctggtt cgccacctac gccgaatccg tgaaggctgc cacgcgcgac	1020
	cgggcggtgc gccggacccc ggtggcggtg ggcggtatga	1059
60	<210> 53	
	<211> 460	
	<212> PRT	
	<213> Amycolatopsis japonicum	
65	<220>	
	<223> ORF 1665	
	<400> 53	
70	Met Ser Thr Ala Val Thr Thr Arg Gly Tyr Arg Ala Leu Ala Gly Leu	
	1 5 10 15	
	Ala Ala Pro Ile Ala Gly Ile Gln Leu Ala Gln Val Ala Leu Thr Ser	
	20 25 30	
75	Val Asp Leu Ala Met Leu Gly Leu Gly Val Thr Ala Val Ala Ala	
	35 40 45	

ES 2 745 975 T3

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

55 <210> 54
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

60 <220>
 <223> orf 1665

<400> 54

65 atgagcacg cggtgacgac ccgcggctac cgggccctcg ccgggctggc cgcgccgatc 60
 gcgggaatcc agctggcaca ggtcgcgctc accagcgtcg acctggccat gctcgggctg 120
 ctccgggtga ccgcggtggc ggcgggcggg ctggcgatcc tgctetacaa ccagatccgc 180
 70 accatgtgcg tcggcatggt caccggcgctc gggaacctcg tggcgacggc ggccggggcc 240
 ggggaactcc gcaccggcac cggcgaactc gacgagcggg cgcgggacga gatccggtcg 300
 75 ctccctgcggt cggcgctgct cgctcgcgacc ctgaccgcgg cgctcggcgc ggccgtcctt 360

ES 2 745 975 T3

	tgtggactgg ccgtcgcgct gccttcgctc ggccagaaac cggagatcgt ttcgctcgcc	420
	ggtccgatga tgttcgcaact ggccggcggg ctgttcccga tgggtgtggct gaacgtggtg	480
5	cgccagttcg ccgtcggggtt gcggcgggcg ggttcgctcc tcgccgtgac gctggtgtcg	540
	atcgcggtca acgcgcgcct caacgcgcgc ttcattctacg gctggggcggg tctgcccgag	600
10	ctggggcgtcg ccggtatcgg cctggcgacg accttggtcc agttcttcac gctcgccgtg	660
	ttcgccctcg ccctccggcg ggaccgcgtg ttgcgccccca tgggtgtcgct cgcgctgtgg	720
	cgcgcggatc gggcgggtggt ccggcgcatc gtccggcacg ggacgccgat ctgcttcacc	780
15	tacgggctcgg agggcgcgat cacctcgatc gcgacgatgc tgatgggtgc gttcggccccg	840
	gcgatgctcg ccgcgtcgaa cgtcgcgaac cagctcgctt acatcgtcta ccaggccaac	900
20	atcggggtgt cgcaaggatc gtccattttg gtcagccgcg cggtcgcccc cggtgaccgg	960
	gatcgcgcac cggatgatcg gcgccaggcg ttcaccctct cctggtcctt gatggcgggtg	1020
	gtgagcctgg cgtacctgct ggtgccgcag gtgctgctgt ggccgttctt gcacgacgag	1080
25	accgacgcgg tgggtgctcg cacggcgctg accctgctgg tggtcgccat cgcgcagcag	1140
	tacagcaagg gaacgcagaa catcctcgtc ggcctgctgc gcgggctcgg tgacaccgtc	1200
30	tccggcctcc gctgcacgct cgtgggggtac tgggcgggtg gcgtgcccgc gatgttcttg	1260
	tgccgctacg tgttcgcctg gggcggtcgg ggggtctggg ccgggctgtg tctcggttc	1320
	gcgacgaccg cggtcctgct cggacggagt ttcgccggtc agggagccgg ttctgcgcga	1380
35	tag	1383
	<210> 55	
	<211> 313	
	<212> PRT	
40	<213> Amycolatopsis japonicum	
	<220>	
	<223> ORF 1666	
45	<400> 55	
	Met Thr Thr Thr Gly Arg Ile Gly Ile Ala Asp Val Glu Cys Leu Glu	
	1 5 10 15	
50	Asn Ala Val Asp Thr Leu Arg Ala Leu Asp Tyr Arg Gln Gly Gly Ala	
	20 25 30	
	Phe Ser His Asp Ala Val His Val Val Lys Ser Val Ser Leu Leu Leu	
	35 40 45	
	Thr Trp Gly Ala Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Val	
	50 55 60	
55	Leu Ala Asp Leu His Asn Leu Leu Gly Trp Thr Glu Phe Asp Ile Gly	
	65 70 75 80	
	Arg Arg Val Pro Ala Arg Leu Arg Phe Asp Arg Ala Leu Gly Leu Ala	
	85 90 95	
60	Ala Ala Ala Gly Asn Asp Asn Leu Met Ala Asn Ile Cys Tyr Arg Leu	
	100 105 110	
	Gly Arg Leu Ala Leu His His Asp Asp Val Glu Gly Gly Leu Asp His	
	115 120 125	
	Leu Arg Gln Gly Gln Ala Ala Ala His Arg Ser Gly Ser Leu Arg Ala	
	130 135 140	
65	Gln Ala Ile Leu Thr Ile Asn Glu Ala Trp Ala Leu Ala Lys Ala Gly	
	145 150 155 160	
	Asp Glu Arg Ala Ala Leu Thr Ser Leu Ala Arg Ala Glu Cys Glu Phe	
	165 170 175	
70	Glu Asn Ala Gly Thr Trp Ala Ala Pro Arg Pro Trp Glu Ala Phe Phe	
	180 185 190	
	Gly Ala Thr Asp Met Ala Ala Met Arg Gly Thr Val Leu Thr Glu Leu	
	195 200 205	
	Ala Arg Thr Val Ala Ser Arg His Ser Glu Glu Ala Ile Glu Arg Leu	
	210 215 220	
75	Arg Asp Ala Val Asp Gly Tyr Gly Ala Glu Met Ser Arg Ser Leu Ala	

ES 2 745 975 T3

225 230 235 240
 Leu Thr Leu Ile Met Leu Ala Gln Asn His Ala Leu Gln Gly Asp Phe
 245 250 255
 5 Gly Glu Ala Val Arg Thr Gly Asp Glu Ala Leu Asp Leu Ala Arg Gly
 260 265 270
 Leu Gly Ser Thr Arg Thr Lys Asp Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ala Leu
 275 280 285
 Leu Arg Gly Asp Ala Asp Pro Ala Ser Arg Asp Leu Leu Ala Arg Ile
 290 295 300
 10 Asp Arg Tyr Arg Ala Glu Pro Ala Pro
 305 310

 <210> 56
 <211> 942
 15 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 <223> orf 1666
 20
 <400> 56

 atgacaacga ccggccgtat cggatcgcc gacgtcgaat gtctcgaaaa cgcggtcgat 60
 25 actctgcgcg cgttggaacta tcggcagggc ggcgccctttt ccacagacgc ggtgcacgtc 120
 gtgaagtcgg tcagcctgct gctcacttgg ggcgccgtcc ccggcggact ccggtcacgg 180
 ttgctgaccg tgctcgcgga tctgcacaat ctgctgggct ggacggaatt cgacatcggc 240
 30 cgccgcgttc cggcacggct ccggttcgac cgcgcgctcg gtctcgccgc cgcggcgggc 300
 aacgacaatc tcatggccaa catctgttac cgcctcggca ggctggcggt gcatcatgac 360
 35 gacgtcgaag gcgggttggg ccatctccgg caaggccaag ccgcccacca ccgctccggt 420
 tccttgcggg ccagggcgat cctgacgac aacgaggcgt gggcactggc caaggccggt 480
 gacgagcgcg cgccctcac gagcctggcg cgggcggagt gcgagttcga gaacgcgggc 540
 40 acctgggcgg cgccacgacc gtgggaagcc ttcttcggcg ccacggacat ggccgcgatg 600
 cgcggggaccg tcctgaccga attggccagg acggtcgcct ccgggcacag cgaagaagcg 660
 45 atcgagcggg tacgcgacgc cgtcgacggc tacggcgccg agatgtcccg cagcctcgcg 720
 ctcacctga tcatgctcgc gcagaaccac gcgctccagg gcgacttcgg cgaagccgctc 780
 cgacccggcg acgagggcgt ggacctcgcg cggggcctcg gttccaccgg caccaaggac 840
 50 cggctcgcac cgctggcggc acttctgcgc ggagacgccc atccgcctc ccgcgacctg 900
 ctcgcccggg tcgaccgcta tcgcgcagaa ccggctccct ga 942

 55 <210> 57
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum

 60 <220>
 <223> ORF 1667

 <400> 57

 65 Met Ser Asp Phe Glu Ala Gln Leu Arg Ala Val Ser Leu Arg Val Thr
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Leu Ala Val Leu Ala Ala Leu Arg Asp His Pro His Val
 20 25 30
 Asp Thr Glu Thr Val Ile Ala Leu Val Arg Ala Asp Leu Pro Thr Val
 35 40 45
 70 Ser His Gln Ala Val Tyr Asp Val Leu Arg Ala Leu Thr Glu Thr Gly
 50 55 60
 Leu Ile Arg Arg Ile Gln Pro Ala Gly Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Thr
 65 70 75 80
 75 Arg Val Gly Asp Asn His His His Val Val Cys Arg Ser Cys Gly Ala

ES 2 745 975 T3

85 90 95
 Ile Ala Asp Val Asp Cys Ala Val Gly His Ala Pro Cys Leu Thr Ala
 100 105 110
 Ser Gly Asp His Gly Phe Val Ile Asp Glu Ala Glu Val Val Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Leu Cys Pro Gly Cys Ala Ala Glu Pro Val Gln
 130 135 140

 <210> 58
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 <223> orf 1667

 <400> 58

 atgtccgact tcgaggcaca gctgcgagcg gtttcgttgc gcgtgacgcg gcctcggctg 60
 gccgtgctcg cggcgctgcg cgatcatccg cacgtcgaca ccgaaacggt gatcgcgctg 120
 gtgcggggccg atctgccgac ggtctcgcac caggcgggtg acgacgtgct gcgggcgctc 180
 accgaaacgg gtctgatccg gcggatccag cccgccggcg cgctcgcccg ttacgagacc 240
 cgggtggggg acaaccatca ccatgtcgtg tgccgttcct gcggtgcgat cgcggaacgtc 300
 gattgcgccc tcggccatgc cccctgtctc accgcttcgg gcgatcacgg gttcgtgatc 360
 gacgaggcgg aggtcgtcta ctggggcctg tgccccggct gtgcggccga acctgtccag 420
 tga 423

 <210> 59
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum

 <220>
 <223> ORF 1668

 <400> 59

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

ES 2 745 975 T3

				245					250				255
	Glu	Thr	Phe	Ala	Arg	Met	Ala	Met	Asn	Asp	Glu	Glu	Thr
				260					265				270
5	Ile	Ala	Gly	Gly	His	Thr	Phe	Gly	Lys	Thr	His	Gly	Ala
			275					280				285	
	Asp	Asp	His	Val	Gly	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Pro	Leu
			290				295					300	
	Gly	Leu	Gly	Trp	Leu	Ser	Thr	His	Gly	Ser	Gly	Lys	Gly
					310						315		
10	Ile	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Thr	Trp	Thr	Asp	Lys	Pro
				325						330			
	Ser	Asn	Arg	Phe	Glu	Ile	Leu	Phe	Gly	Tyr	Glu	Trp	Glu
			340					345					
	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Ala	Lys	Gln	Tyr	Val	Ala	Lys	Asp
15			355					360				365	
	Ile	Ile	Pro	Asp	Ala	His	Asp	Pro	Ala	Lys	Lys	His	Lys
			370				375					380	
	Leu	Thr	Thr	Asp	Leu	Ala	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Glu	Tyr
					390					395			
20	Ser	Arg	Arg	Phe	Leu	Glu	Asn	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Leu
				405						410			
	Lys	Ala	Trp	Tyr	Lys	Leu	Leu	His	Arg	Asp	Met	Gly	Pro
			420						425				
25	Phe	Leu	Gly	Pro	Trp	Val	Pro	Glu	Pro	Gln	Leu	Trp	Gln
			435					440				445	
	Pro	Asp	Val	Asp	His	Glu	Leu	Val	Gly	Asp	Ala	Asp	Ile
			450				455				460		
	Lys	Thr	Lys	Val	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Glu	Gln
			465			470				475			
30	Thr	Ala	Trp	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Phe	Arg	Ser	Thr	Asp
				485						490			
	Gly	Ala	Asn	Gly	Ala	Arg	Ile	Arg	Leu	Ala	Pro	Gln	Arg
			500						505				
35	Val	Asn	Arg	Pro	Glu	Glu	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Glu	Thr
			515					520				525	
	Ile	Gln	Arg	Glu	Phe	Asn	Asp	Ala	Gly	Gly	Ala	Lys	Ile
			530				535					540	
	Asp	Leu	Ile	Val	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	Val	Glu	Lys
			545			550				555			
40	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Val	Thr	Val	Ala	Phe	His	Pro	Gly
				565						570			
	Ala	Thr	Gln	Glu	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	Ser	Phe	Thr	Leu
			580						585				
45	Arg	Ala	Asp	Gly	Phe	Arg	Asn	His	Leu	Arg	Pro	Glu	Glu
			595					600				605	
	Pro	Glu	Val	Leu	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Tyr	Met	Leu	Asp
			610				615					620	
	Pro	Glu	Met	Thr	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu
			625			630				635			
50	Ala	Gly	Asp	Thr	Arg	His	Gly	Val	Leu	Thr	Asp	Arg	Pro
				645						650			
	Thr	Asn	Asp	Phe	Thr	Asn	Leu	Leu	Ser	Pro	Gly	Thr	Arg
			660					665				670	
55	Val	Ser	Glu	Ser	Glu	Glu	Asn	Val	Tyr	Glu	Ile	Arg	Asp
			675					680				685	
	Asp	Ala	Val	Lys	Trp	Thr	Ala	Thr	Pro	Val	Asp	Leu	Val
			690				695				700		
	Asn	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu	Ser	Glu	Val	Tyr	Ala	Gly
			705			710					715		
60	Arg	Glu	Arg	Phe	Ala	Ala	Asp	Phe	Ala	Lys	Ala	Trp	Thr
				725						730			
	Glu	Leu	Asp	Arg	Phe	Asp	Leu	Asp					
				740									
65	<210>	60											
	<211>	2235											
	<212>	ADN											
	<213>	Amycolatopsis japonicum											
70	<220>												
	<223>	orf 1668											
	<400>	60											
75	atgagtgcaca	acccggagaa	gggctgccc	gtggccacg	actccgtgac	cgcgacgga							

ES 2 745 975 T3

	agtgagagcg agaaccggcg gatcgactcg ccgacgccga aatcggggcg ccgcccgcgt	120
5	accaacaagg actggtggcc caaccagctc gacctctcgg tgctgcacgc cactcgtcg	180
	aagtcgaacc cgctcggcgc ggacttcagc tacgccaagg aattcgccaa actcgacgtc	240
	gaggccctca aacgcgacat caccgaggtg ctcaccacct cgcaggactg gtggcccga	300
10	gacttcggcc actacggcgg cctgatgata cggatgagct ggcacgccgc gggcacctac	360
	cgcatccacg acggccgagg cggcgccggg gacggcgcg agcggttcgc cccgctcaac	420
15	agctggcccg acaacgccaa cctcgacaag gcacggcggc tgctgtggcc ggtcaaggag	480
	aagtacggcc agcagatctc gtgggcccgc ctgctcgtgc tcgccgggaa cgtcgcgctg	540
	gagtcgatgg ggttcaagac gttcggcttc ggtttcggcc gcgtggacac ctgggagccc	600
20	gaggagatct tctgggttcc ggaagacacc tggctgggtg acgagcgcta cgcgagcgac	660
	accgagatgg tccccgacgt cggcgcgacc gaaatgggcc tcatctacgt caaccccgag	720
25	ggaccccgag gcaacgcgga cccggccgcc gcggcgcaatt tcatccggga gaccttcgcc	780
	cggatggcga tgaacgacga ggagaccgtc gcgctcatcg ccggggggcca caccttcggc	840
	aagaccacg gtgccgttat cgccgacgac cacgtcggcc cggaacccga agccgccccg	900
30	ctcgagacac agggcctcgg ctgggtgagc acccacggca gcggcaaggg cgccgacgcg	960
	atcaccagcg gtctcgaggt gacgtggacc gacaagccga cgcagtggag caaccggttc	1020
35	ttcgagatcc tcttcggcta cgaatgggaa ctcaccacca gcccgggcgg cgccaagcag	1080
	tacgtcgcca aggacgccga ggcgatcatc ccggacgcc acgacccggc caagaagcac	1140
	aagccgacca tgctcaccac ggatctcggc ctgctcgtgc acccgagta cgagaagatc	1200
40	tcgcgccgct tcttgagaa cccggacgac ttcgcgctcg cgttcgccaa ggctggtac	1260
	aaactgctgc accgcgacat gggcccggtc agccgtttcc tggggccgtg ggtgcccga	1320
45	ccgcagctgt ggcaggaccc ggtgccggac gtcgaccacg aactcgtggg ggacgccgac	1380
	atcgccgcgc tcaagacgaa ggtgctcgag tccgggctca cggtcgagca gctggtcggc	1440
	acggcgtggg cgtccgcggc gagcttcggg tccaccgaca aacgcggcgg cgccaacggg	1500
50	gcccgatcc gcctggcacc ccagcgtgac tgggaggtca accggccgga agagctcgcg	1560
	agtgtgctgg agaccctgga gggcatccag cgcgagttca acgacgccgg tggcgccaag	1620
55	atctcgtggt ccgacctgat cgtgctggcg ggcaactgcc ccgtcgagaa ggcggcgcg	1680
	gacgcgggca ccgacgtgac cgtggcgttc caccgcggcc gcaccgacgc caccagggag	1740
	gacaccgacg tcgagtcggt cacgtgctc gaaccgcggg ccgacgggtt ccgcaaccac	1800
60	ctgcgtcccg aggagaaact gcagccggag gtctcgtggt tcgagcgcg ctacatgctc	1860
	gacctgacgg cgcgcgagat gaccgtctc gtcggcgggc tgctgctgct cgggatacc	1920
65	gccggcgaca cccggcacgg cgtctctacc gaccggcccc gcgtgctcac caacgacttc	1980
	ttcaccaacc tctctcggcc gggcacccgg tgggaagggt cggagtccga ggagaacgtg	2040
	tacgagatcc gcgacgccgg cacggacgcg gtgaagtgga cggcgacccc ggtcgacctc	2100
70	gtgttcggct ccaactcgca gctgagggcg ctttccgagg tctatcggg tcaggccggg	2160
	cgggagcggg tcgcgcgcca cttcgccaag gcgtggacca aggtcatgga actggaccgg	2220
75	ttcgacctcg actga	2235

ES 2 745 975 T3

<210> 61
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis japonicum
 5
 <220>
 <223> ORF 5768
 <400> 61
 10
 Met Ser Pro Thr Thr Ala Asn Ser Ser Ala Pro Val Pro Gly Arg Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Lys Gln Arg Ala Ala Val Val Glu Leu Leu Lys Glu Ile Asp
 20 25 30
 15
 Asp Phe Arg Ser Ala Gln Glu Leu His Asp Glu Leu Arg Lys Arg Gly
 35 40 45
 Asp Gly Ile Gly Leu Thr Thr Val Tyr Arg Thr Leu Gln Ser Leu Ser
 50 55 60
 Glu Ala Gly Glu Ile Asp Val Leu Arg Thr Asp Thr Gly Glu Ala Ile
 65 70 75 80
 20
 Tyr Arg Arg Cys Ser Ser His His His His Leu Val Cys Arg Leu
 85 90 95
 Cys Gly Ser Thr Val Glu Val Glu Gly Pro Ala Val Glu Arg Trp Ala
 100 105 110
 25
 Glu Lys Ile Ala Ser Glu His Gly Phe Ser Asp Ile Ser His Thr Val
 115 120 125
 Glu Ile Val Gly Thr Cys Ser Asn His
 130 135
 30
 <210> 62
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum
 35
 <220>
 <223> orf 5768
 <400> 62
 40
 atgagtccga cgacggccaa cagttccgcg ccggtgccgg gacgccggtc gacgaaacag 60
 cgggccgcgc tggtcgagct gctcaaggag atcgacgact tccgttctgc ccaggaactg 120
 45
 cacgacgagc tgcgcaaacg cggcgacggc atcgggctca ccacggtgta ccggacgctg 180
 cagtcgctgt ccgaggccgg cgagatcgac gtctcgcgca cggacaccgg cgaggccatc 240
 taccggcggt gtcgctcgca ccaccacat cacctggtgt gccgtctctg cggcagcacg 300
 50
 gtcgaggtcg agggccccc ggtggagcgg tgggcccaga agatcgcttc ggagcacggc 360
 ttctccgaca tcagccacac cgtggagatc gtcgggacct gtcgaacca ctga 414
 55
 <210> 63
 <211> 1869
 <212> ADN
 <213> Amycolatopsis japonicum
 60
 <220>
 <223> ds orf 5768
 <400> 63
 65
 aatcatatgg tcgggacctg ctcgaaccac tgacgagcgc tatgaaaggt cctttcctgg 60
 caaatatttc aaggaaagga cctttcatag catcggtca gtactcgtaa ggtccttcg 120
 gcgccggcac ctgccgacc gaggtgagcg tcaaaccgg catgtagctg ttctcccgta 180
 70
 ccgcgggtccc cggcacgacc gtcccgtga cctccagcca ggtgtcgctt ccgaagcccg 240
 acacgccgtc gccaccatc cgcacggtga tcgggaaggc gtcggccgcg cagcagccga 300
 75
 tgaccatccg cgccagcatc gtgttgccct cgttgtgcac gacgaagccg gacagccgca 360

ES 2 745 975 T3

	ccgtgcgccc gttcaacgag ccaactggaat cccatcccgc gcggtgacg aactcgttga	420
5	cctccagcgg gaccacgtcc ccggcgggca agggcgggaa ggcgccgcg ttgctcgccg	480
	aagcgctctg tggcgccctg gcctcgggtgc gggtcaccga atcggcgccc agcgcgggcg	540
	gcgcgaccag gaacacggcc agcacgggca ccatcagcag ccaggccgag cgggtgttgt	600
10	ggtcgtgcgc gtggacatcg ccggacacga cggcggcggc ccgcgcggcc agcaggctcg	660
	ggacgatcgc gaccgcgccc agcgcaccca tcaccgcgccc gcccgcgatg atccacggct	720
15	gctgggcggg tttgacgtag cgcaggtagt cgccgttgat cgtgatcttc agcagcgcg	780
	cgccgagcag gatcagcagg atgttctggg tctcgcgttt cacgcgccac ctccgaggat	840
	caacacaccc gacacgacgg cgcacgacag cgcgaccacg aacgtcaccg gcgcgaaccg	900
20	gagcgcgaag gacttgccaa aggtgccggc ctgcagggcg aacagcttca cgtcgatcgc	960
	gggcccagacc accaggaaca ccagtttcgg cagcagcggc atcgcggtca gcgacgcggc	1020
25	gacgaaggcg tcggcctcac tgcacagggc cagcacgacg gcgagcacgg ccatcaccag	1080
	caccccgagc acgatctgct cccccagcac tccgaaccac ttggcgggca ccagcacgtt	1140
	catcgcgggc gcgatcatcg cgccgagcac caggaaaccg ccggcctcga ccagatccgc	1200
30	ccgcgcggtc tcggcgaagg tcttcacgcg cgaaccgtgc tgaacctccg gaagccgccg	1260
	caaagccgcg tccgcgatcc agtcgagctt gcccacttc gccacagcc agcccatcac	1320
35	catcgcggtg gcgagcgaac cggcgaaggc ggcgaaacac atttcgggt tcccggggaa	1380
	cgccaccgcc gtcgcgacca gcaccaccgg gttcacgcgc gcgcgcggcg gcaggaaggc	1440
	cagcgcggcc gcgggcgcg cgcctggcc gatcaggcgc cgcgcgaccg gcaccgacgc	1500
40	gcattcacac ccggcagggc gaccccgcc agcccgcgga cgccgacggc cgacccggcc	1560
	cgccgagggga gcaccttctc cagcacccgc gcgggacga acgcccgat cgcccgctg	1620
45	atcagcacc cagagcaccag gaacggcagc gcctgcacgc agacggcgac gaacacggtc	1680
	gagccggtcc gcagcgcggg cagctcgaac acctgctgga gccagctctg cccgaggatc	1740
	gcgatcagca ggatcgcgca gagcacctcg atcgagggtga tcttgaaccg ccgggcccgc	1800
50	ttcttctccg gggcgcttct ggaaatggtt tccatgcgcg cgatgatgcc aggtgaccgt	1860
	tctagatta	1869
55	<210> 64 <211> 1537 <212> ADN <213> Amycolatopsis japonicum	
60	<220> <223> us orf 5768 <400> 64	
65	aataagcttg tttcgcgacg aagttcttcg ggatcgagca gtcacgccc cagagcacga	60
	gcgtcgtgcg ggctcgcgc agatccttgc ccgcgtcgtc gcgcacgtgc gtgacgatgt	120
70	ccaccttcca gccgcacacc gcggtcacgt cgccgttgcg ccagccgtcc tgccggatca	180
	gctggtcgaa ggcggtcacg cgggacacgg tcaggtcgga ggtggtctcg tccttgccga	240
	tgttctcgtt cttgatgacc gacggcgggc cgagcttgag ccccttgacg tcgacgccc	300
75	aagcgcggga cggttgagc gcgcgggttt cgtcccgcac ccagatcttg cccacgctcg	360

ES 2 745 975 T3

	tcgacgacgt cgccttgctg ggcgacgagc agtcgacggc gctcttggcg cttcaagca	420
5	ccagtacggt gttgtcggcg ggcttcgcgc ctccgcgcc gttgtcgagc agggcgtagt	480
	tgctctccgc gaccgccgtc gggaccgtgg tctgtgcag cgcggcgagc acgttgtggt	540
	cgcggctggc gataccgggc gggaacgggc tctggcgcc gaagcggccc aggttgacag	600
10	cccatttgtc gccgaaggtg ttcttctcgc cgtcgtcagc cgggacgacg gtgcggtccg	660
	gggagagttt cgactggcct ggcgtcagcg gcgagcgctg ggtctcggcg atcagcgatc	720
15	ccgggttccc gatgcgcacc gacgccacat tcgcgaacga caccgggccc gtcttctcat	780
	cgcggcctg cgtcgtctgc gccgagcgga gccccggaac cgacgccaaa gcgacggccg	840
	ccgtcgcggc ggccagcttc gtcacgaaac gagtcatgtc tccccactgc ctctccgggc	900
20	cctcagagcg cggtcgtcag cgtacgagaa gcgacgaaac gtcgcgcgac aaccttgac	960
	cgttggcgac cacatgcgaa gtggaatggt catttctttg ctaagtcacc cgaatggagc	1020
25	agtaacatcg ccgccaagtg gtcgcccggg cggcgaacag accaccgggg gcgggaacac	1080
	taggatgggc aggactgtta ctggcaatga cttcggaat catgatggac atggaggcgg	1140
	cgatggctac ggtgaccccc gactctgccg cccccgggt ctcggaggac cccgggccgc	1200
30	attcgtcggc ccgtccccc gccgaaccg cgacgtcggc ctcgcccgc gtctctcggc	1260
	acgccggcga cctgctcagg gcgctcgcg cgcctgtgc catcgccatc gtctgcagt	1320
35	tgcgtaacgc ggacaggtgc gtgcacgaac tggaggacac actcgatgtc gcgcagccgc	1380
	tgatcagcca gcacctgcgg gtgctgaaga cggcgggtgt cgtacagggt gagcgacgcg	1440
	gccgtgaggt ggtgtaccgg ctggctcagc atcaccttgc gcatactgtg gtggacgccg	1500
40	tagccacgt tcaggagggg aagtgagcca tatgatt	1537

REIVINDICACIONES

1. Proteína o péptido aislado que es funcional para un paso de síntesis parcial de la biosíntesis de [S,S]-etilendiaminodisuccinato, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 53 y combinaciones de las mismas.
2. Ácido nucleico aislado, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica que se selecciona del grupo consistente en
 - a) una secuencia aminoacídica, que codifica una proteína o un péptido según la reivindicación 1,
 - b) una secuencia aminoacídica, que corresponde a la cadena complementaria de la secuencia aminoacídica según a) y combinaciones de las mismas.
3. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 2, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 54 y combinaciones de las mismas.
4. Grupo de genes u operón aislado, que contiene o consistente en al menos dos secuencias de ácido nucleico que se seleccionan del grupo consistente en SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 54 y combinaciones de las mismas.
5. Utilización de una proteína o un péptido, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61, para una represión de la biosíntesis de [S,S]-etilendiaminodisuccinato.
6. Vector de expresión, que contiene al menos un ácido nucleico según la reivindicación 2 o 3 o un grupo de genes o un operón según la reivindicación 4.
7. Célula huésped recombinante, que contiene un vector de expresión según la reivindicación 6.
8. Método para la biosíntesis de [S,S]-etilendiaminodisuccinato, que incluye los pasos:
 - a) cultivo de una célula huésped productora de [S,S]-etilendiaminodisuccinato según la reivindicación 7 o una célula bacteriana recombinante del género *Amycolatopsis*, particularmente de *Amycolatopsis japonicum*, que no expresa ninguna proteína o péptido, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 61, y/o no contiene ningún ácido nucleico, que contiene o consistente en una secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO 62, y
 - b) purificación de [S,S]-etilendiaminodisuccinato a partir de la célula y/o de un medio de cultivo utilizado para la célula.
9. Kit para la biosíntesis de [S,S]-etilendiaminodisuccinato, que incluye un componente que se selecciona del grupo consistente en al menos una proteína o un péptido según la reivindicación 1, al menos un ácido nucleico según la reivindicación 2 o 3, un grupo de genes o un operón según la reivindicación 4, un vector según la reivindicación 6, una célula huésped según la reivindicación 7 y combinaciones de los mismos.

Figura 1

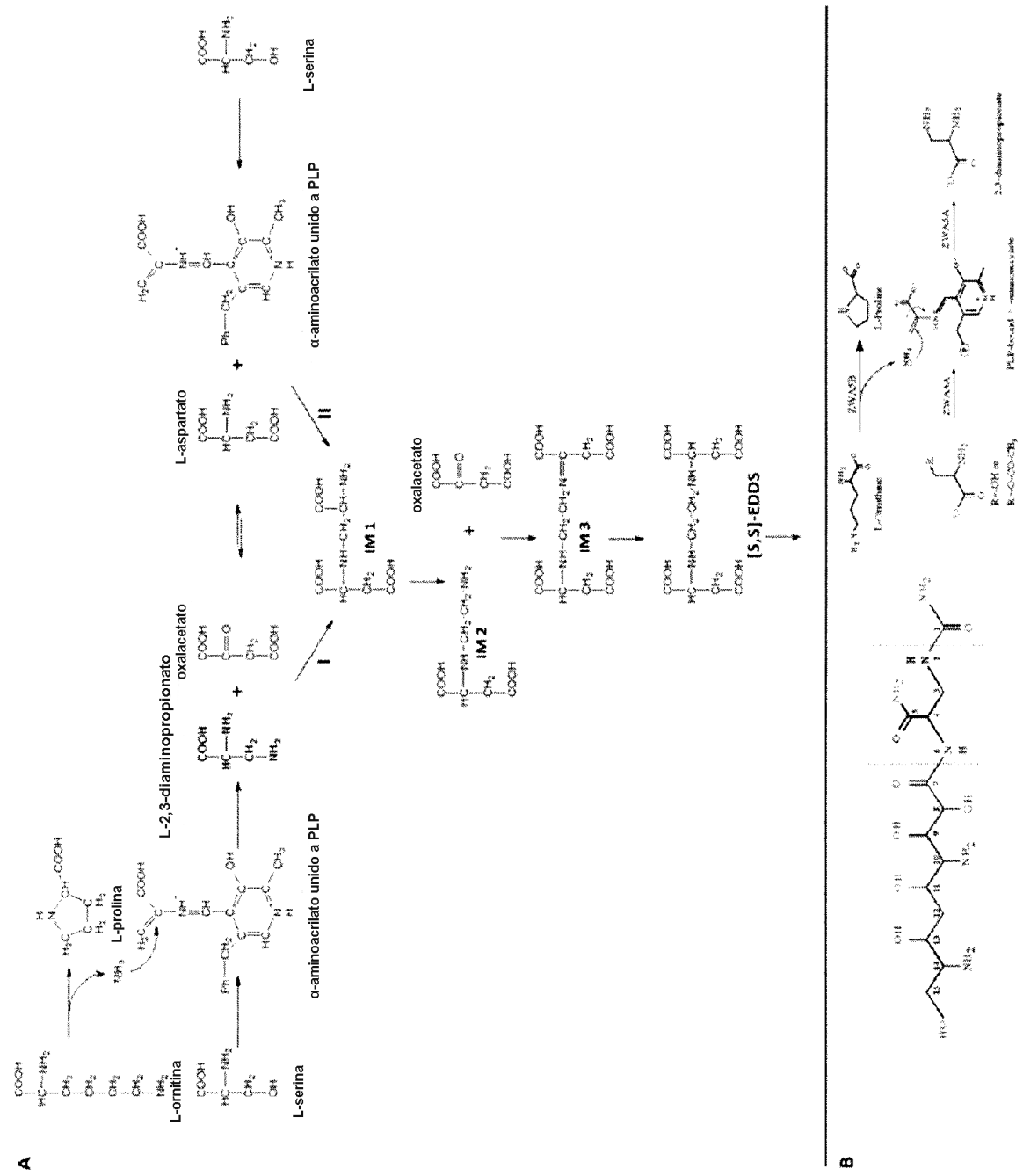
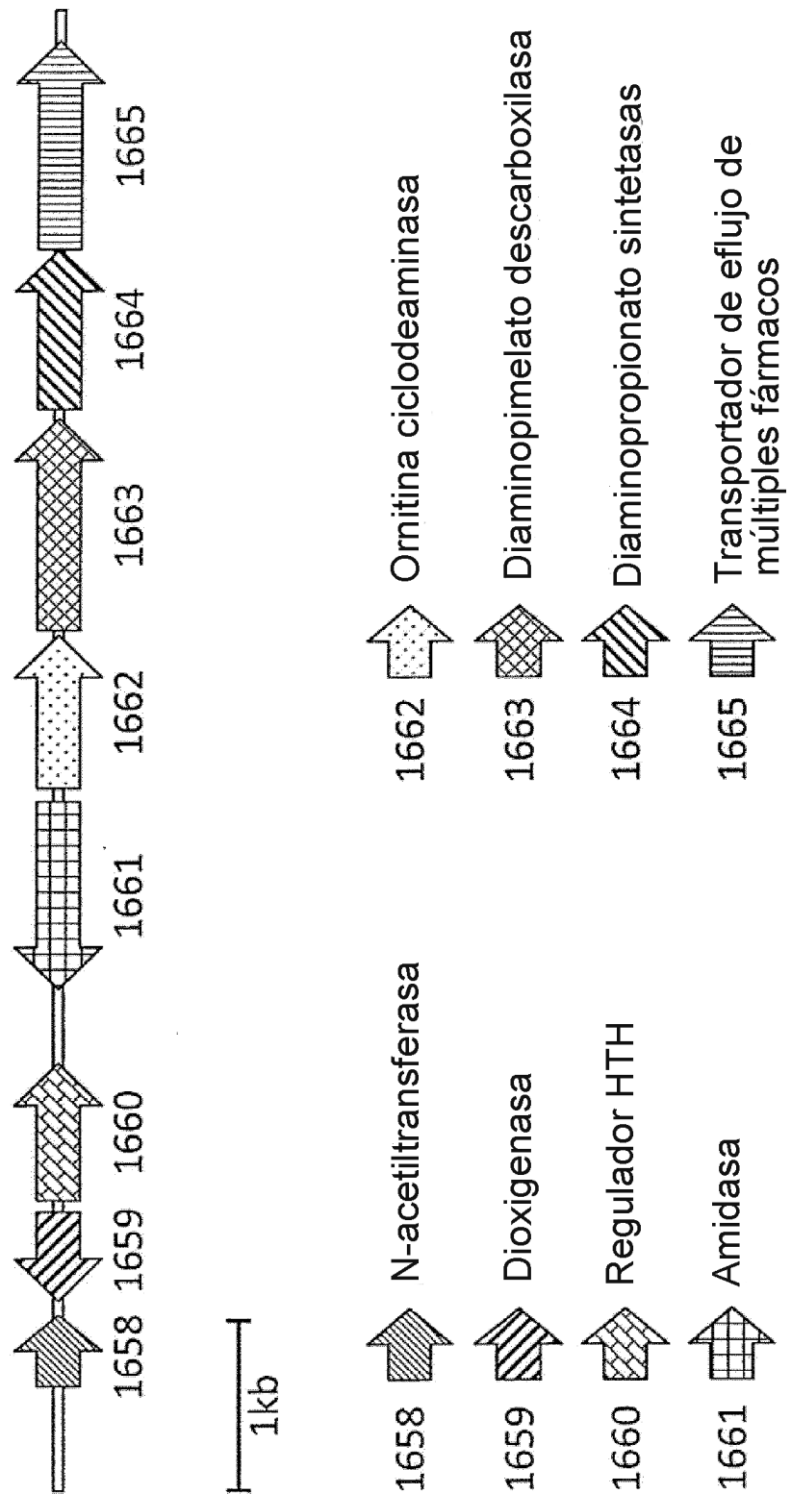
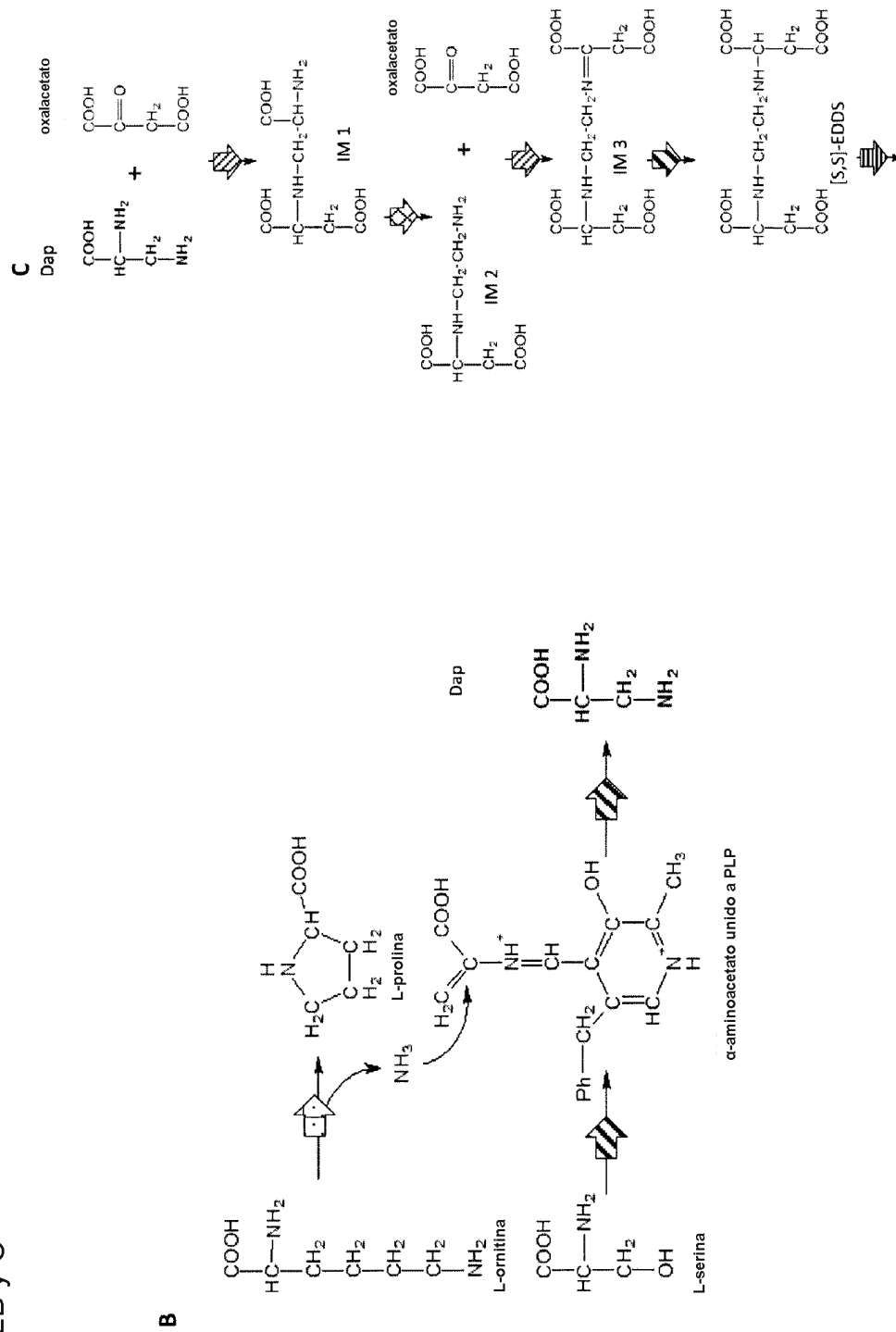


Figura 2A



Figuras 2B y C



Figuras 3

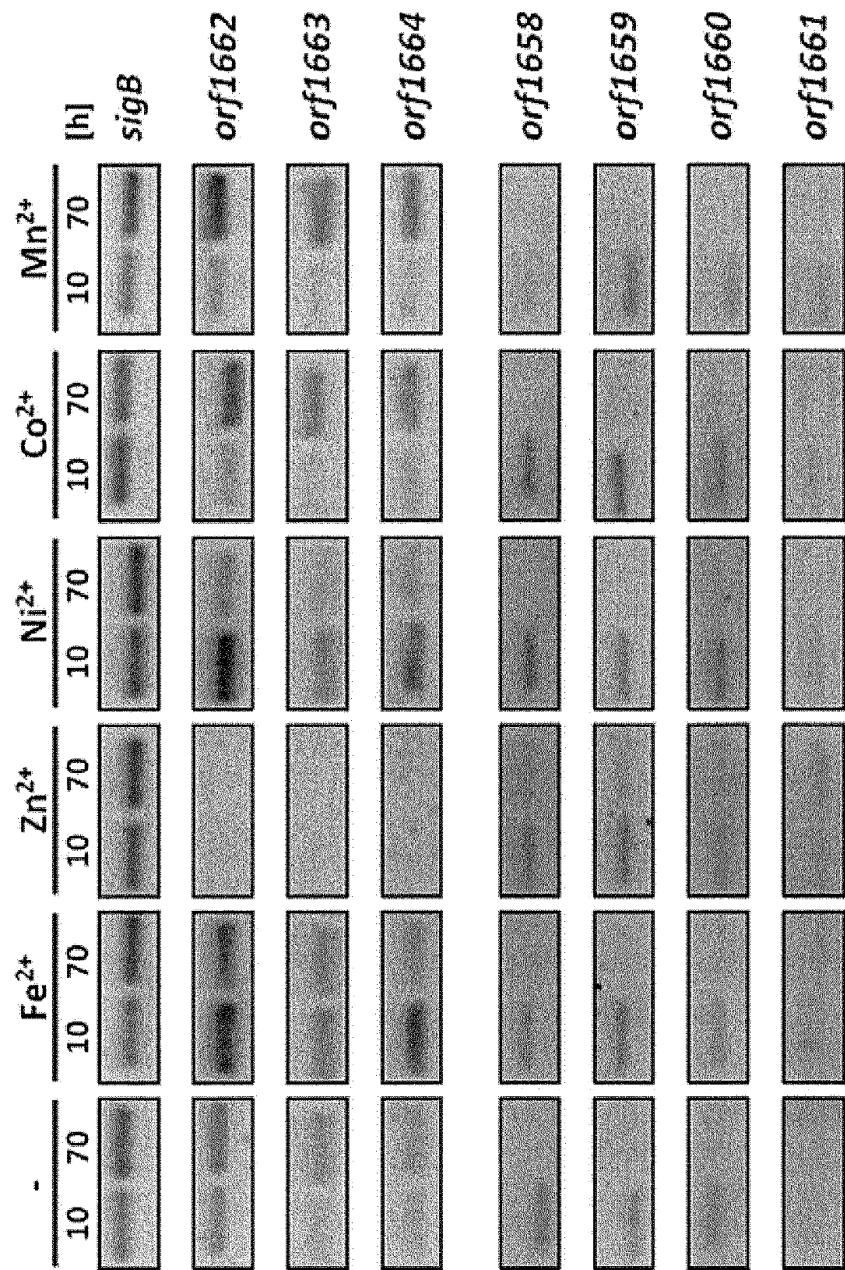
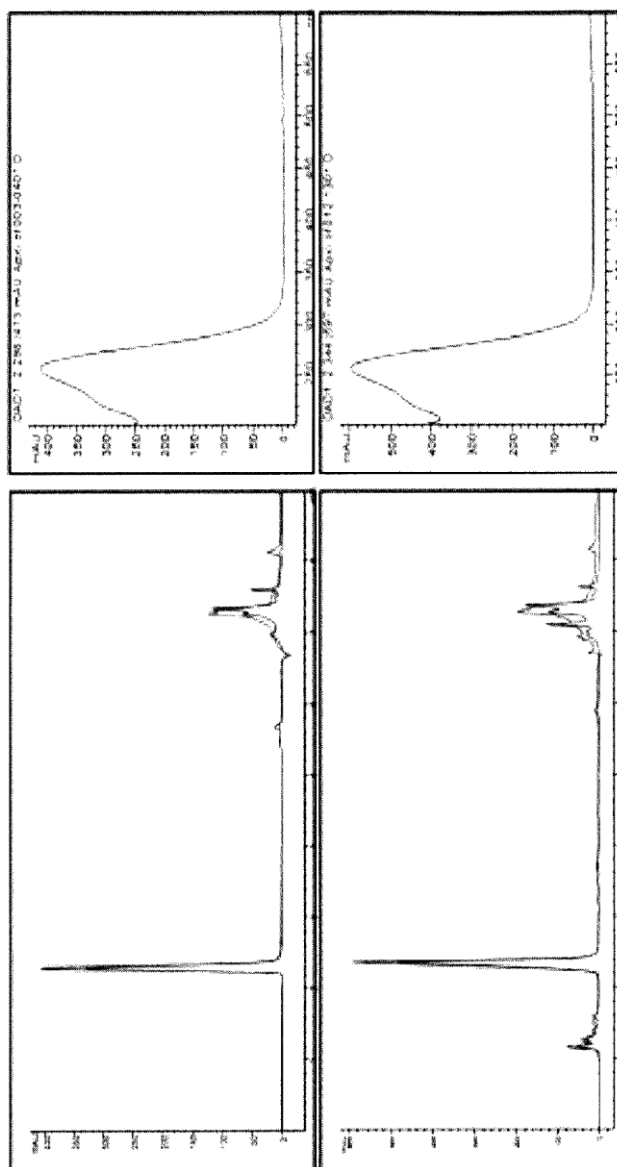


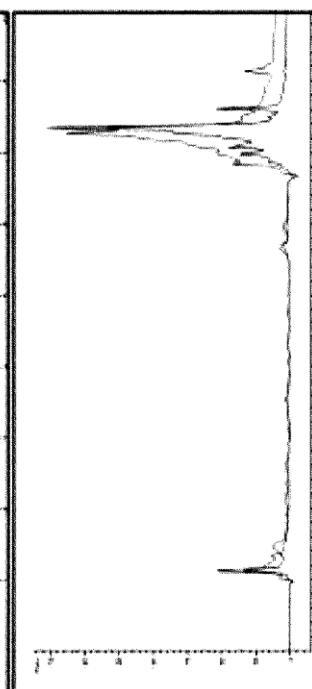
Figura 4

S,S-EDDS: HPLC-UV/VIS

PATRÓN



***A. japonicum* WT**



***A. japonicum* Δ orf1662-64**

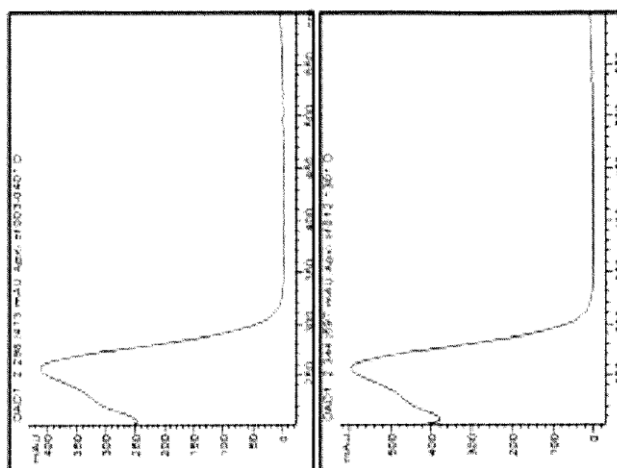


Figura 5

S,S-EDDS: HPLC-UV/VIS

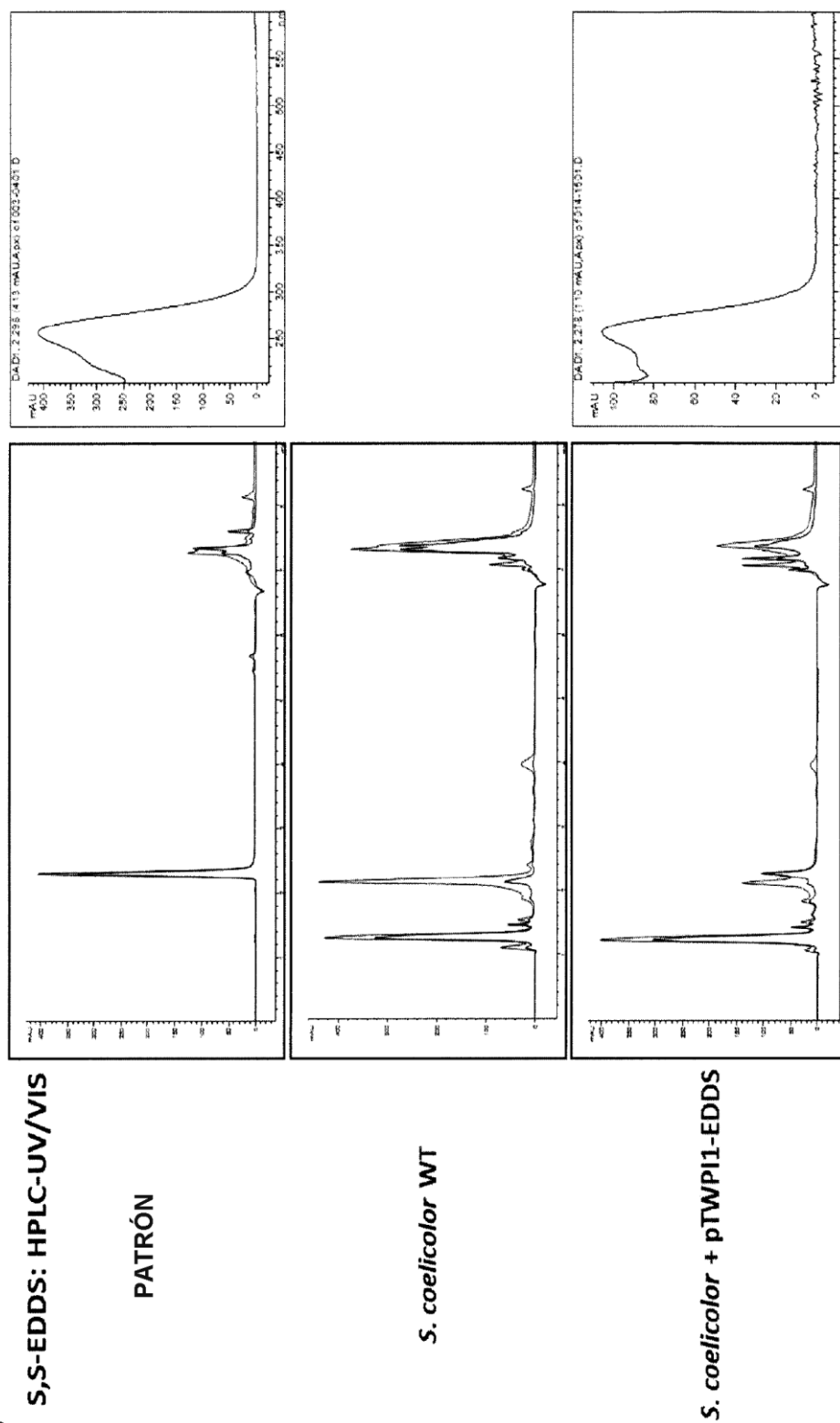


Figura 6

Zur_{sc}: N¹V--TTA--GPPVKG-RATRQRAAVSAALQEVEEFRSAQELHMLKHKGDAVGLTTVYRT
ORF5768: N¹MSPPTANSSAPVPGRRSTKQRAAAVELLKEIDDFRSAQELHDELKRKRGDGIGLTTVYRTL

Zur_{sc}: QSLADAGEVDVLRTAESGVYRRCTGDHHHLVCRACGKA VE EGP AVEGWAEIAAEH
ORF5768: QSLSEAGEIDLRLDTGEAIYRRCSS-HHHHHLLVCRLCGSTVEEGPAVERWAEKIASEH

Zur_{sc}: GYNVAHTVEIFGTCDAGASGG^{139C}
ORF5768: GFSDISHTVEIVGTCSNH^{137C}

Figura 7A

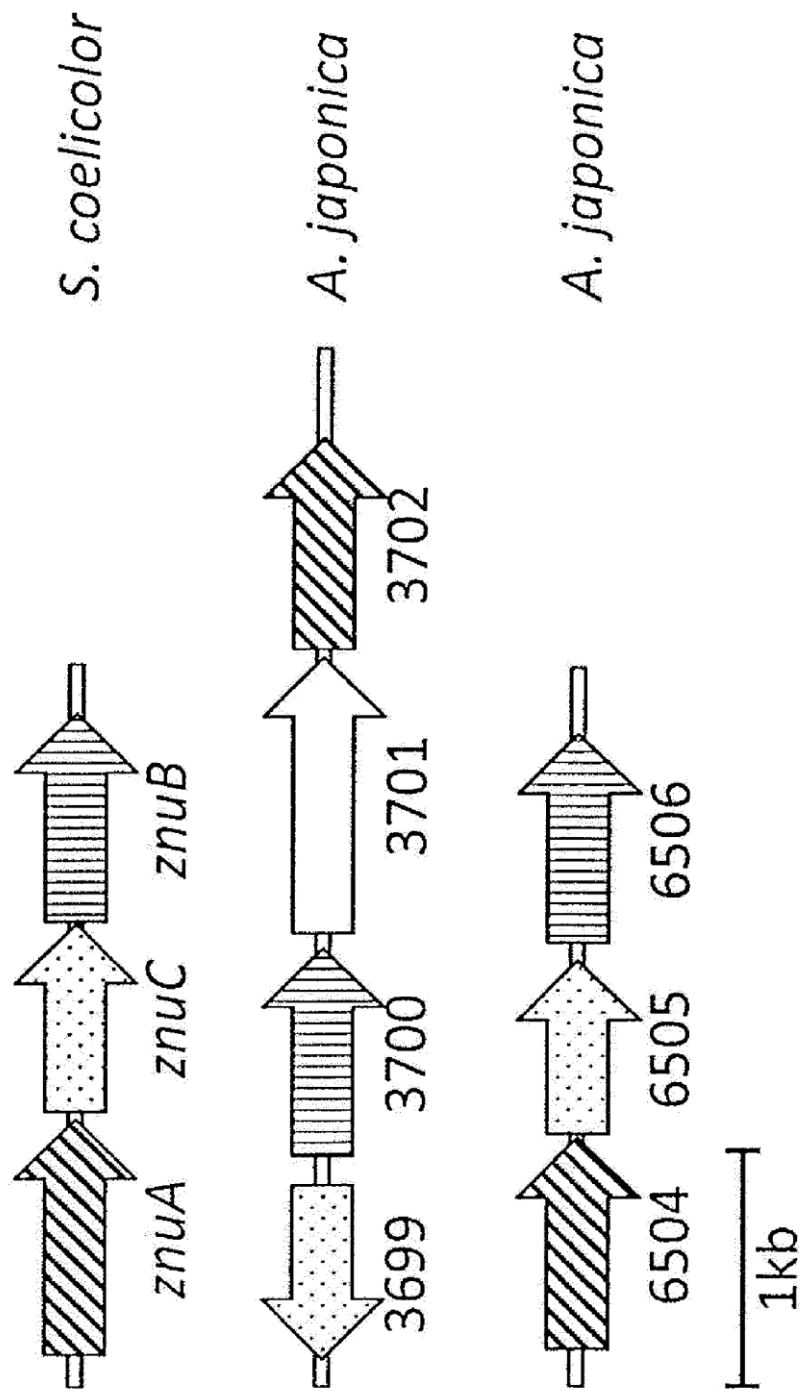


Figura 7B

	<i>S.coelicolor</i>			<i>B.subtilis</i>		
	ZnuA	ZnuB	ZnuC	MntA	MntB	MntC
ORF3699			29/48			27/53
ORF3700		68/79			32/50	
ORF3702	24/42			27/44		
ORF6504	23/40			28/46		
ORF6505			29/45			43/52
ORF6506		37/53			43/58	

Figura 8

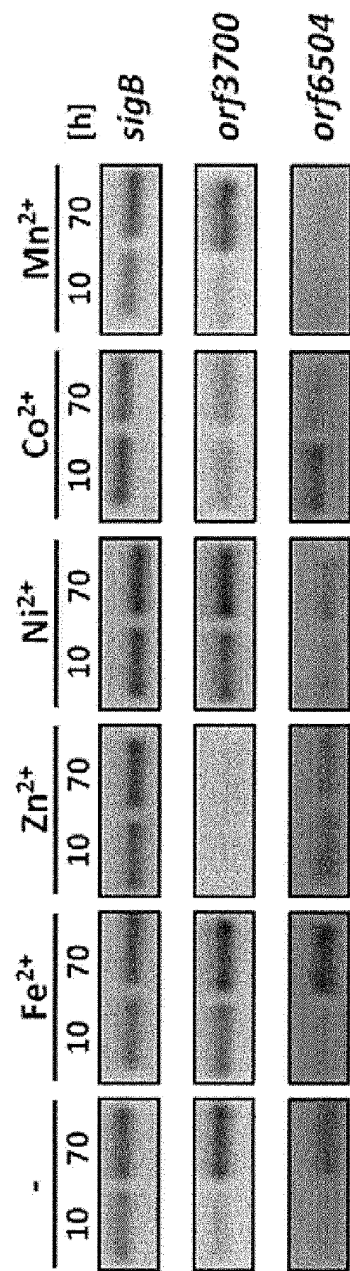


Figura 9

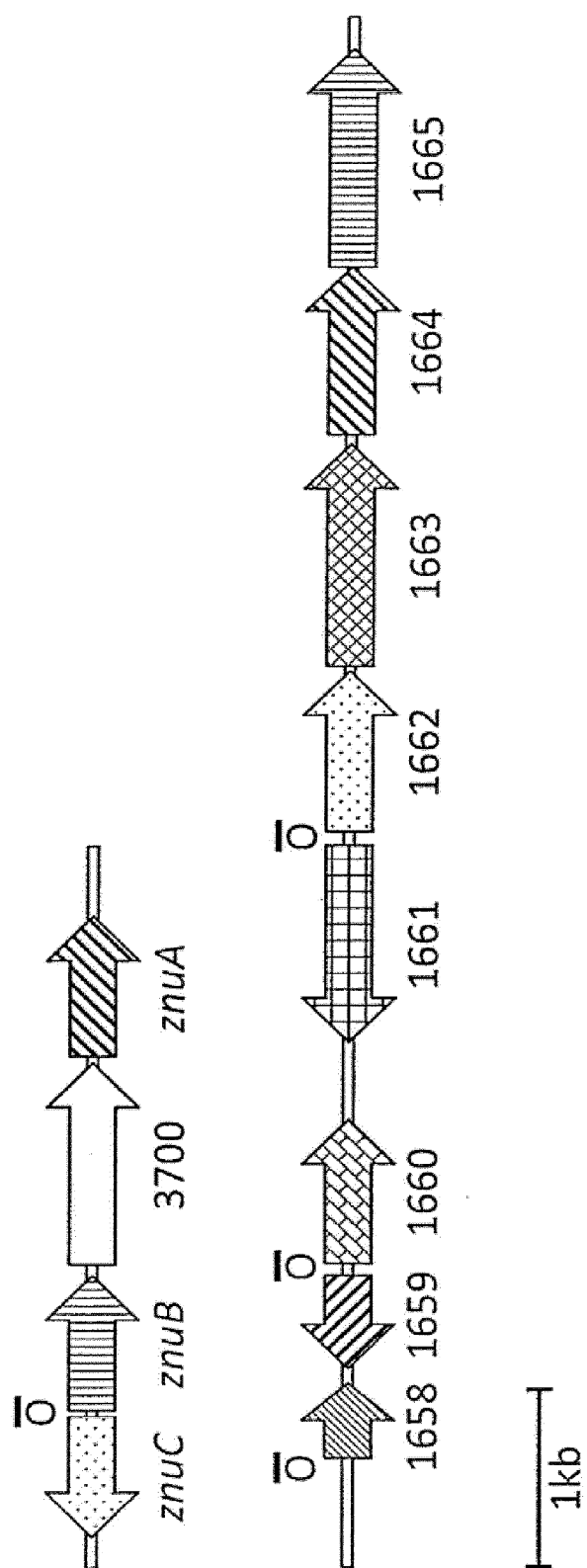


Figura 10

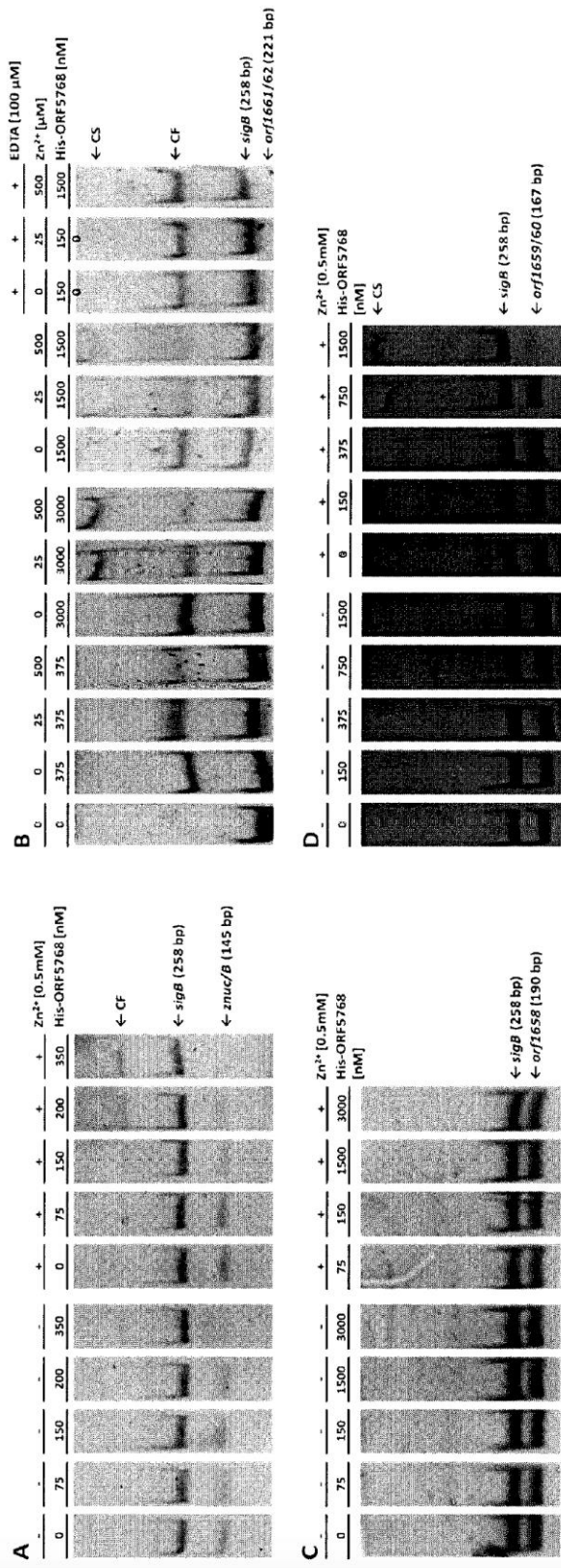


Figura 11

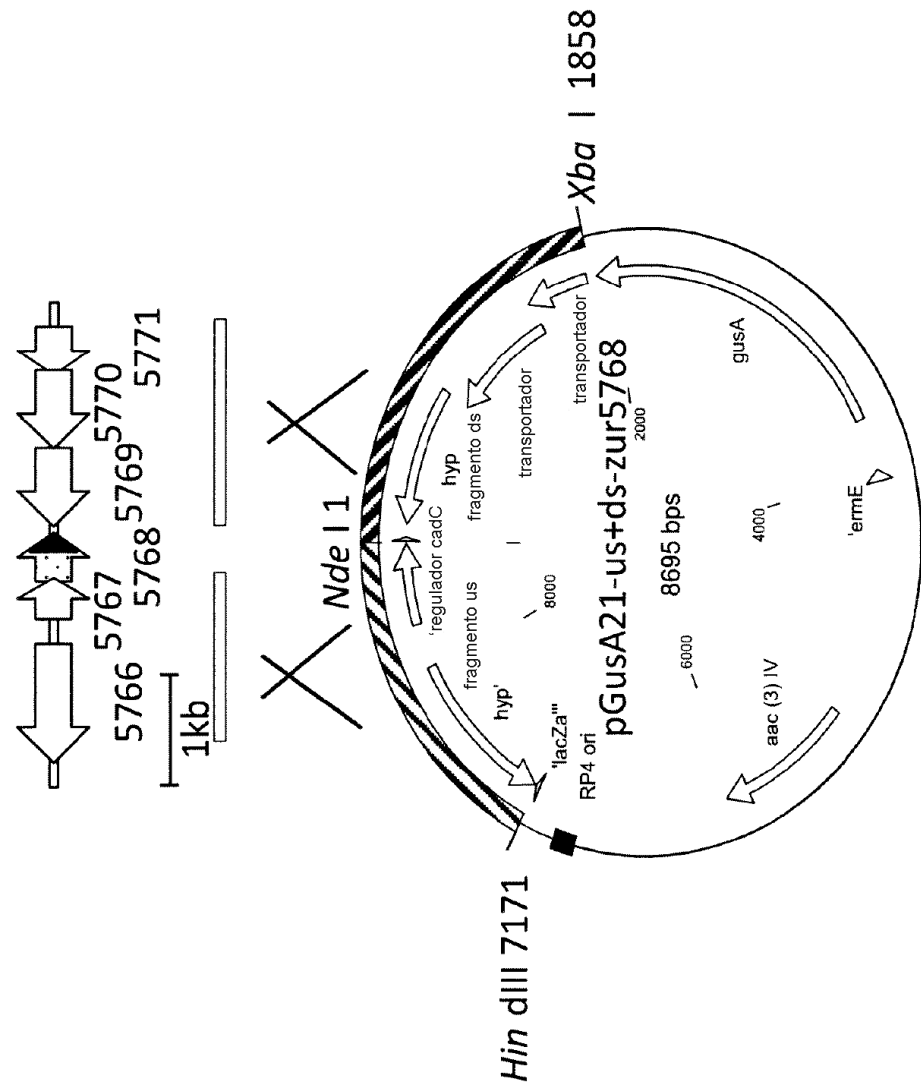
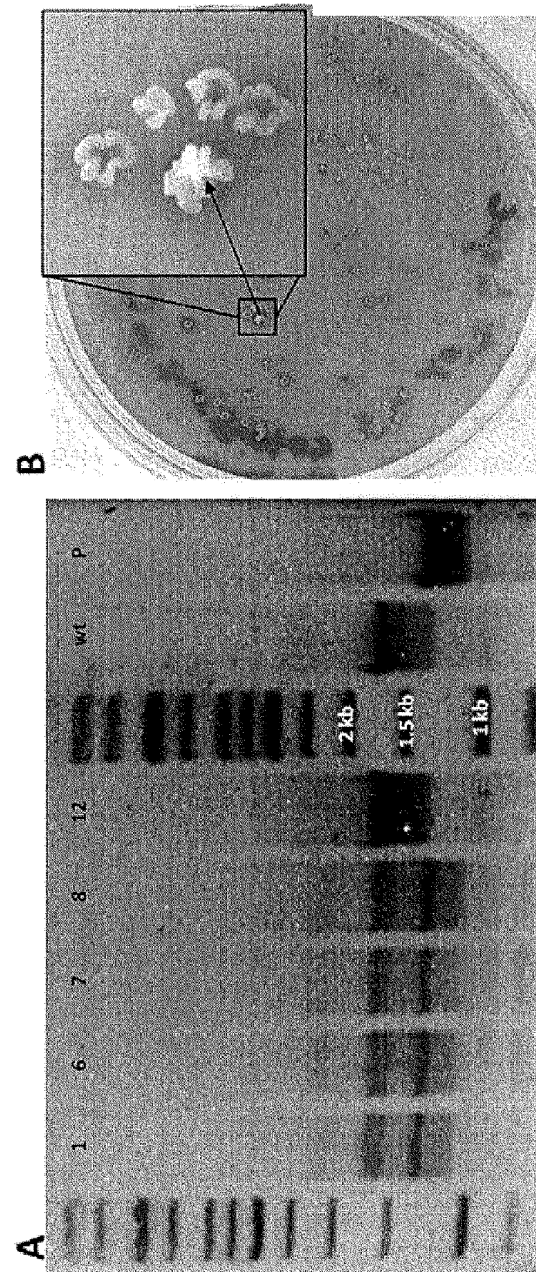


Figura 12



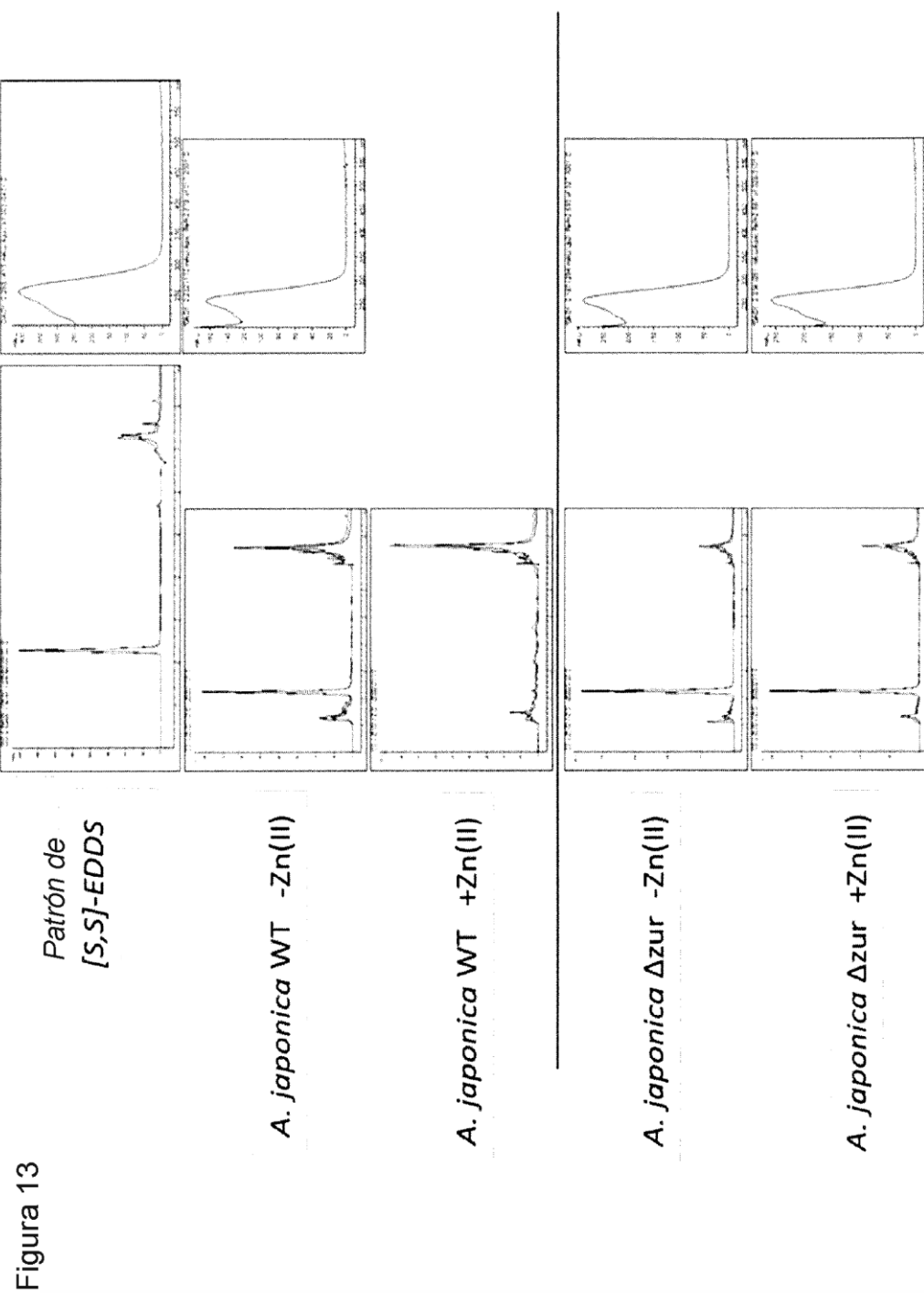


Figura 14

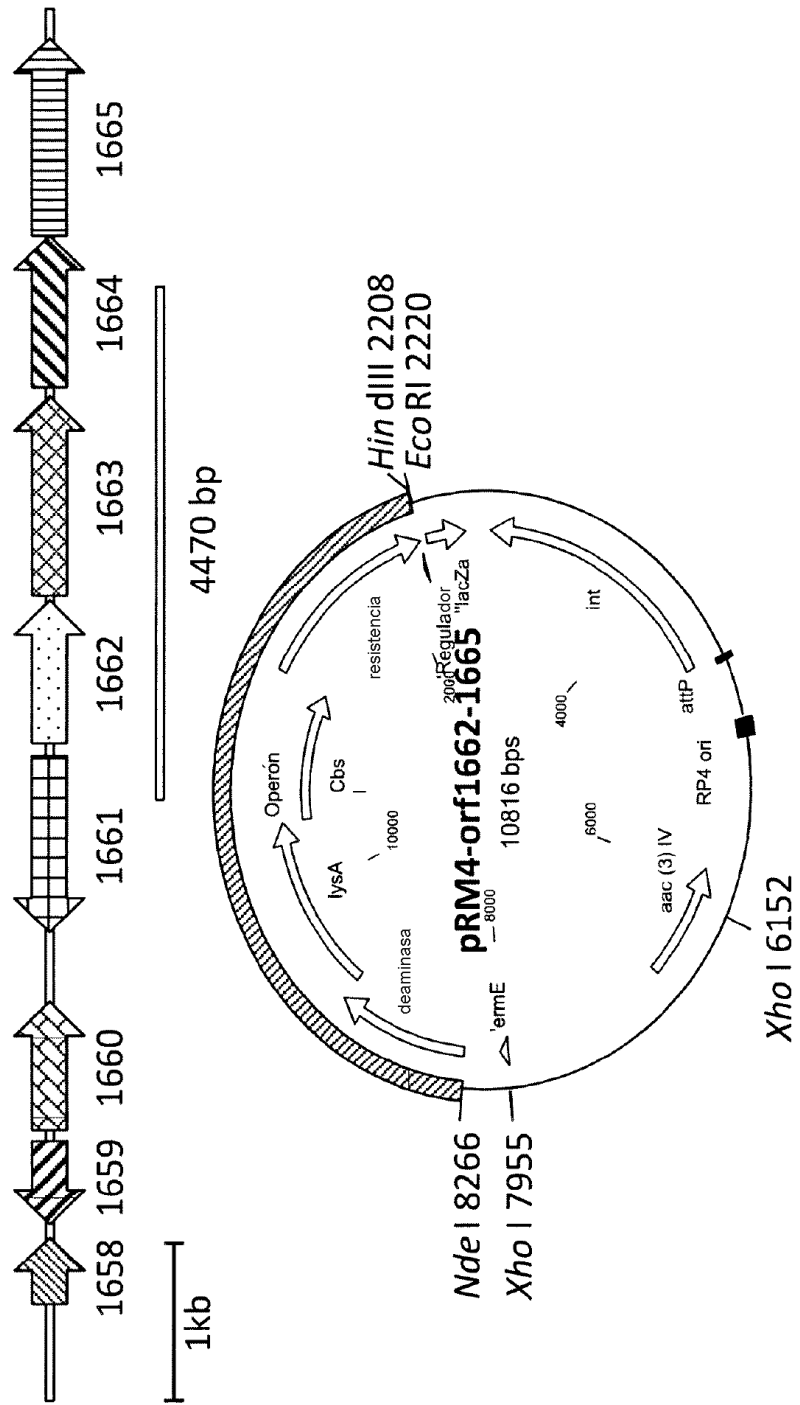
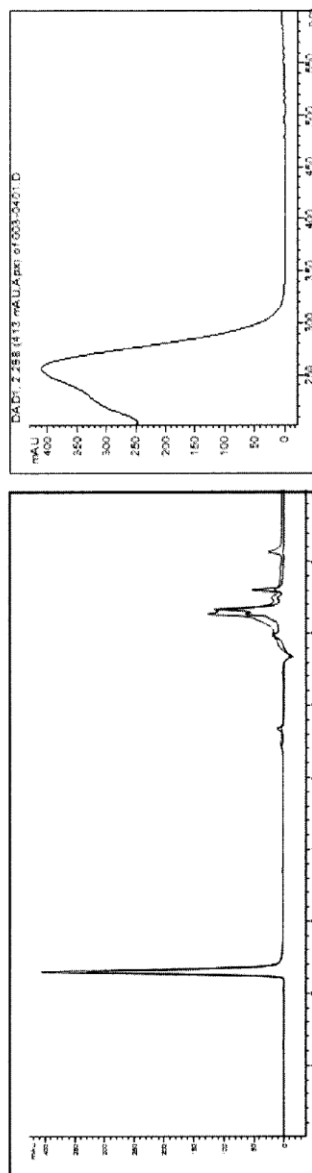


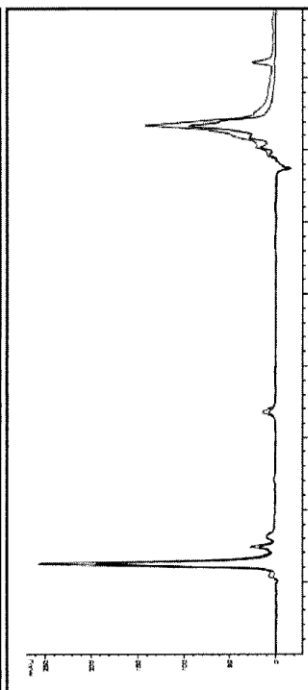
Figura 15

S,S-EDDS: HPLC-UV/VIS

PATRÓN DE [S,S]-EDDS



***A. japonicum* WT
+Zn²⁺**



***A. japonicum* WT
+ pRM4-orf1662-65**

+Zn²⁺

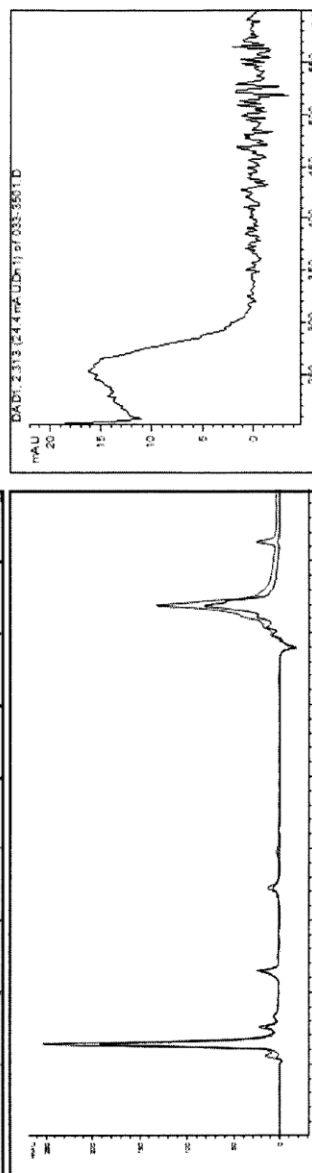


Figura 16

