(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0128624
(43) 공개일자 2014년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/60* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0047258
(22) 출원일자 2013년04월29일
심사청구일자 2013년04월29일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이진원
서울 송파구 양재대로 1218, 201동 1601호 (방이동, 올림픽선수,기자촌아파트)
백승필
대전 유성구 노은로426번길 15, 602동 1604호 (하기동, 송림마을6단지아파트)
박수현
경기 군포시 산본천로 12, 624동 1101호 (산본동, 을지아파트)
(74) 대리인
양부현

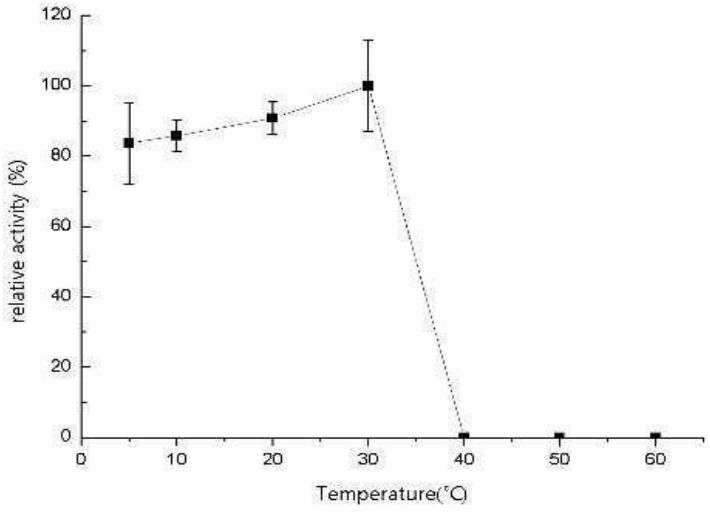
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **대장균 시스템을 이용한 Photobacterium profundum SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 대장균 시스템을 이용한 Photobacterium profundum SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 제조 방법에 관한 것으로, (a) 광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacterium profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계; (b) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0020501
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응 기초원천기술개발사업
연구과제명 해양유래 CA-PEPCase System 기반 생물전환 원천 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2010.06.23 ~ 2015.06.22

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpruvate carboxylase) 발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) 광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacterium profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계;

(b) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 재조합 벡터는 프로모터 서열, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 코돈 최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 뉴클레오타이드 서열 및 전사 터미네이터 서열이 작동적으로(operatively) 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 프로모터는 T7 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 전사 터미네이터는 T7 전사 터미네이터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 형질전환 대장균.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 제조방법:

(a) 상기 제 5 항의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 대장균을 배양하여 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 생산하는 단계; 및

(b) 상기 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 수득하는 단계.

청구항 7

상기 제 6 항의 제조방법에 의해 제조된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 3 내지 33℃의 온도에서 최적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 포스포에놀피루브산 카르복실화효소.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 pH 7.5 내지 pH 10.5에서 최적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 포스포에놀피루브산 카르복실화효소.

청구항 10

광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacterium profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(phosphoenolpyruvate carboxylase)에 대한 대장균(*Escherichia coli*)에서의 코돈 최적화된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대장균 시스템을 이용한 Photobacterium profundum SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase)는 식물 및 박테리아에 존재하는 효소로 이산화탄소가 해리되어 생성되는 중탄산염(bicarbonate, HCO_3^-)을 사용해 포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate)을 탄소 4개로 이루어진 화합물인 옥살로아세트산(oxaloacetate)으로 전환하는 기작을 담당한다. 이와 같은 효소의 반응은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소가 공기 중의 이산화탄소를 이용해 화합물을 만들 수 있는 가능성을 보여주며, 세계적으로 문제가 되고 있는 지구온난화를 개선하기 위한 '이산화탄소의 저감 및 처리기술'에 쓰일 수 있는 효소로서 주목 받고 있다. 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 반응식은 다음과 같다:

[0003] [화학식]



[0004] Phosphoenolpyruvate Oxaloacetate Phosphate

[0005] 자연계에서는 이산화탄소 흡수, 고정화의 다양한 방식이 존재하며, 이를 모방하고 활용하려는 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 특히 여러 생물들 중, 해양 유래 생물(박테리아, 미세조류 등)은 식물과 다른 이산화탄소 고정화 방식을 가지고 있으며, 광합성 효율 또한 육상 식물에 비해 높다는데 주목 받고 있다. 그 이유는 식물에 비해 증식 속도가 매우 빠르며, 유전자 조작이 식물세포 보다 쉽고, 기존의 식용작물이 아닌 것이 중요 이유다. 해양 생물의 기능, 시스템을 규명하는 해양바이오 기술은 세계적으로 주목 받기 시작한지 얼마 되지 않았다. 특히 우리나라의 경우 선진국인 미국 및 일본에 비해 관련 특허 기술 등이 많이 부족한 실정이다. 그러므로 3면이 해양으로 둘러싸인 우리나라의 지형적 특성을 이용해 보다 많은 지원과 투자가 확대 되어야 할 것이다.

[0006] 해양 박테리아인 *Photobacterium profundum* SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 관한 연구는 세계적으

로 한 번도 수행되지 않았다. *Photobacterium profundum* SS9의 전체 유전자 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 대해서는 연구 된 것이 없으며, 대장균 시스템을 통해서 발현 및 정제를 시도한 연구도 있지 않다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 자연계의 이산화탄소 흡수, 고정화 방식을 모방하여 지구온난화의 주원인인 이산화탄소의 저감 및 처리기술에 응용하고자 노력하였다. 그 결과, 해양박테리아인 광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacterium profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpruvate carboxylase)를 코돈 최적화(codon optimization)하고 이를 도입한 형질전환(trandformed) 대장균(*Escherichia coli*)을 제조하여 효율적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소을 제조할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 광세균 프로펀덤 SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 대한 대장균에서의 코돈 최적화된 핵산분자를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpruvate carboxylase) 발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공합니다:

[0016] (a) 광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacterium profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합한 코돈 최적화(codon optimization)하여 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 수득하는 단계;

[0017] (b) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

[0018] (c) 상기 재조합 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환 대장균을 제조하는 단계.

[0019] 본 발명자들은 자연계의 이산화탄소 흡수, 고정화 방식을 모방하여 지구온난화의 주원인인 이산화탄소의 저감 및 처리기술에 응용하고자 노력하였다. 그 결과, 해양박테리아인 광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacteria profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpruvate carboxylase)를 코돈 최적화(codon optimization)하고 이를 도입한 형질전환(trandformed) 대장균(*Escherichia coli*)을 제조하여 효율적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소을 제조할 수 있음을 규명하였다.

[0020] 본 발명의 대장균 제조방법을 각 단계로 나누어 상세하게 설명한다.

[0021] 단계 (a): 코돈 최적화(codon optimization) 단계

[0022] 본 발명의 대장균을 제조하기 위해, 광세균 프로펀덤 SS9(*Photobacterium profundum* SS9)의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소(Phosphoenolpyruvate Carboxylase) 뉴클레오타이드 서열을 대장균(*Escherichia coli*)에서의 발현에 적합하도록 코돈 최적화(codon optimization)한다.

[0023] 본 발명에서 대장균에서 발현하고자하는 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 카르복실라아제군 중 하나로 바이카르보네이트의 첨가로 포스포에놀피루브산을 C4 화합물 옥살로아세테이트로 전환하는 반응을 촉매한다. 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 한분자의 포스포에놀피루브산, 이산화탄소 및 물을 옥산로아세테이트 및 포스페이트로 전환하는 작용을 촉매하기 때문에 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 작용을 통해, 탄소를 고정화시킴으로서 대기 중의 이산화탄소를 감소시킬 수 있다.

[0024] 본 발명에서는 대장균에서 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소가 보다 고발현 될 수 있도록 대장균에 적합한 코돈으로 전환하였다. 코돈 최적화 과정을 거치면 유전자 서열은 염기서열만 전환될 뿐, 아미노산 서열은 전환되지 않는다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이고, 아미노산 서열은 서열목록 제2서열이다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0027] 단계 (b): 재조합 벡터의 제조

[0028] 이어, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.

[0029] 본 명세서에 있어서, 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0030] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0031] 본 발명의 코돈 최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 뉴클레오타이드 서열을 발현 조절서열에 작동가

능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0032] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, T7 프로모터, tre 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^{λ}프로모터, pR^{λ}프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터 및 trp 프로모터 및 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 벡터에 사용되는 프로모터는 T7 프로모터이고, 종결서열은 T7 터미네이터이다.

[0033] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 lac 오페론를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0034] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pETDuet-1, pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λgt4, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pETDuet-1을 사용한다.

[0035] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 앰피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0036] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'→3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 프로모터 서열, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 코돈 최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 뉴클레오타이드 서열 및 전사 터미네이터 서열이 5'→3' 순서대로 작동적(operatively) 결합된다.

[0038] 본 발명의 발현 벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

[0039] 단계 (c): 형질전환 대장균의 제조

[0040] 마지막으로, 상기 재조합 벡터를 대장균에 형질전환 대장균을 제조한다.

[0041] 상기 코돈최적화된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소의 뉴클레오타이드 서열이 포함된 재조합 벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 열 충격법(Mahipal S. et. al., International Journal of Biotechnology and Biochemistry USA, 4:561-568(2010)), $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 바람직하게는, 본 발명의 단계 (c)는 열 충격법으로 실시한다.

[0042] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* W3110, *E. coli* JM109, *E. coli* RR1, *E.*

coli LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 형질전환 대장균의 제조방법에 의해 제조된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 형질전환 대장균을 제공한다.

[0044] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하느 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 제조방법을 제공한다.

[0045] (a) 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 대장균을 배양하여 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 생산하는 단계; 및

[0046] (b) 상기 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 수득하는 단계.

[0047] 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 제조방법은 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 대장균을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0048] 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 수득하기 위해, 다양한 정제방법이 이용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 컬럼 크로마토그래피[사이즈, 넷 표면 전하(net surface charge), 소수성 또는 친화력), 황산암모늄을 이용한 용해성 분류, 및 크기 차이에 따른 여과(한외 여과)와 같은 당업자가 통상적으로 사용하는 어떠한 정제방법을 포함할 수 있으며, 본 발명의 다른 구현예 따르면, 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 수득하기 위해 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제한다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 제조방법에 의해 제조된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 제공한다.

[0051] 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 저온(3-15℃)에서도 80% 이상의 효소활성을 갖는다.

[0052] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 3 내지 33℃의 온도에서 최적 활성을 갖고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 10 내지 33℃의 온도에서 최적 활성을 갖으며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 20 내지 32℃의 온도에서 최적 활성을 갖는다.

[0053] 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 pH 7.5 내지 pH 10.5의 중성 및 염기성 조건에서 우수한 활성을 갖는다.

[0054] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 pH 7.5 내지 pH 10.5에서 최적 활성을 갖고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 pH 8.0 내지 pH 10.5에서 최적 활성을 갖으며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 pH 8.2 내지 pH 10.3에서 최적 활성을 갖는다.

[0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 광세균 프로펀덤 SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 대한 대장균에서의 코돈 최적화된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산분자를 제공한다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (a) 본 발명은 해양 박테리아 *Photobacterium profundum* SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코돈최적화 기술을 통한 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpruvate carboxylase) 발현용 형질전환 대장균의 제조방법 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 발현용 대장균을 제공한다.

[0058] (b) 본 발명의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소는 저온 및 염기성 조건에서도 우수한 효소활성을 제공한다.

[0059] (c) 본 발명은 대장균 시스템을 통한 우수한 활성의 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 발현벡터 pETDuet-1에 OPPP 유전자가 삽입된 것을 전기영동을 통해 확인한 결과를 보여준다.

도 2는 pSGJS117의 지도를 나타낸다.

도 3은 *E. coli* SGJS117 시스템을 통해 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화 효소를 확인한 SDS-PAGE 결과를 나타낸다(라인 1: 사이즈 마커, 라인 2: 컨트롤인 공벡터를 가지는 재조합 대장균을 파쇄한 샘플, 라인 3: 컨트롤인 공벡터를 가지는 재조합 대장균을 파쇄한 후, 원심분리 하여 얻어진 상등액 샘플, 라인 4: 본 발명에서 만든 효소 생산 및 정제 대장균 시스템 *E. coli* SGJS117의 세포를 파쇄한 샘플, 라인 5: *E. coli* SGJS117의 세포를 파쇄한 후, 원심분리 하여 얻어진 상등액 샘플, 화살표로 표시)

도 4는 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 정제한 후, 확인한 SDS-PAGE 결과를 나타낸다(라인 1: 사이즈 마커, 라인 2: *E. coli* SGJS117로부터 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 정제한 샘플, 화살표로 표시한 부분이 포스포에놀피루브산 카르복실화효소가 정제되었음을 확인할 수 있는 단일 단백질 밴드이다).

도 5는 정제된 해양 박테리아 *Photobacterium profundum* SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 온도 안정성 테스트 결과를 나타낸다. 5-30℃ 까지 80 % 이상의 활성을 유지하며 안정성을 보여줬지만, 30℃를 넘으면 활성이 떨어져 40-60℃에서는 효소의 활성이 존재하지 않음을 확인하였다.

도 6은 정제된 해양 박테리아 *Photobacterium profundum* SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 pH 안정성 테스트 결과를 나타낸다. pH 8.5-10일 때, 효소 활성이 100 % 가까이 유지되는 안정성을 보여주었고, pH 11.5 이상이나, pH 6 이하에서는 효소의 활성이 거의 존재하지 않음을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0062] **실시예 1: 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 OPPP 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조**

[0063] 해양 박테리아 *Photobacterium profundum* SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 암호화하는 유전자서열(GenBank, NCBI)을 기초로 코돈 최적화(codon-optimization)하여 제작된 유전자를 OPPP라 명명하였다.

[0064] 프라이머(primer)를 제작해 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 상기 OPPP를 클로닝 하였다(표 1 및 표 2).

표 1

[0065]

유전자	생산 효소
OPPP	Phosphoenolpyruvate carboxylase

표 2

[0066]

유전자	프라이머 서열		제한 효소
OPPP	F	5'-GCCAGGATCCGAATTCGATGAACGAAAAATACAGCGCA-3'	*EcoR*I
	R	5'-ATGCGGCCGCAAGCTTTTAGCCAGTGTTACGCATGCC-3'	*Hind*III

[0067] 표 1의 유전자들은 표적 유전자만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2에 제공된 프라이머를 사용하여 증폭하였

다. 상기 유전자 OPPP는 2628 bp의 크기로 증폭되었다.

[0068] 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건[10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM $MgSO_4$, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)] 조건에 95℃/5분(변성 단계), 56℃/1분(어닐링 단계) 및 72℃/1분(신장 단계)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(변성 단계), 56℃/30초(어닐링 단계) 및 72℃/1분(신장 단계)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(변성 단계), 56℃/1분(어닐링 단계) 및 72℃/5분 (신장 단계) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 겔(agarose gel) 상에서 확인 후 정제한 뒤, In-fusion HD 클로닝 키트(Clontech, USA) 제품을 사용하여 발현벡터인 pETDuet-1에 삽입하여, 재조합 플라스미드인 pETDuet-1::OPPP를 제작하였으며 이를 pSGJS117이라 명명하였다(도 1 및 도 2). 상기 재조합 플라스미드를 대장균(*E. coli* BL21(DE3) competent cell, RBS)에 형질전환하여 재조합 균주를 제조하였다.

[0069] **실시예 2: 이종 대장균 형질전환체 제조**

[0070] 본 발명에서는 대장균 BL21(DE3) 컴피턴트 세포에 열 충격(42℃) 방법을 사용해 재조합 플라스미드를 숙주세포 내에 도입하는 형질전환방법을 사용하였다. BL21(DE3) 컴피턴트 세포 20 ㎕에 1 내지 2 ㎕의 재조합 플라스미드(pSGJS117)를 첨가하였다.

[0071] 상기의 플라스미드가 포함된 21-22 ㎕의 액체는 열 충격 방법을 이용해, 얼음에서 20분 동안 정치하고, 1분 동안 42℃ 조건에서 배양해 열충격을 준 다음, 다시 20분 동안 얼음에서 배양해 안정화하였다. 배양된 형질전환체는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 아가 배지(10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물, 아가 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37℃에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pSGJS117을 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질 전환한 *E. coli* SGJS117 재조합 균주를 개발하였다(표 3).

표 3

[0072]

개발균주	-
E. coli SGJS117	*E. coli* BL21(DE3)::pETDuet-1::OPPP

[0073] **실시예 3: 재조합 대장균에서 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 (phosphoenolpyruvate carboxylase) 생성 확인**

[0074] *E. coli* SGJS117 재조합 균주는 앰피실린 50 ㎍/㎖ 포함하는 LB 배지에 16시간 정도 전 배양 시키고 그 배양액을 다시 앰피실린 50 ㎍/㎖ 포함하는 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 ㎚에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액을 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다.

[0075] 상기에서 개발된 재조합 대장균 시스템에 의한 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 생산을 확인하기 위하여 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 수행하였다. 샘플준비과정은 보관용 고체균 하나(단일 콜로니)를 10 ㎖ 바텀 튜브(bottom tube)에 들어있는 앰피실린 50 ㎍/㎖이 첨가된 3 ㎖ LB 배지에 37℃, 200 rpm 상태에서 16시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 앰피실린(50 ㎍/㎖), IPTG(isopropylthio-β-galactoside) 0.5 mM이 첨가된 200 ㎖의 LB 배지(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물) 배지에 1 %의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm 상태에서 24시간 동안 배양하고 샘플을 채취하였다. 배양 후 원심분리(4500rpm, 5 분)를 통해 배양된 균체만을 수집한 후, 완충액[25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM NaCl, 5 % 글리세롤]을 사용하여 균체를 부유시켜 소니케이터(ULH-700S, Ulsso hi-tech, Korea)로 세포를 파쇄하는 작업을 3분 30초 동안 2초 on/off 조건으로 수행하였다. 그 후 원심분리(4500 rpm, 5분, 4℃)하여 상등액을 SDS-PAGE 샘플로 사용하였다. 라인마다 동일한 단백질의 양을 로딩하기 위하여 브래드포드(Bradford)법을 사용하여 단백질을 정량하여 20 ㎕ 씩 SDS-PAGE에 로딩하였다. 겔 키트로는 Mini PROTEAN 3 셀(BIO-RAD, USA)을 사용하였으며 반응 시간은 70 볼트에서 1시간 30분, 색은 코마시 블루(Coomassie Blue) 염색약 G25를 사용하였다. 스태킹 겔(stacking gel) 및 러닝 겔(running gel)은 바이오라드에서 미리 만들어진 레드 겔(10% Tris-HCl)을 사용하였다. 다른 실험에 필요한 버퍼들은 일반적으로 조제하는 방법으로 만들어 사용하였다.

[0076] 공벡터를 형질전환한 재조합 대장균(도 3의 라인 2, 3)은 SDS-PAGE 상에서 해당 효소를 생산하지 못함을 확인하였다. 코돈 최적화를 한 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 유전자(OPPP)를 가지는 *E. coli* SGJS117은 해양 박테리아 *Photobacterium profundum* SS9의 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 해당하는 98 kDa의 밴드가

나타났고(도 3의 라인 4, 5, 화살표로 표기), 이것은 재조합 대장균에서 해당 효소가 생산되었음을 뒷받침하며, 이는 재조합 벡터인 상기 pSGJS117을 통해 생산되었음을 확인하였다(도 3의 라인 4, 5, 화살표로 표기).

[0077] **실시예 4: 재조합 대장균에서 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 (phosphoenolpyruvate carboxylase)의 정제**

[0078] 생산이 확인된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 정제하기 위해, 컬럼 (Bio-rad, USA)에 His 태그 단백질 붙은 효소 단백질 정제가 가능한 아가로즈 레진(agarose resin, Elpisbiotech, Korea)을 1-2 ㎖ 패킹 한 뒤, 레진을 전하(charge) 시켜주기 위해, 바인딩 완충액(0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)을 20-30 ㎖ 흘려주었다. 그리고 SDS-PAGE로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 생산이 확인된 *E. coli* SGJS117의 처리된 상등액을 컬럼에 로딩하고, 같은 과정을 2-3번 반복하였다. 그리고 레진에 붙은 다른 단백질을 씻어 주기위해 세척 완충액(0.5 M NaCl, 60 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)을 100 ㎖ 정도 컬럼 안에 조금씩 첨가하였다. 마지막으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 얻기 위해, 용리 완충액(0.25 M NaCl, 250 mM imidazole, 10 mM Tris-HCl, pH 7.9)를 300 ㎕씩 여러 번에 걸쳐 나눠 부어주며, 각각 1.5 ㎖ 튜브에 나눠 담아 SDS-PAGE를 통해 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 정제를 확인하였다(도 4의 라인 2, 화살표로 표기).

[0079] **실시예 5: 재조합 대장균에서 생산된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 (phosphoenolpyruvate carboxylase) 활성 확인**

[0080] 개발된 재조합 균주 *E. coli* SGJS117에서 생산되고 정제된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 활성을 측정하기 위하여 보관용 고체 균체 하나를 10 ㎖ 바텀 튜브에 들어있는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 3 ㎖의 LB 배지에 16시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 200 ㎖의 LB 배지(10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물) 배지에 1%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm 상태에서 24시간 동안 배양 후, 샘플을 채취하였다. 효소 생산을 위해 유도물질인 IPTG(Isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, USA)를 첨가(최종농도: 0.5 mM)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0081] 효소활성측정방법은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 측정할 수 있도록 고안된 커플링효소(coupling enzyme)를 사용한 방법으로 1분 동안 소모되는 NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide)의 양을 측정해 활성값을 구할 수 있다. 커플링 효소를 통해 활성측정을 하는 방법은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 의해 생산된 옥살로아세트산을 사용하는 말레이트 디하이드로나아제(malate dehydrogenase)가 반응 시 소모한 NADH 양을 측정하여 간접적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 활성을 계산하는 방법이다. 소니케이터(ULH-700S, Ulsso hi-tech, Korea)를 사용하여 세포를 3분 30초 동안, 2초 on/off 조건으로 파쇄한 후 4500 rpm, 4℃ 조건에서 5분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 가지고 활성측정 실험에 사용하였다(실시예 3, 4에서 쓰인 샘플과 동일).

[0082] 활성측정 용액은 총 1 ㎖의 부피를 가진다. 구성은 0.5 M HEPES[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], 0.1 M $MgCl_2$, 0.05 M PEP(Phosphoenolpyruvate), 0.05 M $NaHCO_3$, 0.002 M NADH 및 MDH(Malate dehydrogenase, 4 유닛)를 각각 100 ㎕씩 첨가하고, 그 위에 수확 된 샘플은 25 ㎕만큼 넣어주며, 나머지 부피는 2차 증류수로 채워 1 ㎖을 맞춰주었다. 제조된 용액을 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 340 ㎚에서 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 의해 만들어진 옥살로아세트산을 사용하여, 말레이트 디하이드로나아제(malate dehydrogenase)가 반응 시 소모한 NADH의 양을 구해 간접적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 활성측정을 수행하였다(*T. Kodaki et al*. 1985). 보다 정확한 결과를 위해 효소의 활성측정 단위인 특이 활성값(Specific activity) 측정을 통해 값을 구하였다. 특이 활성을 구하기 위해 브래드포드 방법을 통해 정제된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 농도를 계산하고 그 값으로 활성값을 나누어 특이 활성값을 구할 수 있었다. 실험은 세 번 반복 수행하였다(표 4).

표 4

[0083]

효소	특이 활성(U/mg)
포스포에놀피루브산 카르복실화 효소	80.3±9.8

[0084] 측정된 활성측정값은 표 4에 표기하였으며, 효소 정제를 통해 기존 특허보다 정확한 특이 활성값을 측정할 수 있었다.

[0085] **실시예 6: 재조합 대장균에서 생산 된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 (phosphoenolpyruvate carboxylase)의 반응 온도 및 pH 안정성 테스트**

[0086] 포스포에놀피루브산 카르복실화효소 생산 및 정제 시스템 *E. coli* SGJS117로부터 얻어진 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 반응 온도 및 pH 안정성을 확인하는 실험을 수행하였다.

[0087] 개발된 재조합 균주 *E. coli* SGJS117에서 생산되어 정제된 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 활성을 측정하기 위하여 보관용 고체 균체 하나를 10 ㎖ 바텀 튜브에 들어있는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 3 ㎖의 LB 배지에서 16시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 ㎖ 플라스크에 들어있는 앰피실린(50 ㎍/㎖)이 첨가된 200 ㎖의 LB 배지(10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L 효모 추출물)에 1%의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm 상태에서 24시간 동안 배양 후, 샘플을 채취하였다. 효소 생산을 위해 유도물질인 IPTG(sigma, USA)를 최종농도 0.5 mM로 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

[0088] 효소활성측정방법은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 측정할 수 있도록 고안된 커플링효소(coupling enzyme)를 사용한 방법으로 1분 동안 소모되는 NADH의 양을 측정해 활성 값을 구할 수 있다. 커플링 효소를 통해 활성측정을 하는 방법은 포스포에놀피루브산 카르복실화효소에 의해 생산된 옥살로아세트산을 사용하는 말레이트 디하이드로나아제(malate dehydrogenase)가 반응 시 소모한 NADH양을 측정하여 간접적으로 포스포에놀피루브산 카르복실화효소의 활성을 계산하는 방법이다. 소니케이터(ULH-700S, Ulsso hi-tech, Korea)를 사용해 초음파분쇄로 세포들을 3분 30초 동안, 2초 on/off 조건으로 파쇄한 후 4500rpm, 4℃ 조건에서 5분 동안 원심분리 하여 수득한 상등액을 가지고 온도 및 pH 안정성 테스트 실험을 수행하였다(실시예 3, 4 및 5의 샘플과 동일).

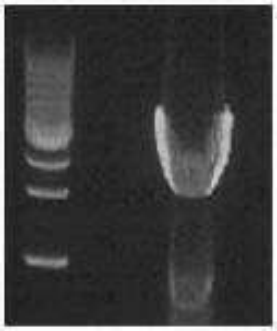
[0089] 온도 안정성 테스트에 사용 된 용액은 활성측정 시 사용된 1 ㎖ 용액과 구성이 동일하다(실시예 5에서 사용한 효소활성측정 방법과 동일). 각각의 용액을 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 60 ℃에서 각각 10분 동안 항온반응한 뒤, 얼음에 10분 동안 정치하였다. 그리고 정제된 효소 25 ㎕를 용액에 첨가하여 활성을 측정하였다. 온도에 대한 안정성 테스트 결과 5-30℃까지 80% 이상의 활성을 유지하며 안정성을 보여줬지만, 30℃를 넘으면 활성이 떨어져 40-60℃에서는 효소의 활성이 확인되지 않았다(도 5).

[0090] pH 안정성 테스트에 사용된 용액은 활성측정 시 사용된 1 ㎖ 용액과 구성이 동일하다(실시예 5에서 사용한 효소활성측정 방법과 동일). 각각의 용액에 2차 증류수 되신 pH 4, 5.5, 7, 8.5, 10, 11.5 및 13의 완충액을 각각 채워 각각 pH에 대한 효소 활성을 측정하였다. pH에 대한 안정성 테스트 결과 pH 8.5-10의 조건에서는, 효소 활성이 100 % 가까이 유지되는 안정성을 보여주었고, pH 11.5 이상이나, pH 6 이하의 조건에서는 효소의 활성이 거의 확인 되지 않았다(도 6).

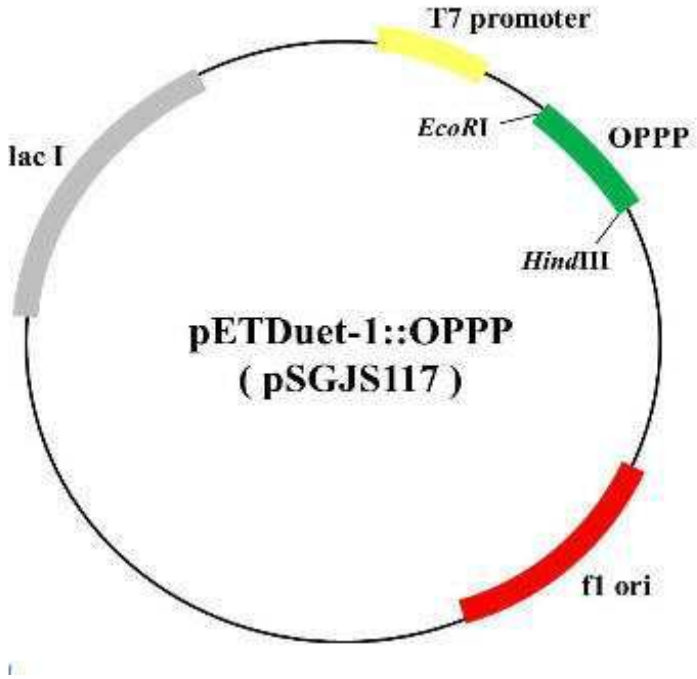
[0091] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

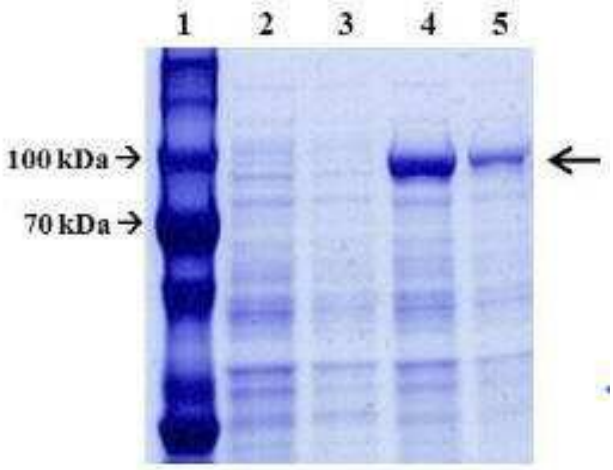
도면1



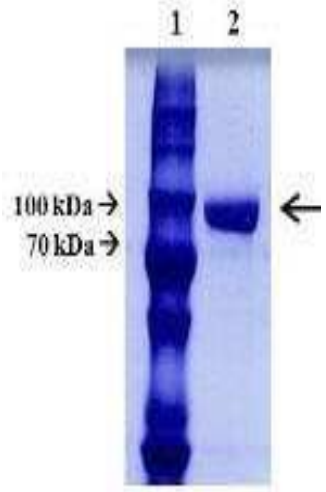
도면2



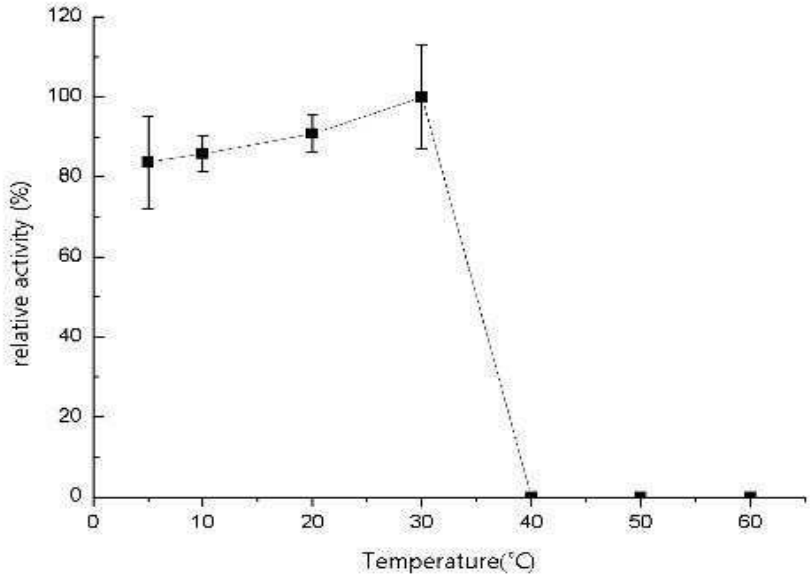
도면3



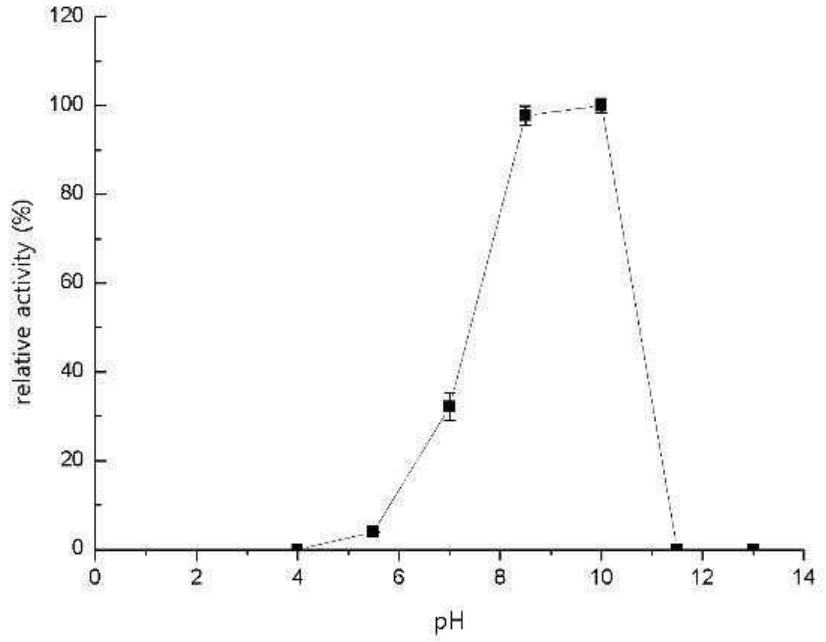
도면4


1
2
100 kDa
70 kDa

도면5


120
100
80
60
40
20
0
relative activity (%)
0
10
20
30
40
50
60
Temperature(°C)

도면6



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Method for Preparing Phosphoenolpyruvate Carboxylase of Photobacterium profundum SS9 using Escherichia coli system

<130> PN130214

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2628

<212> DNA

<213> Codon-optimized Phosphoenolpyruvate Carboxylase

<400> 1

atgaacgaaa aatacagcgc actgaggtct aacgtgtcga tgcttggtca catgctggga 60

aacacaatta aagatgcaca cggggaacca ctgttcgata aggtggaaac catccgcaaa 120

cttagtaaaa gcgcccgtgc aggcaatgat agcgatcgtg caaaactgat agacgagctg 180

cagaatctgc cagatgacca actgctgccg gtagcacggg cattttctca gtttttgaac 240

ctgacaaata ttgctgaaca gtatcatact attagtcgtc attgtgaaga acaaatttgt 300

agccctgata gcattgattc actatttgga aagttgaatg ccaatagcat tagccagctg 360

gatagtatac aggcagttcg tgacctcaat atcgagctgg ttctgactgc acatcccacg 420

gaaattgcac gtcgtacgat gattcataaa ctcgtgcaaa tcaataaatg cctgagcaat 480

ctggaactga gcgagcttag ccattcagaa cgccaacgtg ttgagcagcg tttagaacaa 540

ctgatagcac aggcatggca ctcggacgta attcgtaaac aacgtcctac cccgctagat 600

gaggcaaaat ggggcttcgc tgtagttgaa aactcgcttt ggcatgcagt acctgaattc 660

ctgcggcagt ttgatgagaa gctcatgaga catttaggtg agaagctgcc gttagatgcg 720

agccccgtga aattcacctc ttggatgggc ggagatagag atggtaaccc atttgttaca 780

tcagaggtca cccgagaagt tatgctgttg tcacgttgga aagcagcaga tttgtttctg 840

ggggatattc aggagttggt cagcgaatta tctatggtta aatgcaatga ccaggtgcgt 900

gaactggcag gtgaagaaca cgagccgtat cgtgcgattc tgaaagacct ccgtaccaag 960

ctgacgaaca cacgtgatgt cctggcggca aaaattaata agcaggacgc accgaacctg 1020

gcaactattg atgatgtgga ccagttatgg acgccgctcc atgcatgcta tcaaagtctg 1080

cgtgagtgcg gtatgggcat tattgcagat ggtctgctgc tggacgtttt acgtaggata 1140

aaatgttttg ggatacacct tgttcggcta gacattcggc aggaatctac tcgacatagc 1200

gacgttatct cagaactgac aagatatctg ggtttaggtg attatgaaca gtggaatgaa 1260

caagacaagg tcgcattctt agtgcgtgaa ctggctagca aaaggccgct gctgccactg 1320

gcatggcaac cctcagccga agtgcaagaa gttctagata catgcaaagc cgttgcagaa 1380

caaagccgtg aagctctggg agcgtatgtt attagcatgg cacgtacagc tagtgatgtt 1440

ctggcagttc atctgctgct taaggaggca ggttgccctt ttcggctgga tgtatgtcca 1500

cttttcgaaa ccttagacga tcttaataat ggagcatcgg tgataaaaga actgatgagc 1560

attgattggt atagaggttt tatccagaac catcagatgg ttatgattgg ttatagcgat 1620

agcgcaaaag atgctggagt tatggcagca ggttgggctc agtatcgtgc aatggaagaa 1680

ctggttgaag tttgcgaaga cgcaagtgta gaattaaccc tgtttcacgg ccgcgggggc 1740

agcattggtc gtggtggagc accggcacat gcagcactgc tgtctcagcc accgcgtagc 1800

ttgaagggtg gtctcagagt tacggaacaa ggtgaaatga tacgcttcaa acttggcctg 1860

ccagatgtag cagttaatag cttaagcctt tatgctagtg caaccctgga agcaaatctc 1920

ttaccgcctc ctgcaccaaa aaaagagtgg tgtgacctga tggatgttct aagcgaagtt 1980

agctgtgaat cttaccgtaa cgtagttcgt ggtagtgaag aatttgttcc gtattttcgc 2040

gcagcaacgc ctgaactgga actgggtaaa cttccgttgg gtagtcgtcc ggccaaacga 2100

aatcctaatg gtggtgttga atcgctgcgt gcaattccat ggattttcgc atggtcgcaa 2160

aaccgtttac tgctacccgc atggttgggt gcaggggaag caattcagta ctctattgat 2220

aaaggtcacg ctcagctgct cgaagatatg tgtcgagaat ggccctttt ttctacacgt 2280

ttaggtatgc tggaaatggt ttacactaaa accaacgttg gtattgctga atattacgat 2340

cagcgtctga ccgacaaaag cttatggccc ctgggtcaga agctgcgtga tcagctgcag 2400

caagatatta aagcagtttt aaacgtagaa aataacgcac atcttatgga gcagaatccg 2460

tggggtgcag aggctatccg tctgcgtaat atatatgttg agccgttaaa tatgttgcag 2520

gcagaactgc tataccgtac tcgtcagcaa gacgagccgt ctcctattct tgaagaagca 2580

cttatggtta gcattgcagg tatagccacg ggcatgcgta acactggc 2628

<210> 2

<211> 876

<212> PRT

<213> Photobacterium profundum SS9 Phosphoenolpyruvate Carboxlase

<400> 2

Met Asn Glu Lys Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Asn Val Ser Met Leu Gly
1 5 10 15

His Met Leu Gly Asn Thr Ile Lys Asp Ala His Gly Glu Pro Leu Phe
20 25 30

Asp Lys Val Glu Thr Ile Arg Lys Leu Ser Lys Ser Ala Arg Ala Gly
35 40 45

Asn Asp Ser Asp Arg Ala Lys Leu Ile Asp Glu Leu Gln Asn Leu Pro
50 55 60

Asp Asp Gln Leu Leu Pro Val Ala Arg Ala Phe Ser Gln Phe Leu Asn
65 70 75 80

Leu Thr Asn Ile Ala Glu Gln Tyr His Thr Ile Ser Arg His Cys Glu
85 90 95

Glu Gln Ile Cys Ser Pro Asp Ser Ile Asp Ser Leu Phe Gly Lys Leu
100 105 110

Asn Ala Asn Ser Ile Ser Gln Leu Asp Ser Ile Gln Ala Val Arg Asp
115 120 125

Leu Asn Ile Glu Leu Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg Thr Met Ile His Lys Leu Val Gln Ile Asn Lys Cys Leu Ser Asn
145 150 155 160

Leu Glu Leu Ser Glu Leu Ser His Ser Glu Arg Gln Arg Val Glu Gln
165 170 175
Arg Leu Glu Gln Leu Ile Ala Gln Ala Trp His Ser Asp Val Ile Arg
180 185 190
Lys Gln Arg Pro Thr Pro Leu Asp Glu Ala Lys Trp Gly Phe Ala Val

195 200 205
Val Glu Asn Ser Leu Trp His Ala Val Pro Glu Phe Leu Arg Gln Phe
210 215 220
Asp Glu Lys Leu Met Arg His Leu Gly Glu Lys Leu Pro Leu Asp Ala
225 230 235 240
Ser Pro Val Lys Phe Thr Ser Trp Met Gly Gly Asp Arg Asp Gly Asn
245 250 255
Pro Phe Val Thr Ser Glu Val Thr Arg Glu Val Met Leu Leu Ser Arg
260 265 270

Trp Lys Ala Ala Asp Leu Phe Leu Gly Asp Ile Gln Glu Leu Val Ser
275 280 285
Glu Leu Ser Met Val Lys Cys Asn Asp Gln Val Arg Glu Leu Ala Gly
290 295 300
Glu Glu His Glu Pro Tyr Arg Ala Ile Leu Lys Asp Leu Arg Thr Lys
305 310 315 320
Leu Thr Asn Thr Arg Asp Val Leu Ala Ala Lys Ile Asn Lys Gln Asp
325 330 335
Ala Pro Asn Leu Ala Thr Ile Asp Asp Val Asp Gln Leu Trp Thr Pro

340 345 350
Leu His Ala Cys Tyr Gln Ser Leu Arg Glu Cys Gly Met Gly Ile Ile
355 360 365
Ala Asp Gly Leu Leu Leu Asp Val Leu Arg Arg Ile Lys Cys Phe Gly
370 375 380
Ile His Leu Val Arg Leu Asp Ile Arg Gln Glu Ser Thr Arg His Ser
385 390 395 400
Asp Val Ile Ser Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Gly Leu Gly Asp Tyr Glu

405 410 415

Gln Trp Asn Glu Gln Asp Lys Val Ala Phe Leu Val Arg Glu Leu Ala
420 425 430

Ser Lys Arg Pro Leu Leu Pro Leu Ala Trp Gln Pro Ser Ala Glu Val
435 440 445

Gln Glu Val Leu Asp Thr Cys Lys Ala Val Ala Glu Gln Ser Arg Glu
450 455 460

Ala Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ser Met Ala Arg Thr Ala Ser Asp Val
465 470 475 480

Leu Ala Val His Leu Leu Leu Lys Glu Ala Gly Cys Pro Phe Arg Leu

485 490 495

Asp Val Cys Pro Leu Phe Glu Thr Leu Asp Asp Leu Asn Asn Gly Ala
500 505 510

Ser Val Ile Lys Glu Leu Met Ser Ile Asp Trp Tyr Arg Gly Phe Ile
515 520 525

Gln Asn His Gln Met Val Met Ile Gly Tyr Ser Asp Ser Ala Lys Asp
530 535 540

Ala Gly Val Met Ala Ala Gly Trp Ala Gln Tyr Arg Ala Met Glu Glu
545 550 555 560

Leu Val Glu Val Cys Glu Asp Ala Ser Val Glu Leu Thr Leu Phe His
565 570 575

Gly Arg Gly Gly Ser Ile Gly Arg Gly Gly Ala Pro Ala His Ala Ala
580 585 590

Leu Leu Ser Gln Pro Pro Arg Ser Leu Lys Gly Gly Leu Arg Val Thr
595 600 605

Glu Gln Gly Glu Met Ile Arg Phe Lys Leu Gly Leu Pro Asp Val Ala
610 615 620

Val Asn Ser Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Ala Thr Leu Glu Ala Asn Leu

625 630 635 640

Leu Pro Pro Pro Ala Pro Lys Lys Glu Trp Cys Asp Leu Met Asp Val
645 650 655

Leu Ser Glu Val Ser Cys Glu Ser Tyr Arg Asn Val Val Arg Gly Ser
660 665 670

Glu Glu Phe Val Pro Tyr Phe Arg Ala Ala Thr Pro Glu Leu Glu Leu
675 680 685

Gly Lys Leu Pro Leu Gly Ser Arg Pro Ala Lys Arg Asn Pro Asn Gly
690 695 700

Gly Val Glu Ser Leu Arg Ala Ile Pro Trp Ile Phe Ala Trp Ser Gln
705 710 715 720

Asn Arg Leu Leu Leu Pro Ala Trp Leu Gly Ala Gly Glu Ala Ile Gln
725 730 735

Tyr Ser Ile Asp Lys Gly His Ala Gln Leu Leu Glu Asp Met Cys Arg
740 745 750

Glu Trp Pro Phe Phe Ser Thr Arg Leu Gly Met Leu Glu Met Val Tyr
755 760 765

Thr Lys Thr Asn Val Gly Ile Ala Glu Tyr Tyr Asp Gln Arg Leu Thr
770 775 780

Asp Lys Ser Leu Trp Pro Leu Gly Gln Lys Leu Arg Asp Gln Leu Gln
785 790 795 800

Gln Asp Ile Lys Ala Val Leu Asn Val Glu Asn Asn Ala His Leu Met
805 810 815

Glu Gln Asn Pro Trp Gly Ala Glu Ala Ile Arg Leu Arg Asn Ile Tyr
820 825 830

Val Glu Pro Leu Asn Met Leu Gln Ala Glu Leu Leu Tyr Arg Thr Arg
835 840 845

Gln Gln Asp Glu Pro Ser Pro Ile Leu Glu Glu Ala Leu Met Val Ser
850 855 860

Ile Ala Gly Ile Ala Thr Gly Met Arg Asn Thr Gly
865 870 875