

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
C12N 15/53

(11) 공개번호 10-2004-0052482
(43) 공개일자 2004년06월23일

(21) 출원번호	10-2003-7011306		
(22) 출원일자	2003년08월27일		
번역문 제출일자	2003년08월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2002/006310	(87) 국제공개번호	WO 2002/68607
(86) 국제출원출원일자	2002년02월28일	(87) 국제공개일자	2002년09월06일

(30) 우선권주장 09/797,238 2001년02월28일 미국(US)

(71) 출원인 보드 오브 리젠츠 오브 디 유니버시티 오브 네브라스카
미국 네브라스카 68503 링컨 홀드레지 스트리트 3835

(72) 발명자 위크스도날드피.
미국네브라스카68516링컨웨스트쇼어드라이브6610

왕지아오주오
미국노스캐롤라이나27516채플힐트레몬트써클211

허르만패트리시아엘.
미국네브라스카68462웨이버리록크리크로드9200

(74) 대리인 특허법인 신성

심사청구 : 없음

(54) 유전자 이식 디캄바-분해 유기체를 제조하고 사용하기위한 방법 및 물질

요약

본 발명은 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 효소, 상기 디캄바-분해 효소를 코딩하는 분리된 DNA 분자, 상기 디캄바-분해 효소를 코딩하는 DNA 구조체, 상기 디캄바-분해 효소를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자 이식 숙주 세포, 및 상기 디캄바-분해 효소를 코딩하는 DNA를 포함하는 한 개 이상의 세포를 포함하는 유전자 이식 식물 및 식물의 부분을 제공한다. 또한 본 발명은, 그러한 디캄바-분해 효소를 포함하는 DNA 구조체 내에 사용하기 위한 통과 펩티드를 제공하고, 상기 통과 펩티드는 디캄바-분해 옥시게나제를 식물 세포의 세포 기관에 대해 표적화시킨다. 상기 디캄바-분해 효소의 발현은, 디캄바-저항 식물을 포함한 디캄바-분해 유기체의 생산을 초래한다. 또한 본 발명은, 본 발명에 따른 상기 유전자 이식 디캄바-저항 식물을 함유하는 목초지에서 잡초를 제어하는 방법, 및 본 발명에 따른 유전자 이식 미생물의 유효량 또는 디캄바-분해 효소(들)의 유효량을 디캄바를 함유하는 물질에 적용하는 단계를 포함하는 디캄바 함유 물질의 오염 제거 방법을 제공한다. 마지막으로, 본 발명은 디캄바 저항성을 기초로 하여 형질 전환된 식물 및 식물 세포를 선별하는 방법, 및 디캄바 분해의 결과로서 생성된 3,6-디클로로살리실산의 형광을 기초로 하여 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 및 유기체의 부분을 선별하거나 스크리닝하는 방법을 제공한다.

대표도

도 1

색인어

디캄바, 옥시게나제, 페레독신, 환원효소, 디캄바 내성

명세서

기술분야

본 발명은 제초제 디캄바(dicamba)에 내성이 있도록 제조한 유전자 이식 식물을 포함하는, 디캄바를 분해할 수 있는 유전자 이식 유기체(transgenic organisms)에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 디캄바-분해 효소(dicamba-degrading enzymes) 및 디캄바-분해 효소를 엔코딩하는 DNA 분자와 DNA 구조체(DNA constructs)에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 디캄바에 내성이 있는 유전자 이식 식물을 포함하는 목초지에서 잡초를 제어하는 방법 및 디캄바로 오염된 물 질로부터 디캄바를 제거하는 방법에 관한 것이다(생물학적 치료, bioremediation). 마지막으로, 본 발명은 디캄바에 대한 내성, 또는 디캄바의 분해의 결과로서 생성되는 3,6-디클로로살리실산(3,6-dichlorosalicylic acid)의 형광을 검출하는 것에 기초하여 형질 전환체(transformants)를 선별하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

제초제는 농업 생산에 일반적으로 사용된다. 제초제의 효과는 논밭에서 잡초의 성장을 소멸시키는 능력 및 제초제에 대한 현금 농작물(cash crop)의 내성에 의해 결정된다. 상기 현금 농작물이 제초제에 대해 내성이 없을 경우, 제초제는 현금 농작물의 생산성을 감소시키거나, 또는 잡초와 함께 현금 농작물도 소멸시킨다. 반대로 상기 제초제가 충분히 강력하지 않을 경우, 논밭에는 많은 잡초가 성장하게 되고, 그에 의해 현금 농작물의 생산성이 감소된다. 그러므로, 제초제에 대해 내성을 가지는 경제적으로 중요한 식물들을 생산하는 것이 요구된다. 또한, 물 및 농지의 환경적 질(environmental quality)을 보호하기 위하여, 제초제를 우연히 엷지르거나, 또는 토양 또는 물이 수용할 수 없을 정도로 많이 오염되어 있을 경우에 제초제를 분해하는 기술을 개발하는 것이 요구된다.

제초제 및 기타 배타적인 화합물(xenophobic compounds)을 불활성화시키는 효소를 엔코딩하는 유전자는 종래에 다양한 원핵 생물 및 진핵 생물로부터 분리되었다. 일부 경우에서, 이러한 유전자는 식물에서의 성공적인 발현을 위해 유전 공학적으로 처리되었다. 이러한 접근 방법을 통하여, 제초제 2,4-디클로로페녹시아세트산[Streber 및 Willmitzer (1989) *Bio/Technology* 7 :811-816; 2,4-D], 브롬옥시닐(bromoxynil)[Stalker et al. (1988) *Science* 242 :419-423; 상표명 Buctril], 글리포세이트(glyphosate)[Comai et al. (1985) *Nature* 317 :741-744; 상표명 Round-Up] 및 포스포노트리신(phosphinothricin)[De Block et al.(1987) *EMBO J.* 6 :2513-2518; 상표명 Basta)에 대해 내성을 가지는 식물이 개발되었다.

디캄바(상표명 Banvel)는 옥수수, 사탕수수(sorghum), 작은 곡물, 목초, 건초, 방목장, 사탕수수(sugarcane), 아스파라거스, 잔디, 및 풀 종자 농작물 중에서 일년생 및 다년생의 넓은 잎 잡초와 다양한 연초록색의 잡초를 제어하기 위한 사전-긴급 제초제 및 사후-긴급 제초제로서 사용된다. 문헌 「*Crop Protection Reference*, 1803-1821쪽(Chemical amp; Pharmaceutical Press, Inc., New York, NY, 11th ed., 1995)」을 참조하라. 불행하게도, 디캄바는 많은 상업적 농작물(강낭콩, 대두, 목화, 완두콩, 감자, 해바라기, 토마토, 담배 및 과일 나무 포함), 장식 식물 및 나무, 기타 넓은 잎 식물과 접촉할 경우, 피해를 줄 수도 있다(동일 문헌). 디캄바는 화학적으로 안정하고 종종 환경중에서 분해할 수 없다.

디캄바는 벤조산 제초제 계열에 속한다. 디캄바를 포함하는 벤조산 제초제에 대해 내성을 가지는 식물은, 1-아미노사이클로프로판-1-카르복실산 신타아제(ACC synthase) 안티센스 유전자, ACC 산화 효소 안티센스 유전자, ACC 디아미나제 유전자 또는 이들의 조합을 식물에 도입시킴으로써 생산할 수 있다는 것이 제안되어 있다. 캐나다 특허 출원 제 2,165,036호(1996년 6월 16일 공개)를 참조하라. 그러나, 상기 출원에는 그러한 내성을 증명하는 실험적인 데이터가 제시되어 있지 않다.

디캄바를 물질 대사하는 박테리아가 공지되어 있다. 미국 특허 제 5,445,962호; Krueger 등의 *J. Agric. Food Chem.*, 37, 534-538 (1989); Cork 및 Krueger의 *Adv. Appl. Microbiol.*, 38, 1-66 (1991); Cork 및 Khalil의 *Adv. Appl. Microbiol.*, 40, 289-320 (1995)를 참조하라. 상기 박테리아에서 디캄바의 물질 대사를 담당하는 특정 유전자를 분리하고, 그것을 디캄바-저항성 식물 및 기타 유기체를 생산하는데 사용할 수 있다는 것이 제안되어 있다. 상기와 동일한 문헌들 및 Yang 등의 *Anal. Biochem.*, 219 :37-42 (1994)를 참조하라. 그러나, 본 발명 이전에, 그러한 유전자는 동정되거나 분리되지 못하였다.

발명의 상세한 설명

본 발명은, 모두 하기에서 정의되고 설명되는 바와 같은, 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 O-디메틸라제, 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 옥시게나제, 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 페레독신, 및 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 환원 효소를 제공한다.

또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자, 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자, 및 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자를 제공한다. 또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA 서열, 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA 서열, 또는 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA 서열을 포함하고, 각각의 DNA 코딩 서열은 발현 제어 서열(expression control sequences)에 작용적으로 연결되어 있는 DNA 구조체를 제공한다. 또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA 서열, 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA 서열, 및 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA 서열을 포함하고, 각각의 DNA 코딩 서열은 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되어 있는 DNA 구조체를 제공한다.

또한 본 발명은, 식물 세포 또는 미생물의 세포 기관(엽록체 및/또는 미토콘드리아)에 대하여 디캄바-분해 효소(들)을 표적화시키는 통과 펩티드(transit peptide)를 엔코딩하는 DNA 서열을 또한 포함하는 상기 동정된 DNA 구조체 중 어느 것을 제공한다.

또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA, 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA, 또는 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA - 각각의 DNA는 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되어 있음 - 를 포함하는 유전자 이식 숙주 세포를 제공한다. 또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA와 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA, 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA, 또는 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA와 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA - 각각의 DNA는 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되어 있음 - 를 포함하는 유전자 이식 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 DNA는 식물 세포 또는 미생물의 세포 기관(엽록체 및/또는 미토콘드리아)에 대하여 디캄바-분해 효소(들)을 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 DNA 서열을 또한 포함할 수 있다. 상기 유전자 이식 숙주 세포는 식물 세포 또는 원핵 미생물 또는 진핵 미생물일 수 있다.

또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA, 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA, 또는 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA - 각각의 DNA는 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되어 있음 - 를 포함하는 한 개 이상의 세포를 포함하는 유전자 이식 식물 또는 식물의 부분을 제공한다. 또한 본 발명은, 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA와 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA, 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA, 또는 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA와 디캄바-분해 환원 효소를 코딩하는 DNA - 각각의 DNA는 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되어 있음 - 를 포함하는 한 개 이상의 세포를 포함하는 유전자 이식 식물 또는 식물의 부분을 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 DNA는 식물 세포의 세포 기관에 대하여 디캄바-분해 효소(들)을 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 DNA 서열을 더 포함한다. 상기 유전자 이식 식물 또는 식물의 부분은 디캄바에 대해 바람직하게 내성이 있거나, 또는 디캄바-분해 효소(들)의 발현의 결과로서 디캄바에 대해 증가된 내성을 가진다.

또한 본 발명은, 유전자 이식 디캄바-내성 식물을 포함하는 목초지에서 잡초를 제어하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 잡초의 제어에 효과적인 양의 디캄바를 목초지에 적용하는 단계를 포함한다.

또한 본 발명은, 디캄바를 함유하는 물질의 오염을 제거시키는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 유전자 이식 디캄바-분해 미생물의 유효량을 상기 물질에 적용하는 단계를 포함한다. 또다른 실시예에서, 상기 방법은 디캄바-분해 O-디메틸라제, 또는 디캄바-분해 옥시게나제, 디캄바-분해 페레독신 및 디캄바-분해 환원 효소의 조합의 유효량을 상기 물질에 적용하는 단계를 포함한다.

또한 본 발명은, 선택 마커(selection marker)로서 디캄바에 대한 내성을 사용하여, 형질 전환된 식물 세포 및 형질 전환된 식물을 선별하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 식물 세포 군집에서 식물 세포 중의 적어도 일부를 디캄바에 대해 내성을 갖도록 형질 전환시키는 단계, 및 형질 전환된 식물 세포는 성장하고 형질 전환되지 않은 식물 세포는 성장하지 못하도록 선택한 농도로 디캄바를 함유시킨 배양 배지에서 획득한 식물 세포의 군집을 성장시키는 단계를 포함한다. 또다른 실시예에서, 상기 방법은 디캄바에 대해 내성을 가지도록 형질 전환된 식물을 포함하는 것이 의심되는 식물 군집에, 형질 전환된 식물은 성장하고 형질 전환되지 않은 식물의 성장은 제한되도록 선택한 양으로 디캄바를 적용하는 단계를 포함한다.

마지막으로, 본 발명은 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 및 유기체의 부분을 선별하거나 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 디캄바를 분해할 수 있도록 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 또는 유기체의 부분을 포함하는 것으로 의심되는 숙주 세포의 집단, 완전한 유기체의 집단 또는 유기체의 부분의 집단을 제공하는 단계, 상기 숙주 세포, 완전한 유기체 또는 유기체의 부분을 디캄바와 접촉시키는 단계, 및 3,6-디클로로살리실산에 기인한 형광의

존재 또는 수준을 조사하는 단계를 포함한다. 상기 3,6-디클로로살리실산은 디캄바 분해의 결과로서 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 또는 유기체의 부분에서 생성되지만, 형질 전환되지 않은 숙주 세포, 완전한 유기체 또는 유기체의 부분에서는 생성되지 않는다.

본 발명의 바람직한 실시예의 상세한 설명

이전의 연구들[Cork 및 Kreuger의 *Advan. Appl. Microbiol.* **36** :1-56와, Yang 등의 (1994) *Anal. Biochem.* **219** :37-42]은, 토양 박테리아인 DI-6 계통의 슈도모나스 말토피리아(*Pseudomonas maltophilia*)가 디캄바(3,6-디클로로-2-메톡시 벤조산)를 3,6-디클로로살리실산(3,6-DCSA)으로 변환시키는 한 단계의 반응을 통해 디캄바의 제조 활성을 파괴시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 상기 3,6-DCSA는 제조 활성을 가지지 않으며, 식물에 대해 어떠한 해로운 효과도 나타내지 않는다. 또한, 3,6-DCSA는 토양에 존재하는 보통의 세균총(bacterial flora)에 의하여 쉽게 분해된다.

여기에서 설명하는 실험들은 *P. 말토피리아*(*P. maltophilia*) DI-6 계통에 의한 디캄바의 3,6-DCSA로의 변환에 O-디메틸라제가 관여한다는 Yang 등(동일한 문헌 참조)의 가설을 확인하고, 상기 O-디메틸라제가 환원 효소, 페레독신 및 옥시게나제로 이루어지는 세 가지 구성 성분의 효소 시스템이라는 것을 확립한다. *P. 말토피리아*의 O-디메틸라제 및 그것의 세 가지 구성 성분의 분리, 정제 및 특성을 상세하게 서술한 실시예 1 및 실시예3을 참조하라. 상기 디캄바 O-디메틸라제의 세 가지 구성 성분에 의해 촉매되는 반응의 모식도를 도1에 나타낸다. 도1에 나타낸 바와 같이, NADH로부터의 전자는 환원 효소와 페레독신으로 이루어진 짧은 전자 사슬을 통하여, 디캄바를 산화시켜 3,6-DCSA를 생산하도록 촉매하는 말단 옥시게나제로 왕복 수송된다.

제1실시예에서, 본 발명은 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 효소들을 제공한다. 여기에서 '분리된'은, 효소가 생산된 세포로부터 적어도 제거되었음(즉, 효소는 세포 용해물에 함유되어 있음)을 의미하는 것으로 사용된다. 여기에서 '적어도 부분적으로 정제된'은, 효소가 세포 용해물의 기타 구성 성분들로부터 적어도 부분적으로 분리되었음을 의미하는 것으로 사용된다. 바람직하게는, 효소 제제가 적어도 약 70% 균질하도록 상기 효소를 충분히 정제한다.

특히, 본 발명은 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 O-디메틸라제를 제공한다. 여기에서 '디캄바-분해 O-디메틸라제'는 모두 하기에서 정의되는 바와 같이, 디캄바-분해 옥시게나제, 디캄바-분해 페레독신 및 디캄바-분해 환원 효소의 조합체를 의미하는 것으로 정의된다.

또한, 본 발명은 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 옥시게나제를 제공한다. 여기에서 '디캄바-분해 옥시게나제'는 *P. 말토피리아* DI-6 계통에서 정제된 옥시게나제, 및 *P. 말토피리아* 옥시게나제의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 65% 상동 관계(바람직하게는 동일), 보다 바람직하게는 적어도 약 75%의 상동 관계(바람직하게는 동일), 더욱 바람직하게는 적어도 약 85% 상동 관계(바람직하게는 동일), 특히 바람직하게는 적어도 약 95%의 상동 관계(바람직하게는 동일)를 가지는 아미노산 서열을 가지고, 디캄바의 분해에 관여할 수 있는 옥시게나제를 의미하는 것으로 정의된다. 상기 '디캄바-분해 옥시게나제'에는, *P. 말토피리아* 옥시게나제의 아미노산 서열에 있어서, 한 개 이상의 아미노산을 첨가, 제거 또는 치환시킨 *P. 말토피리아* 옥시게나제의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 옥시게나제가 포함된다. 그러한 옥시게나제에는 *P. 말토피리아* 옥시게나제 서열에 대해 주어진 백분율의 상동성을 가지거나 동일성을 가지는 옥시게나제 뿐만 아니라, 효소 활성이 있는 옥시게나제의 단편도 포함된다. 디캄바-분해 옥시게나제의 활성은 실시예 1 및 3에서 설명하는 바와 같이 판정할 수 있다.

또한, 본 발명은 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 페레독신을 제공한다. 여기에서 '디캄바-분해 페레독신'은 *P. 말토피리아* DI-6 계통에서 정제된 페레독신, 및 *P. 말토피리아* 페레독신의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 65% 상동 관계(바람직하게는 동일), 보다 바람직하게는 적어도 약 75%의 상동 관계(바람직하게는 동일), 더욱 바람직하게는 적어도 약 85%의 상동 관계(바람직하게는 동일), 특히 바람직하게는 적어도 약 95%의 상동 관계(바람직하게는 동일)를 가지는 아미노산 서열을 가지고, 디캄바의 분해에 관여할 수 있는 페레독신을 의미하는 것으로 정의된다. 상기 '디캄바-분해 페레독신'에는 *P. 말토피리아* 페레독신의 아미노산 서열에 있어서, 한 개 이상의 아미노산을 첨가, 제거 또는 치환시킨 *P. 말토피리아* 페레독신의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 페레독신이 포함된다. 그러한 페레독신에는 *P. 말토피리아* 페레독신 서열에 대해 주어진 백분율의 상동성을 가지거나 동일성을 가지는 페레독신 뿐만 아니라, 효소 활성이 있는 페레독신의 단편도 포함된다. 디캄바-분해 페레독신의 활성은 실시예 1 및 3에서 설명하는 바와 같이 판정할 수 있다.

마지막으로, 본 발명은 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 환원 효소를 제공한다. 여기에서 '디캄바-분해 환원 효소'는 *P. 말토피리아* DI-6 계통에서 정제된 환원 효소들, 및 *P. 말토피리아* 환원 효소 중의 하나의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 65% 상동 관계(바람직하게는 동일), 보다 바람직하게는 적어도 약 75%의 상동 관계(바람직하게는 동일), 더욱 바람직하게는 적어도 약 85%의 상동 관계(바람직하게는 동일), 특히 바람직하게는 적어도 약 95%의 상동 관계(바람직하게는 동일)를 가지는 아미노산 서열을 가지고, 디캄바의 분해에 관여할 수 있는 환원 효소를

의미하는 것으로 정의된다. 상기 '디캄바-분해 환원 효소'에는 P. 말토피리아 환원 효소의 아미노산 서열에 있어서, 한 개 이상의 아미노산을 첨가, 제거 또는 치환시킨 P. 말토피리아 환원 효소의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 환원 효소가 포함된다. 그러한 환원 효소에는 P. 말토피리아 환원 효소 서열에 대해 주어진 백분율의 상동성을 가지거나 동일성을 가지는 환원 효소 뿐만 아니라, 효소 활성이 있는 환원 효소의 단편도 포함된다. 디캄바-분해 환원 효소의 활성은 실시예 1 및 3에서 설명하는 바와 같이 판정할 수 있다.

아미노산 서열의 상동성의 정도를 판정하는 방법은 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 유전학 컴퓨팅 그룹(Genetics Computing Group, GCG) 소프트웨어 패키지의 FASTA 프로그램(WI, 매디슨 소재의 위스콘신 대학)은 스위스 단백질 데이터베이스(Swiss Protein Database)와 같은 다양한 단백질 데이터베이스에서 서열을 비교 하는데 사용할 수 있다.

본 발명의 디캄바-분해 효소는 P. 말토피리아 또는 디캄바를 분해하는 기타 유기체들로부터 실시예1 및 3에서 설명한 바와 같이 분리하고 정제해 낼 수 있다. 적합한 기타 유기체에는 디캄바를 분해하는 P. 말토피리아 DI-6 계통 이외의 박테리아가 포함된다. 그러한 박테리아의 여러 계통들이 공지되어 있고, 담수 박테리아(fresh water bacteria) 뿐만 아니라 많은 토양 박테리아가 포함된다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,445,962호; Krueger 등의 *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 534-538(1989); Cork 및 Krueger의 *Adv. Appl. Microbiol.*, **38**, 1-66(1991); Cork 및 Khalil의 *Adv. Appl. Microbiol.*, **40**, 289-320(1995)를 참조하라. 디캄바-분해 박테리아(즉, 유일한 탄소원으로 디캄바를 사용하는 박테리아)에는 슈도모나스(*Pseudomonas*), 스팅고모나스(*Sphingomonas*), 에어로모나스(*Aeromonas*), 크산토모나스(*Xanthomonas*), 알칼리게네스(*Alcaligenes*), 및 모라크셀라(*Moraxella*)가 포함되지만, 이것들로 제한되는 것은 아니고, 많은 속(genera)의 박테리아에서 발견된다. 그외의 디캄바-분해 박테리아 계통도 이들 계통과 마찬가지로 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려진 방법으로 분리할 수 있다.

그러나, 바람직하게는, 본 발명의 상기 디캄바-분해 효소는 하기 설명하는 바와 같이 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조한다. 특히, P. 말토피리아 효소의 아미노산 서열에 있어서 한 개 이상의 아미노산을 첨가, 제거 또는 치환시킨 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 효소는, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드-유도 유전자 변이(oligonucleotide-directed mutagenesis), 링커-스캐닝(linker-scanning) 유전자 변이, 중합 효소 사슬 반응(polymerase chain reaction)을 이용한 유전자 변이 등을 사용하여 제조한다. 문헌 「Ausubel 등(eds.), *Current Protocols In Molecular Biology* (Wiley Interscience 1990)」 및 「McPherson(ed.), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)」을 참조하라.

제2실시예에서, 본 발명은 본 발명의 디캄바-분해 효소를 코딩하는 분리된 DNA 분자를 제공한다. 여기에서 '분리된'은 DNA 분자가 그것의 자연적인 환경으로부터 제거된 것이거나 또는 자연적으로 발생하는 DNA 분자가 아닌 것을 의미하는 것으로 사용된다. 이러한 DNA 분자를 제조하는 방법은 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Maniatis 등의 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY(1982), Sambrook 등의 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY(1989)를 참조하라.

예를 들어, 본 발명의 DNA 분자는 분리된 cDNA 또는 게놈 클론(genomic clones)일 수 있고, 또한 RNA 분자를 포함할 수도 있다. 상기 P. 말토피리아 DI-6 계통의 디캄바-분해 효소를 코딩하는 클론의 동정 및 분리를 실시예2 및 실시예4~5에서 설명한다. 상기 디캄바-분해 효소를 코딩하는 또다른 클론을 유사한 방법으로 획득할 수 있다. 분리된 클론, 또는 그 일부는 그러한 클론이 최초로 분리된 유기체와는 다른 유기체에서 또다른 클론을 동정하고 분리하기 위한 프로브로 사용될 수 있다. 그러한 적합한 유기체로는 디캄바를 분해하는 박테리아가 포함된다. 상기에 언급한 바와 같이, P. 말토피리아 DI-6 계통에 더하여, 디캄바를 분해하는 다양한 계통의 박테리아가 알려져 있다. 미국 특허 제 5,445,962호; Krueger 등의 *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 534-538(1989); Cork 및 Krueger의 *Adv. Appl. Microbiol.*, **38**, 1-66(1991); Cork 및 Khalil의 *Adv. Appl. Microbiol.*, **40**, 289-320(1995)를 참조하라.

또한, 본 발명의 DNA 분자는 분리된 클론의 서열을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 그러한 기술은 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, DNA 서열은 자동화 DNA 합성기에서 포스포아미디트 화학법(phosphoramidite chemistry)으로 합성될 수 있다. 화학적 합성은 많은 장점을 가진다. 특히, 화학적 합성은 DNA 서열을 발현될 숙주에 의해 선호되는 코돈으로 하여 발현을 최적화시키기 위해 사용할 수 있으므로 바람직하다. 발현을 향상시키기 위해 모든 코돈을 변경시킬 필요는 없지만, 적어도 숙주에서 거의 사용되지 않는 코돈은 숙주-선호 코돈으로 변화시키는 것이 바람직하다. 상기 숙주-선호 코돈의 약 50%, 가장 바람직하게는 적어도 약 80% 이상을 변경시키는 것에 의해 높은 수준의 발현을 획득할 수 있다. 많은 숙주 세포들이 선호하는 코돈이 공지되어 있다. 예를 들어, *Maximizing Gene Expression*, 225-85쪽(Reznikoff amp; Gold, eds., 1986), PCT WO 97/31115, PCT WO 97/11086, EP 646643, EP 553494 및 미국 특허 제 5,689,052호, 제 5,567,862호, 제 5,567,600호, 제 5,552,299호 및 제 5,017,692호를 참조하라. 다른 숙주 세포들이 선호하는 코돈도 본 발명에 속하는 분야에 알려진 방법들로 추론할 수 있다. 또한, 화학적 합성을 이용하여, DNA 분자의 서열 또는 그것이 엔코딩하는 단백질을, 예를 들면 발현이 최적화되도록 하거나(예를 들면 전사 또는 번역을 방해하는 mRNA 2차 구조를 제거시킴), 편리한 위치에 독특한 제한 효소의 절단 부위를 첨가시키거나, 프로테아제 절단 부위를 제거하도록 하는 등의 변경을 쉽게 할 수 있다.

제3실시예에서, 본 발명은 발현 제어 서열에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 효소를 코딩하는 DNA를 포함하는 DNA 구조체, 또는 각각 디캄바-분해 효소를 코딩하고 각각 발현 제어 서열에 작용적으로 연결된 복수의 DNA 코딩 서열을 제공한다. 여기에서 'DNA 구조체'는 DNA를 숙주 세포에 도입하는데 유용한, 구축된(자연적으로 발생된 것이 아닌) DNA 분자를 정의하며, 상기 용어에는 키메라 유전자(chimeric genes), 발현 카세트(expression cassettes) 및 벡터가 포함된다.

여기에서 사용된 바와 같은 '작용적으로 연결된'은 엔코딩된 단백질이 발현 되는 방식으로(서열들의 순서, 서열들의 방향성, 및 다양한 서열들의 상대적 공간을 포함) DNA 서열들이 연결된 것을 일컫는다. 코딩 서열들에 발현 제어 서열들을 작용적으로 연결하는 방법은 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, Maniatis 등의 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1982) 및 Sambrook 등의 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989)를 참조하라.

'발현 제어 서열(expression control sequence)'은 원핵 생물 또는 진핵 생물에서 전사 또는 번역의 제어에 어떤 방식으로든 관여하는 DNA 서열이다. 적합한 발현 제어 서열 및 그것을 만들고 사용하는 방법은 본 발명이 속하는 분야에서 잘 알려져 있다.

상기 발현 제어 서열은 프로모터를 포함하여야 한다. 상기 프로모터는 선택된 숙주 세포 또는 유기체에서 전사 활성을 나타내는 임의의 DNA 서열일 수 있다. 상기 프로모터는 유도된 것이거나 제작된 것일 수 있다. 그것은 자연 발생적인 것이거나, 다양한 자연 발생적인 프로모터들의 부분으로 구성된 것이거나, 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성된 것일 수 있다. 프로모터의 설계에 대한 지침은 Harley 및 Reynolds의 *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2343-61 (1987)와 같은 프로모터 구조에 대한 연구에 의하여 제공된다. 또한, 전사 시작 지점에 대한 프로모터의 위치는 최적화될 수 있다. 예를 들어, Roberts 등의 *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 760-4(1979)를 참조하라. 원핵 생물 및 진핵 생물에 사용하기에 적합한 많은 프로모터들이 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있다.

예를 들어, 식물에 사용하기 위해 적합하게 제조된 프로모터에는, 양배추꽃 모자이크 바이러스 유래의 35S 프로모터(Odell et al. *Nature* **313**:810-812(1985)), 땅콩 백화 줄무늬 카울리모바이러스(peanut chlorotic streak caulimovirus) 유래의 복제된 인헨서 도메인을 가지는 완전한 길이의 전사 프로모터(Maiti and Shepherd, BBRC 244:440-444(1998)), 클로렐라 바이러스 메틸트랜스퍼라제 유전자의 프로모터(미국 특허 제 5,563,328호), 및 현삼(figwort) 모자이크 바이러스 유래의 완전한 길이의 전사 프로모터(미국 특허 제 5,378,619호) 등의 식물 바이러스 유래의 프로모터; 쌀 액틴(McElroy et al. *Plant Cell* **2**:163-171(1990)), 유비퀴틴(Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* **12**:619-632(1989) 및 Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* **18**:675-689(1992)), pEMU(Last et al., *Theor. Appl. Genet.* **81**:581-588(1991)), MAS(Velten et al. *EMBO J.* **3**:2723-2730(1984)), 옥수수 H3 히스톤(Lepetit et al., *Mol. Gen. Genet.* **231**:276-285(1992)) 및 Atanassova et al., *Plant Journal* **2** (3):291-300(1992)), *Brassica napus* ALS3(PCT 출원 WO 97/41228)등의 유전자 유래의 프로모터; 및 다양한 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 유전자들의 프로모터(미국 특허 제 4,771,002호, 제 5,102,796호, 제 5,182,200호, 제 5,428,147호)가 포함된다.

식물에 사용하는데 적합한 유도성 프로모터(inducible promoters)에는, 구리에 반응하는 ACE1 시스템 유래의 프로모터(Mett et al., *PNAS* **90**:4567-4571(1993)); 벤젠술폰아미드 제조제 완화제에 반응하는 옥수수 In2 유전자의 프로모터(Hershey et al., *Mol. Gen. Genetics* **227**:229-237(1991) 및 Gatz et al., *Mol. Gen. Genetics* **243**:32-38 (1994)); 및 Tn10 유래의 Tet 억제자의 프로모터 (Gatz et al., *Mol. Gen. Genet.* **227**:229-237 (1991))가 포함된다. 식물에 사용하기 위한 특히 바람직한 유도성 프로모터는, 식물이 정상적으로는 반응하지 않는 유도제에 반응하도록 하는 것이다. 이러한 형태의 유도성 프로모터의 일례는 스테로이드 호르몬 유전자 유래의 유도성 프로모터이며, 이것의 전사 활성은 글루코코르티코스테로이드 호르몬(glucocorticosteroid hormone)에 의하여 유도된다(Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10421 (1991)). 식물에 사용하기 위한 또다른 유도성 프로모터가 EP 332104, PCT WO 93/21334 및 PCT WO 97/06269에 서술되어 있다.

박테리아에 사용하기에 적합한 프로모터에는, 바실러스 스테아로테르모필러스(*Bacillus stearothermophilus*) 말토제닉 아밀라제 유전자, 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 알파-아밀라제 유전자, 바실러스 아밀롤리퀘파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) BAN 아밀라제 유전자, 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 알칼라인 프로테아제 유전자 및 바실러스 푸밀러스(*Bacillus pumilus*) 자일로시다제(xylosidase) 유전자의 프로모터, 파지 람다 P_R 및 P_L 프로모터, 및 대장균(*Escherichia coli*) lac, trp 및 tac 프로모터가 포함된다.

효모 숙주 세포에 사용하기에 적합한 프로모터에는, 효모 해당 유전자(yeast glycolytic genes) 유래의 프로모터, 알콜 디히드로게나제 유전자(alcohol dehydrogenase genes) 유래의 프로모터, *TPI1* 프로모터, 및 *ADH2-4c* 프로모터가 포함된다. PCT WO 96/23898을 참조하라.

실모양의 진균류에 사용하기에 적합한 프로모터에는, *ADH3* 프로모터, *tpiA* 프로모터, 및 아스페르길러스 오리자(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라제, 리조뮤코 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 아스팔틱 프로테나제(aspartic prot

einase), 아스페르길러스 니거(*Aspergillus niger*) 중성 알파-아밀라제, A. 니거(*A. niger*) 산 안정 알파-아밀라제(acid stable alpha-amylase), A. 니거(*A. niger*) 또는 아스페르길러스 아와모리(*Aspergillus awamori*) 글루코아밀라제, R. 미에헤이(*R. miehei*) 리파제, A. 오리재(*A. oryzae*) 염기성 프로테아제, A. 오리재(*A. oryzae*) 트리오스 포스페이트 이소메라제 및 아스페르길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 아세트아미다제를 엔코딩하는 유전자의 프로모터가 포함된다. PCT WO 96/23898을 참조하라.

포유 동물의 세포에 사용하기에 적합한 프로모터에는, SV40 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 유전자 프로모터, 쥐과 동물의 유선암 바이러스 프로모터, 로우스 육종(Rous sarcoma) 바이러스 프로모터, 및 아데노바이러스 2 주요 후기 프로모터(adenovirus 2 major late promotor)가 포함된다. PCT WO 96/23898 및 PCT WO 97/42320을 참조하라.

곤충 세포에 사용하기에 적합한 프로모터에는, 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터, P10 프로모터, 오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 폴리헤드로시스(polyhedrosis) 바이러스 염기성 단백질 프로모터, 바쿨로바이러스 전 초기 유전자 1 프로모터(baculovirus immediate early gene 1 promotor) 및 바쿨로바이러스 39K 지연된-초기 유전자 프로모터(delayed-early gene promotor)가 포함된다. PCT WO 96/23898을 참조하라.

마지막으로, 다른 프로모터의 일부, 및 부분으로 또는 전체적으로 합성된 프로모터로 이루어진 프로모터를 사용할 수 있다. 예를 들어, 식물에 사용하기 위한 프로모터를 설명하는 Ni et al., *Plant J.*, **7**:661-676(1995) 및 PCT WO 95/14098을 참조하라.

프로모터는 한 개 이상의 인핸서 부분을 포함할 수 있고, 또는 한 개 이상의 인핸서 부분을 포함하도록 변경될 수 있다. 바람직하게는, 상기 프로모터는 복수의 인핸서 부분을 포함할 것이다. 인핸서 부분을 함유하는 프로모터는 인핸서 부분을 함유하지 않는 프로모터에 비해 높은 수준의 전사를 제공한다. 식물에 사용하기에 적합한 인핸서 부분에는, 양배추꽃 모자이크 바이러스 유래의 35S 인핸서 부분(미국 특허 제 5,106,739호 및 제 5,164,316호) 및 현삼 모자이크 바이러스 유래의 인핸서 부분(Maiti et al., *Transgenic Res.*, **6**, 143-156(1997))이 포함된다. 다른 세포에 사용하기에 적합한 또다른 인핸서가 공지되어 있다. PCT WO 96/23898 및 *Enhancers And Eukaryotic Expression* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1983)을 참조하라.

효과적인 발현을 위하여, 코딩 서열들은 또한 바람직하게, 3' 번역되지 않는 서열(3' untranslated sequence)에 작용적으로 연결된다. 상기 3' 번역되지 않는 서열은 전사 및/또는 번역 말단 서열을 포함한다. 상기 3' 번역되지 않는 영역은 박테리아, 식물 또는 다른 진핵 생물 세포 유래의 유전자의 측면 영역(flanking regions)에서 획득할 수 있다. 원핵 생물에 사용하기 위하여, 상기 3' 번역되지 않는 영역은 전사 말단 서열을 포함할 것이다. 식물 및 다른 진핵 생물에 사용하기 위하여, 상기 3' 번역되지 않는 영역은 전사 말단 서열 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 것이다. 식물에 사용하기에 적합한 3' 번역되지 않는 서열은 양배추꽃 모자이크 바이러스 35S 유전자, 파세올린(phaseolin) 종자 저장 단백질 유전자, 완두콩 리볼로스 바이오포스페이트 카르복실라제 작은 서브유닛 E9 유전자, 대두 7S 저장 단백질 유전자, 옥토피(octopine) 신타제 유전자, 및 노팔린(nopaline) 신타제 유전자의 전사 말단 서열 및 폴리아데닐화 서열을 포함한다.

식물 및 다른 진핵 생물에서, 5' 번역되지 않는 서열도 또한 채택된다. 상기 5' 번역되지 않는 서열은 5' CAP 부위로부터 번역 시작 코돈(translation initiation codon)까지 연장된 mRNA의 부분이다. 상기 mRNA의 이 영역은 진핵 생물에서 번역의 시작을 위해 필요하고, 유전자 발현을 조절하는 역할을 한다. 식물에 사용하기에 적합한 상기 5' 번역되지 않는 영역은, 알팔파(alfalfa) 모자이크 바이러스, 오이 모자이크 바이러스 코트 단백질 유전자, 및 담배 모자이크 바이러스의 5' 번역되지 않는 서열을 포함한다.

상기에서 언급한 바와 같이, DNA 구조체는 벡터일 수 있다. 상기 벡터는, 벡터가 숙주 세포에서 복제되도록 하는 한 개 이상의 복제 시스템들을 포함할 수 있다. 자체-복제 벡터에는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스 벡터가 포함된다. 또한, 상기 벡터는 본 발명의 디카바-분해 효소를 코딩하는 서열을 가진 숙주 세포의 염색체 내로 융합할 수 있는 융합 벡터(integrating vector)일 수 있다. 상기 벡터는 또한 DNA 서열의 삽입을 위한 독특한 제한 효소의 절단 부위를 가지는 것이 바람직하다. 상기 벡터가 독특한 제한 효소의 절단 부위를 가지지 않는 경우, 부가적인 조작에 보다 적합하도록 벡터에 제한 효소의 절단 부위를 도입하거나 제거하는 변형을 행할 수 있다.

본 발명의 DNA 구조체는 하기 설명하는 바와 같이 다양한 숙주 세포들을 형질 전환시키는데 사용할 수 있다. 형질 전환된 숙주 세포를 선별하기 위해서는 유전학적 마커('선택 마커')가 사용되어야 한다. 선택 마커는 일반적으로 네거티브 선택(즉, 상기 선택 마커를 함유하지 않는 세포의 성장을 억제시키는 것)에 의해 형질 전환된 세포의 회수를 가능하게 하거나, 선택 마커에 의해 엔코딩된 산물에 대한 스크리닝을 통해 형질 전환된 세포의 회수를 가능하게 한다.

식물의 형질 전환에 가장 일반적으로 사용되는 선택 가능 마커(selectable marker) 유전자는 식물 조절 신호의 제어 하에서 카나마이신에 대한 저항성을 수반하는, Tn5로부터 분리한 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II(*nptII*) 유전자

이다(Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:4803 (1983)). 일반적으로 사용되는 또다른 선택 가능 마커 유전자는 항생 물질 하이그로마이신(hygromycin)에 대한 저항성을 수반하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자이다(Vanden Elzen et al., *Plant Mol. Biol.*, **5**:299 (1985)).

항생 물질에 대해 저항성을 수반하는 박테리아 유래의 또다른 선택 가능 마커 유전자에는 겐타마이신 아세틸 트랜스퍼라제(gentamycin acetyl transferase), 스트렙토마이신 포스포트랜스퍼라제, 아미노글리코시드-3'-아데닐 트랜스퍼라제, 및 블레오마이신(bleomycin) 저항 결정 인자가 포함된다(Hayford et al., *Plant Physiol.* **86**:1216(1988), Jones et al., *Mol. Gen. Genet.* **210**:86(1987), Svab et al., *Plant Mol. Biol.* **14**:197(1990), Hille et al., *Plant Mol. Biol.* **7**:171 (1986)). 또다른 선택 가능 마커 유전자는 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트(glufosinate) 또는 브롬옥시닐과 같은 제초제에 대한 저항성을 수반한다(Comai et al., *Nature* **317**:741-744 (1985), Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* **2**:603-618(1990) 및 Stalker et al., *Science* **242**:419-423(1988)).

식물의 형질 전환에 사용되는 또다른 선택 가능 마커 유전자는 박테리아 유래의 것이 아닌, 예를 들면, 쥐 디하이드로 폴레이트(dihydrofolate) 환원 효소, 식물 5-에놀피루브실키메이트-3-포스페이트(5-*enol* pyruvylshikimate-3-phosphate) 신타제 및 식물 아세톨락테이트(acetolactate) 신타제가 포함된다(Eichholtz et al., *Somatic Cell Mol. Genet.* **13**:67(1987), Shah et al., *Science* **233**:478(1986), Charest et al., *Plant Cell Rep.* **8**:643(1990)).

형질 전환된 것으로 추정되는 세포들을 스크리닝하기 위하여 일반적으로 사용되는 유전자에는 β -글루쿠로니다제(β -glucuronidase; GUS), β -갈락토시다제, 루시페라제(luciferase), 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(Jefferson, R. A., *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**:387(1987), Teeri et al., *EMBO J.* **8**:343(1989), Koncz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:131(1987), De Block et al., *EMBO J.* **3**:1681(1984)), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP)(Chalfie et al., *Science* **263**:802(1994), Haseloff et al., *TIG* **11**:328-329(1995) 및 PCT 출원 WO 97/41228)이 포함된다. 상대적으로 드문 형질 전환을 동정하기 위한 또다른 접근 방법에서는 옥수수 안토시아닌 착색 경로(*Zea mays* anthocyanin pigmentation pathway)에서의 우열한 구성 성분인 조절자를 엔코딩하는 유전자를 사용하여 왔다(Ludwig et al., *Science* **247**:449(1990)).

원핵 생물 및 식물 이외의 진핵 생물에 사용하는데 적합한 선택 마커 또한 잘 알려져 있다. 예를 들어, PCT WO 96/23898 및 PCT WO 97/42320을 참조하라. 예를 들어, 항생 물질(엠포실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 네오마이신 또는 하이그로마이신)에 대한 저항성을 선택 마커로 사용할 수 있다.

본 발명의 또다른 태양에 따라, 디캄바에 대한 내성을 식물 및 식물 세포에 대한 선택 마커로 사용할 수 있다. '내성'은, 형질 전환되지 않은 세포를 성장하지 못하게 하는 정도의 디캄바를 함유하는 배양 배지에서 형질 전환된 식물 세포는 성장(생존 및 식물로의 재생)할 수 있는 것을 의미한다. '내성'은 또한, 형질 전환되지 않은 식물의 성장을 억제하는 양의 디캄바를 적용한 후에도 형질 전환된 식물은 성장할 수 있는 것을 의미한다.

형질 전환된 식물 세포를 선별하는 방법은 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있다. 요약하면, 식물 세포들의 군집(예를 들어, 외식편(explant) 또는 배의(embryonic) 현탁 배양물)에서 적어도 일부 식물 세포를 디캄바 분해를 위하여 마련된 DNA 구조체 또는 DNA 구조체의 조합으로 형질 전환시킨다. 결과적인 식물 세포의 군집을, 형질 전환된 식물 세포는 성장하고 반면에 형질 전환되지 않은 식물 세포는 성장하지 못하도록 선택된 농도로 디캄바를 함유하는 배양 배지에 놓아 둔다. 디캄바의 적합한 농도는 본 발명이 속하는 분야에 알려진 바와 같이 실험적으로 결정할 수 있다.

또한, 형질 전환된 식물들을 선별하는 방법이 본 발명이 속하는 분야에 알려져 있다. 요약하면, 디캄바 분해를 위하여 마련된 DNA 구조체 또는 DNA 구조체의 조합을 포함하는 것으로 짐작되는 식물 군집에 디캄바를 적용한다. 디캄바의 양은, 형질 전환된 식물은 성장시키고 형질 전환되지 않은 식물들의 성장은 억제시키도록 선택한다. 억제의 정도는 형질 전환된 식물 및 형질 전환되지 않은 식물을 쉽게 구별할 수 있도록 충분하여야 한다(즉, 억제는 통계학적으로 현저하여야 한다). 그러한 양은 본 발명이 속하는 분야에 알려진 바와 같이 실험적으로 결정할 수 있다.

또한, 디캄바 분해의 결과로서의 3,6-DCSA의 생성을 선별 및 스크리닝을 위하여 사용할 수 있다. 상기 3,6-DCSA의 생성은 이 화합물의 형광을 관찰함으로써 쉽게 확인할 수 있으며, 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체, 및 유기체의 부분(예를 들어, 미생물, 식물, 식물의 부분, 및 식물 세포)의 선별 및 스크리닝을 가능하게 한다. 이러한 측면에서, 본 발명은 녹색 형광 단백질(GFP)에서와 같은 방식으로 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 및 유기체의 부분의 선별 및 스크리닝을 가능하게 한다. 여기에서 참조로서 첨부한 모든 것, 미국 특허 제 5,162,227호, 제 5,491,084호 및 PCT 출원 WO 96/27675, WO 97/11094, WO 97/41228 및 WO 97/42320을 참조하라. 특히, 종래의 분광 광도 측정 방법(spectrophotometric methods)을 사용하여 3,6-DCSA를 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 및 유기체의 부분으로부터 검출할 수 있다. 예를 들어, 형광 여기(fluorescence excitation) 및 검출을 위해 적합한 필터 조합들로 현미경을 알맞게 맞출 수 있고, 작업대에서의 작업 또는 현장 작업에는 손전등을 사용할 수 있다(실시예 1 참조). 또한, 형광으로 활성화된 세포의 분급도 채택할 수 있다. 상기 3,6-DCSA는 312-313nm의 파장에서 여기되고, 424nm의 최대 발광 파장을 가진다.

유기체의 '부분'에는 기관, 조직, 또는 임의의 다른 부분이 포함된다. '식물 부분'에는 종자, 꽃가루, 배(embryo), 꽃, 과일, 가지, 잎, 뿌리, 줄기, 외식편 등이 포함된다.

디캄바 내성 또는 디캄바 분해에 기초한 선별은 또다른 선택 마커의 사용이 필요하지 않는 경우에, 디캄바-내성 식물 또는 디캄바-분해 미생물의 생산에 사용될 수 있다. 또한, 디캄바 내성 또는 디캄바 분해에 기초한 선별은 관심의 대상인 다른 유전자를 발현시키는 유전자 이식 세포 또는 유기체의 생산에 사용될 수도 있다. 그러한 많은 유전자들이 알려져 있으며, 상업적으로 가치있는 단백질을 코딩하는 유전자 및 식물에 대한 개선된 농경법의 특징을 수반하는 유전자가 포함된다(예를 들어, 여기에서 참조로서 첨부한 완전한 설명인 PCT WO 97/41228을 참조하라.).

본 발명의 DNA 구조체를 원핵 생물 및 진핵 생물을 포함하는 다양한 숙주 세포를 형질 전환시키는데 사용할 수 있다. 디캄바-분해 효소(들)를 코딩하는 DNA 서열과, 별개의 선택 마커를 사용하는 경우의 선택 마커는 동일하거나 또는 상이한 DNA 구조체 상에 있을 수 있다. 바람직하게는, 모든 코딩 서열이 함께 발현되도록 그들은 전사 단위으로서 단일 DNA 구조체 상에 있는 것이 바람직하다. 또한, 관심의 대상인 유전자(들)과, 디캄바-내성 또는 디캄바-분해를 선택 마커로서 사용한 경우의 디캄바-분해 효소(들)를 코딩하는 DNA 서열(들)도 동일하거나 또는 상이한 DNA 구조체 상에 있을 수 있다. 그러한 구조체들은 상기에서 서술한 바와 동일한 방식으로 제조된다.

적합한 숙주 세포에는 원핵 생물 및 진핵 생물인 미생물(예를 들어, 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 및 대장균 포함하는 박테리아, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 포함하는 효모, 아스페르길러스 sp.(*Aspergillus sp.*)를 포함하는 기타 진균류, 식물 세포, 곤충 세포 및 포유 동물의 세포)이 포함된다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 정상적으로는 디캄바를 분해하지 않는 것이다. 그러나, 본 발명은 또한, 정상적으로 디캄바를 분해하는 숙주 세포의 디캄바 분해 정도를 증가시키는데 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명의 '유전자 이식' 세포 및 유기체에는 정상적으로는 디캄바를 분해하지 않는 세포 및 유기체가 포함되지만, 이들은 상기 제초제를 분해할 수 있도록 본 발명에 따라 형질 전환된다. 또한, 본 발명의 '유전자 이식' 세포 및 유기체에는 정상적으로 디캄바를 분해하는 세포 및 유기체도 포함되지만, 이들은 상기 제초제를 보다 더 분해할 수 있도록, 또는 보다 효과적으로 상기 제초제를 분해할 수 있도록 본 발명에 따라 형질 전환된다.

원핵 생물 및 진핵 생물 숙주 세포를 형질 전환시키는 방법은 본 발명이 속 하는 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1982), Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); PCT WO 96/23898 및 PCT WO 97/42320을 참조하라.

예를 들어, 식물의 형질 전환을 위한 많은 방법들이 개발되었고, 그 방법에는 생물학적 및 물리학적 형질 전환 프로토콜이 포함된다. 예를 들어, Miki et al., 'Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants' in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. 및 Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) pp. 67-88을 참조하라. 또한, 식물 세포 또는 조직의 형질 전환 및 식물의 재생을 위한 벡터 및 시험관 내(*in vitro*) 배양 방법들이 유용하다. 예를 들어, Gruber et al., 'Vectors for Plant Transformation' in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. 및 Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) p. 89-119를 참조하라. 실시예6은 본 발명에 따라 식물을 형질 전환시키는 구체적인 실시예를 제공한다.

발현 벡터를 식물 내에 도입하기 위한 가장 널리 활용되는 방법은 아그로박테리움의 자연적 형질 전환 시스템에 기초한 것이다. 예를 들어, Horsch et al., *Science* **227**:1229(1985)를 참조하라. A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 및 A. 리조게네스(*A. rhizogenes*)는 유전학적으로 식물 세포를 형질 전환시키는 식물 병원성 토양 박테리아이다. A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 및 A. 리조게네스(*A. rhizogenes*) 각각의 Ti 및 Ri 플라스미드는 식물의 유전학적 형질 전환에 관여하는 유전자를 운반한다. 예를 들어, Kado, C.I., *Crit. Rev. Plant. Sci.* **10**:1(1991)을 참조하라. 아그로박테리움 벡터 시스템 및 아그로박테리움-매개 유전자 전달 방법에 관한 서술은, Gruber et al., supra, Miki et al., supra, Moloney et al., *Plant Cell Reports* **8**:238(1989), 및 미국 특허 제 4,940,838 및 제 5,464,763호를 포함하는 다양한 문헌에 의해 제공된다.

식물의 형질 전환의 일반적인 적용 방법은 미세 입자총-매개(microprojectile-mediated) 형질 전환이며, 이때 DNA는 미세 입자총의 표면에 있는 상태로 운반된다. 상기 발현 벡터는 미세 입자총이 식물 세포벽 및 막을 통과하기에 충분한 속도로 미세 입자총을 가속시키는 바이오리ست릭 장치(biolistic device)에 의해 식물 조직 내로 도입된다(Sanford et al. *Part. Sci. Technol.* **5**:27(1987), Sanford, J.C., *Trends Biotech.* **6**:299(1988), Sanford, J.C., *Physiol. Plant* **79**:206(1990), Klein et al., *Biotechnology* **10**:268(1992)).

식물에 DNA를 물리적으로 운반하는 또다른 방법은 표적 세포를 초음파 처리하는 것이다(Zhang et al., *Bio/Technology* **9**:996(1991)). 또한, 식물로 발현 벡터를 도입하기 위해 리포솜 또는 스퍼로플라스트(spheroplast) 접합법을 사용하여 왔다(Deshayes et al., *EMBO J.*, **4**:2731(1985), Christou et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **84**:3962(19

87)). 또한, CaCl_2 침전법, 폴리비닐 알콜 또는 폴리-L-오르니틴을 사용하여 원형질체에 DNA를 직접 삽입하는 방법도 보고되었다(Hain et al., *Mol. Gen. Genet.* **199** :161(1985) 및 Draper et al., *Plant Cell Physiol.* **23** :451(1982)). 또한, 원형질체, 전체 세포 및 조직의 전기 천공 방법(electroporation)도 서술되어있다(Dohn et al., In Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p. 53 (1990); D'Halluin et al., *Plant Cell* **4** :1495-1505(1992) 및 Spencer et al., *Plant Mol. Biol.* **24** :51-61(1994)).

본 발명에 따라, 임의의 형태의 유전자 이식 디캄바-내성 식물을 제조할 수 있다. 특히, 디캄바에 의해 손상되는 것으로 널리 알려진 강낭콩, 대두, 목화, 완두콩, 감자, 해바라기, 토마토, 담배, 과일 나무, 장식 식물 및 나무를 포함하는 넓은 잎 식물을 형질 전환시켜 상기 식물이 상기 제초제에 대해 내성을 가지도록 할 수 있다. 일반적으로 디캄바에 대해 내성이 있는 것으로 간주되는 옥수수, 사탕수수(sorghum), 작은 곡물, 사탕수수(sugarcane), 아스파라거스 및 풀 등의 기타 식물은 상기 제초제에 대한 내성이 증가되도록 형질 전환시킬 수 있다. 구체적으로, 임의의 쌍떡잎 식물 또는 외떡잎 식물을 본 발명의 DNA 구조체로 형질 전환시킬 수 있다. '내성'은 형질 전환되지 않은 식물의 성장을 억제하는 양의 디캄바의 존재 하에서도 형질 전환된 식물은 성장할 수 있음을 의미한다.

본 발명의 디캄바-분해 옥시게나제는 유전자 이식 숙주 세포 및 유기체에서 발견되는 내생(endogenous) 환원 효소 및 페레독신과 함께 디캄바의 분해에 작용할 수 있는 것으로 예상된다. 식물 엽록체는 특히 환원 효소 및 페레독신이 풍부하다. 따라서, 유전자 이식 디캄바-내성 식물의 제조를 위한 바람직한 실시예는 엽록체 내로 상기 디캄바-분해 옥시게나제를 직접 향하게 하는 펩티드(예를 들면, 통과 펩티드)를 코딩하는 서열('엽록체 표적 서열')을 사용하는 것이다. 엽록체 표적 서열을 코딩하는 DNA는 상기 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 서열의 상류(5')에 놓는 것이 바람직하지만, 또한 상기 코딩 서열의 하류(3')에 놓거나 또는 상기 코딩 서열의 상류 및 하류의 둘 다에 놓을 수도 있다. 임의의 적합한 엽록체 표적 서열을 사용할 수 있다. 상기 엽록체 표적 서열의 일예에는, 옥수수 cab-m7 신호 서열(Becker et al., *Plant Mol. Biol.* **20** :49(1992) 및 PCT WO 97/41228 참조), 완두콩 글루타티온(glutathione) 환원 효소 신호 서열(Creissen et al., *Plant J.* **2** :129(1991) 및 PCT WO 97/41228) 및 완두콩 리불로스 1,5-비스포스페이트 카르복실라제 작은 서브 유닛 신호 서열[서열 식별 번호: 19로 표시한 핵산 서열](Fluhr et al., *EMBO J.* **5** ,2063-2071(1986))이 포함된다. 또다른 바람직한 실시예는 엽록체에서 기능하는 프로모터를 포함하는 구조체를 사용하여 엽록체에서 옥시게나제의 발현을 획득하는 엽록체의 직접 형질 전환법이다. 예를 들어, PCT 출원 WO 95/24492 및 미국 특허 제 5,545,818호를 참조하라. 물론, 선별된 유전자 이식 숙주 세포 또는 유기체가 충분한 양의 내생 환원 효소, 페레독신, 또는 둘 다를 생산하지 않을 경우, 상기 숙주 세포 또는 유기체는 상기 옥시게나제 뿐만 아니라 이들 효소 중의 하나 또는 둘 다를 생산하도록 형질 전환될 수 있다.

또다른 실시예에서, 본 발명은 유전자 이식 디캄바-내성 식물이 성장하는 목초지에서 잡초를 제어하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 잡초를 제어하기 위해 상기 목초지에 디캄바의 유효량을 적용하는 단계를 포함한다. 상기 디캄바를 적용하는 방법 및 다양한 잡초를 제어하는데 효과적인 디캄바의 양은 알려져 있다. 문헌 「*Crop Protection Reference*, 1803-1821쪽(Chemical and Pharmaceutical Press, Inc., New York, NY, 11th ed. 1995)」를 참조하라.

또다른 실시예에서, 본 발명은 토양, 물, 또는 디캄바 제조 설비의 폐기물과 같은 물질에 존재하는 디캄바의 분해 방법을 제공한다. 그러한 분해는 본 발명의 디캄바-분해 효소를 사용하여 달성할 수 있다. 상기 효소는 그것을 자연적으로 발현하는 미생물로부터 정제할 수 있거나(실시예 1 및 3 참조) 또는 그것을 생산하는 유전자 이식 숙주 세포로부터 정제할 수 있다. 상기 효소를 상기 방법에 사용할 경우, 이어서 적합한 공동 인자(cofactors)를 또한 제공하여야 한다(실시예 1 참조). 유효량은 본 발명이 속하는 분야에 알려진 바와 같이 실험적으로 결정할 수 있다(실시예 1 참조). 또한, 유전자 이식 원핵 생물 및 진핵 생물의 미생물을 상기 물질 내의 디캄바를 분해하는데 사용할 수 있다. 상기 유전자 이식 원핵 생물 및 진핵 생물의 미생물은 상기 언급한 바와 같이 제조할 수 있고, 그 유효량은 본 발명이 속하는 분야에 알려진 바와 같이 실험적으로 결정할 수 있다.

디캄바는 연속적으로 많은 양이 환경으로 배출된다. 상기 디캄바의 제거는 지구의 토양 및 물에 서식하는 미생물에서 발견되는 효소 시스템의 작용에 크게 의존한다. 상기 디캄바-분해 O-디메틸라제 및 이것의 세 가지 구성 성분을 포함하는 상기 효소 시스템의 이해는, 오염된 토양, 물 및 기타 물질의 생물학적 치료 및 회복을 위하여 자연적 및 유전 공학적으로 변형된 미생물을 개발하려는 노력에 있어서 중요하다. 따라서, 본 발명의 디캄바-분해 효소, DNA 분자, DNA 구조체 등은 디캄바 분해 및 생물학적 치료의 연구를 위한 연구 도구들로서 사용할 수 있다.

마지막으로, 본 발명의 디캄바-분해 효소를 디캄바에 대한 분석에 사용할 수 있다. 디캄바를 함유하는 것으로 짐작되는 시료를 상기 디캄바-분해 O-디메틸라제, 또는 디캄바-분해 옥시게나제, 디캄바-분해 페레독신 및 디캄바-분해 환원 효소의 조합과 혼합한다. 적합한 분석법을 실시예 1 및 3에 서술한다. 특히, 3,6-DCSA의 생성에 기인한 형광의 검출 및 정량화는 분석을 편리하게 한다.

도면의 간단한 설명

도1은 디캄바 O-디메틸라제에 대해 제안된 전자 수송 모식도이다. NADH로부터의 전자는 연속적으로 환원 효소 DIC 로부터 페레독신 DIC 으로 전달된 후, 옥시게나제 DIC 로 전달된다. 3,6-디클로로살리실산을 생성하는 산소와 기질인 디캄바의 반응은 옥시게나제 DIC 에 의해 촉매된다(ox: 산화, red: 환원).

도2는 디캄바 O-디메틸라제를 구성하는 페레독신에서 유래된 아미노산 서열과 페레독신류의 아드레노독신(adrenodoxin) 계열인 멤버의 아미노산 서열을 비교한 것이다. 도2에서, 'ferr di6'는 슈도모나스 말토피리아(*Pseudomonas maltophilia*) DI-6로부터의 디캄바 O-디메틸라제의 페레독신 구성 성분[서열 식별 번호: 13]; 'fer6 rhoca'는 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*)로부터의 페레독신[서열 식별 번호: 10]; 'fer caucr'는 카우로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*)로부터의 페레독신[서열 식별 번호: 11]; 'thcc rhocr'는 로도코커스 에리스로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*)로부터의 페레독신[서열 식별 번호: 12]; 'putx psepu'는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로부터의 페레독신[서열 식별 번호: 13]; 'terp pspes'는 슈도모나스 sp.(*Pseudomonas sp.*)로부터의 페레독신[서열 식별 번호: 14]을 나타낸다. 또한, 도2에서 숫자 1~3은 박테리아 페레독신의 아드레노독신 계열의 세 개의 보존 서열(conserved motifs)을 나타낸다.

도3은 디캄바 O-디메틸라제의 두 개의 환원 효소 구성 성분에서 유래된 아미노산 서열과 FAD-의존 피리딘 뉴클레오티드 환원 효소(FAD-dependent pyridine nucleotide reductases) 계열인 멤버의 아미노산 서열을 비교한 것이다. 도3에서, 'red1 di6'는 P. 말토피리아 DI-6로부터의 디캄바 O-디메틸라제의 환원 효소 구성 성분[서열 식별 번호: 7]; 'red2 di6'는 P. 말토피리아 DI-6로부터의 디캄바 O-디메틸라제의 환원 효소 구성 성분[서열 식별 번호: 9]; 'AJ 002606'은 스팅고모나스 sp.(*Sphingomonas sp.*)로부터의 환원 효소[서열 식별 번호: 15]; 'thcd rhoer'은 R. 에리스로폴리스로부터의 환원 효소[서열 식별 번호: 16]; 'cama psepu'는 P. 푸티다로부터의 환원 효소[서열 식별 번호: 17]; 'tera pscsp'는 슈도모나스 sp.로부터의 환원 효소[서열 식별 번호: 18]를 나타낸다. 또한, 도3에서 숫자 1~5는 FAD-의존 피리딘 뉴클레오티드 환원 효소의 5개의 보존 서열을 나타낸다.

실시에

실시예 1 : 슈도모나스 말토피리아 DI-6의 디캄바 O-디메틸라제의 성분들의 정제 및 특징화

방법 및 물질:

박테리아 및 성장 조건. 디캄바로 지속적으로 오염된 토양에서 슈도모나스 말토피리아, DI-6 계통(Kreuger, et al., (1989) *J. Agric. Food Chem.*, **37**:534-538)을 분리하였다. 상기 박테리아는 일리노이 기술 연구소(Chicago, IL)의 더글라스 쿡 박사에 의해 제공되었고, 환원된 클로라이드 배지에 유지하였으며(Kreuger, J.P., (1989) Ph.D. thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL), 디캄바(2mg/ml) 또는 글루코스(2mg/ml)와 카사미노산(Casamino Acids, 2mg/ml)의 혼합물로 보충하였다. 탄소원은 필터-소독하여 고압 증기 멸균 처리한 후 배지에 첨가하였다. 1%(wt/vol)의 겔라이트(Gelrite)를 첨가하여 고체 배지를 제조하였다(Scott Laboratories, West Warwick, R.I.).

화학약품 및 시약. 디캄바, 3,6-DCSA, 및 $[^{14}C]$ 디캄바(U-페닐- ^{14}C , 42.4 mCi/mmol, 98% 이상의 방사 화학적 순도)는 산도즈 아그로사(Sandoz Agro, Inc., Des Plaines, IL)에 의해 공급되었다. 용해도를 증가시키기 위하여, 디캄바 및 3,6-DCSA 저장 용액을 KOH로 적정하여 pH 7.0로 제조하였다. 특별한 언급이 없는 한, 모든 화학 약품은 시그마 화학 주식회사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)에서 구입하였다. FPLC(fast performance liquid chromatography) 장치를 위한 수퍼로스 12, 모노 Q,Q-세파로스(Fast Flow) 및 페닐-세파로스(CL-4B) 컬럼 패키지는 파마시아사(Pharmacia, Milwaukee, WI)에서 구입하였다. 앰플라이트(Ampholyte) pH 4-6 및 앰플라이트 pH 4-9는 서바사(Serva, Heidelberg, FRG)에서 구입하였다. 아크릴아미드, β -머캅토에탄올, N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED) 및 과황산 암모늄(APS)은 바이오-레드 연구소(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에서 입수하였다. 얇은 막 크로마토그래피(TLC) 판은 UV 254 지시약을 가지는 실리카 겔(250 μ m 두께)이고, J.T.바커 화학 주식회사(J.T.Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ)에서 구입하였다.

효소 분석. 디캄바 O-메틸라제 활성은 $[^{14}C]$ 디캄바로부터의 $[^{14}C]$ 3,6-DCSA 형성을 측정함으로써 분석하였다. 요약하면, 효소 구성 성분들의 혼합물에서의 활성을 25mM의 칼륨 포스페이트 완충 용액(pH 7.0), 10mM의 $MgCl_2$, 0.5mM의 NADH(베타-니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드, 환원 형태), 0.5 mM의 황산 제1철, 50 μ M의 차가운 디캄바, 2.5 μ M의 $[^{14}C]$ 디캄바(방사성 디캄바의 최종 특이 활성은 1.9mCi/mmol임), 및 서로 다른 양의 세포 용해물 또는 부분적으로 정제된 효소를 함유하는 표준 300 μ l 반응 혼합물에서 30°C에서 측정하였다. 상기 디캄바 O-디메틸라제의 활성을 위한 pH의 최적 조건이 포스페이트 완충 용액들 간의 중간 범위에서 발견되었고, 보다 높은 효소 활성이 트리스-HCl[트리스(히드록시메틸)아미노메탄 히드록시클로라이드] 완충 용액에 비해 pH 7.0의 포스페이트 완충 용액에서 관찰되었기 때문에, 최종적인 정제 단계 중에서의 전체 효소 분석을 포스페이트 완충 용액에서 행하였다. 반응은 기질 즉, 디캄바의 첨가로 개시하였다. 특정 시간간, 50 μ l의 5%(vol/vol) H_2SO_4 를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 그 후, 1 부피의 에테르로 디캄바 및 디캄바의 대사 물질을 두 번 추출하고, 추출물을 증발시켜 건조하

였다. 추출 과정에서의 회수율(평균 $\pm$ 표준편차)은 디캄바에 대하여 87% $\pm$ 2%였고, 3,6-DCSA에 대하여는 85% $\pm$ 3%였다(Yang et al., *Anal. Biochem.* **219** :37-42 (1994)).

[^{14} C]디캄바 및 ^{14} C-표지 대사 물질을 얇은 막 크로마토그래피(TLC)로 분리하였다. 에테르로 추출된 디캄바 및 그 대사 물질을 TLC 판 상에 스팟팅하기 전에 50 μ l의 에테르에 재분해시켰다. TLC를 행하기 위한 용매 시스템으로는 클로로포름-에탄올-아세트산(85:10:5[vol/vol/vol])을 사용하였다. 24시간 동안 인광 스크린에 TLC 판을 노출시킨 후 인광 이미지 생성기(PhosphorImager) SF(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)에서 상기 스크린을 스캐닝함으로써, 분해된 반응 생성물을 시각화하고 정량화하였다. TLC 판 상의 특정 스팟에서의 방사능 양의 평가는, 알고 있는 양의 [^{14} C]디캄바를 함유하는 동일한 판 상의 스팟에 대해 그 스팟에서의 전체 픽셀 수를 비교함으로써 결정하였다. 활성의 한 단위는, 30°C에서 1분당 디캄바가 1nmol의 3,6-DCSA로 형성되도록 촉매하는 효소의 양으로서 정의하였다. 특정 활성은 분석 혼합물의 전체 단백질 농도에 기초하였다.

디캄바 디메틸라제의 환원 효소의 구성 성분의 활성은 히타치사(Hitachi)의 U-2000 분광 광도계로 2,6-디클로로페놀인도페놀(2,6-dichlorophenolindophenol; DCIP)의 환원을 측정하여 분석하였다. 상기 반응에는 1ml의 전체 부피에 0.5mM의 NADH, 0.2mM의 FAD, 50 μ M의 DCIP, 20mM의 트리스 완충 용액(pH 8.0), 및 10-100 μ l의 효소 시료가 포함되었다. 시간에 따른 600nm에서의 흡수도의 변화를 실온에서 측정하였다. 특정 활성은 환원된 DCIP에 대해 21.0mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ 의 600nm에서 흡광 계수(extinction coefficient)를 사용하여 계산하였다. 상기 특정 활성은 단백질의 min $^{-1}$ mg $^{-1}$ 환원 nmol DCIP로 표현하였다.

또한, 인 시추(in situ) DCIP 분석은 이소일렉트릭 포커싱(isoelectric focusing; IEF) 겔 상에 분리된 단백질 제제에서 환원 효소 활성을 검출하고 위치를 알아내는데 사용하였다. IEF 겔 상에서 단백질을 전기 영동한 후, 겔로부터 잘라내어진 레인들을 20ml의 차가운 20mM 트리스-HCl 완충 용액(pH 8.0)으로 세정하였다. 저용점 아가로스를 10ml의 20mM 트리스-HCl 완충 용액(pH 8.0)에 넣고 가열하여 1.5%(w/v)의 최종 농도로 용해시켰다. 상기 아가로스가 실온 근처로 냉각되었을때, 0.2mM의 FAD, 50 μ M의 DCIP, 및 0.5mM NADH를 보충하였다. 이들 분석 혼합물을 유리판 상에 붓고 고체화시켰다. 상기 고체화된 반응 혼합물의 상부에 겔 조각을 놓고 15분간 실온에 방치하였다. 상기 겔 슬라이스가 환원 효소의 활성을 가지는 단백질을 함유할 경우, 환원된 DCIP의 무색 밴드가 DCIP의 파랑색 배경에서 생성되었다.

세포 용해물(Cell lysates). 세포를 로터리 셰이커(rotary shaker, 30°C, 250rpm)의 글루코스 및 카사미노산의 혼합물을 함유하는 액체 환원 클로라이드 배지에서 1.3 내지 1.5의 550nm 광학 밀도를 가질 때까지 성장시켰다. 상기 세포를 원심 분리하여 회수하고, 100mM의 차가운 MgCl₂로 2회 세척한 후, 다시 원심 분리하였다. 세포 페이스트(cell pastes)를 즉시 이용하거나 또는 액체 질소 중에 즉각 냉동시켜 -80°C에 저장해두었다. 효소 정제 시에, 냉동된 세포의 25g을 해동시켜 25mM의 트리스 완충 용액(pH 7.0), 10mM의 MgCl₂, 및 0.5mM EDTA를 함유하는 50ml의 분리 완충 용액에 재현탁시켰다. 페닐메틸설포닐 플루오라이드 및 디티오프레itol(dithiothreitol)이 각각 0.5mM 및 1mM의 최종 농도가 되도록 첨가하였다. 10mg의 라이소자임과 1mg의 디엔아제(DNase)를 첨가한 후, 얼음 상에서 상기 세포를 10분간 교반하고, 20초 간 작동하고 40초 간 휴식 간격을 가지도록 12회 운전이 세팅(세팅 5)된 얼음 상의 매체에서 초음파 분쇄법(모델 XL2020 초음파 분쇄기; Heat Systems)으로 상기 세포를 분쇄시켰다. 결과물인 세포 용해물을 분리 완충 용액으로 90ml까지 희석시키고, 4°C에서 1시간 동안 76,000 x g로 원심 분리하였다. 처리된 세포 용해물의 원료로서 상청액을 사용하였다.

효소 정제. 특별한 언급이 없는 한, 모든 과정을 4°C에서 행하였다. 상기 처리된 세포 용해물의 90ml 부피에 고체 황산 암모늄을 40%(wt/vol) 농도까지 계속해서 교반하면서 천천히 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 혼합물을 15분 동안 15,400 x g에서 원심 분리하고, 침전물을 제거하였다. 상청액을 계속해서 교반하면서, 추가적으로 고체 황산 암모늄을 70%(wt/vol) 농도까지 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 상기 언급한 바와 같은 조건 하에서 원심 분리하였다. 상청액을 제거하고, 침전물을 완충 용액 A(20mM의 트리스[pH 8.0], 2.5mM의 MgCl₂, 0.5mM의 EDTA, 5% (vol/vol)의 글리세롤, 및 1mM의 디티오프레itol)의 최소 부피에 재현탁시켰다.

다음으로, 상기 40%-70% 황산 암모늄 처리물을 FPLC 장치(Pharmacia)에 연결된 페닐-세파로스 컬럼(10cm 당 2.5)에 적재하고, 10%(w/v)에서 0%(w/v)로 직선 기울기로 감소되는 (NH₄)₂SO₄를 사용하여 용출하였다. 상기 컬럼을 10%(wt/vol) 황산 암모늄을 함유하는 완충 용액 A로 미리 평형화시켰다. 유속은 1ml/min으로 하고, 컬럼 용출 중에는 A₂₈₀에서 단백질의 농도를 계속적으로 모니터링하였다. 기준선 A₂₈₀ 판독을 얻을 때까지 상기 컬럼을 100%(wt/vol)의 황산 암모늄을 함유하는 완충 용액 A 120ml로 세정하였다. 결합된 단백질을 상기 완충 용액 A 중에서 감소되는 기울기의 (NH₄)₂SO₄ [210ml의 전체 부피에서 10에서 0%(wt/vol)까지의 (NH₄)₂SO₄]로 용출하고, 2ml의 분획을 회수하였다. 각각의 분획에서 10 μ l의 하부 분획(aliquots)을 취하여, 기질로서 사용한 비방사성 디캄바를 제외한 표준 디캄바 O-디메틸라제 분석 혼합물(상기 참조)에 첨가하였다. 상기 디캄바 O-디메틸라제의 활성은 암실에서 포켓용 UV 램프(312nm, Fotodyne)를 사용하여 높은 형광 반응 산물인 3,6-DCSA로의 디캄바의 변환을 모니터링함으로써 검출하였다.

이러한 과정은 분리된 구성 성분(구성 성분 I, II 및 III으로 지정)을 함유하는 세 개의 풀(pools)로 상기 디카바 O-디메틸라제의 분리를 가능하게 한다. 각각의 구성 성분은 디카바 O-디메틸라제의 활성을 위해 필수적이다(하기 참조). 하나의 구성 성분을 분석할 경우, 나머지 두 개의 구성 성분을 과잉 공급하였다. 한 가지 형태의 활성을 함유하는 분획(구성 성분 I, 분획 128-145; 구성 성분 II, 결합되지 않은 분획 12-33; 구성 성분 III, 분획 62-92)을 풀(pooled)화하였다.

(i) 구성 성분 I의 정제. 구성 성분 I의 활성을 함유하는 분획(0M의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 페닐-세파로스 컬럼으로부터 용출한 것, 분획 128-145)의 총 부피가 34ml가 되도록 풀화하였다(pooled). 상기 풀화된 시료를 Centriprep-10 장치(상품명, Amicon사 제)로 원심 분리하여 10ml까지 농축시킨 후, 완충 용액 A로 평형화된 Q-세파로스(Fast Flow) FPLC 컬럼(Pharmacia사 제)(6cm 당 2.5)에 가하고, 80ml의 완충 용액 A로 세척하였다. 상기 컬럼에 결합된 단백질은 완충 용액 A 중에서 0 내지 0.6M의 직선 기울기의 KCl 100ml를 1ml/min의 유속으로 가하여 용출하였다. 1.5분의 간격으로 분획을 회수하였다. 구성 성분 I의 활성을 나타내는 분획(분획 29-37)을 풀화하고, 하룻밤 동안 4°C에서 완충 용액 A로 투석시켜 완충 용액 A 중의 Mono Q HR 5/5 FPLC 음이온-교환 컬럼에 적용하였다. 0에서 0.5M로 농도의 기울기가 증가하는 KCl을 50ml 사용하여 단백질을 1ml/min 속도로 용출하였다. 구성 성분 I의 활성을 나타내는 분획(분획 19 내지 25)을 풀화하고, Centricon-10 장치(상품명)를 사용하여 원심 분리함으로써 0.4ml까지 농축시켰다. 이어서, 상기 농축 시료를 100mM의 KCl을 함유하는 완충 용액 A와 함께 0.2ml/min의 유속으로 흘러 슈퍼로스 12 FPLC 컬럼(50cm 당 1.6) 상에서 크로마토그래피하였다. 구성 성분 I의 활성을 나타내는 분획 7-10을 풀화하고, Centricon-10 장치(상품명)로 원심 분리하여 농축시켰다.

IEF 전기 영동을 위한 제제 내의 염분을 제거하기 위하여, 부분적으로 정제된 구성 성분 I을 차가운 1%(w/v)의 글리신으로 희석시키고, Centricon-10 장치(상품명)로 세번 이상 원심 분리하여 농축시켰다. 이어서, 상기 염분이 제거되고 농축된 시료를 pH 4~6의 6%(w/v) IEF에 가하여 4°C에서 1.5시간 동안 전기 영동을 행하였다(하기 참조). 상기 전기 영동을 행한 이후에는 5분 동안 25mM의 차가운 포스페이트 버퍼(pH 7.0)로 세정하고, 이어서 상기 겔 레인의 각각의 슬라이스를 6mm×4mm의 작은 조각으로 잘랐다. 10μl의 25mM 포스페이트 완충 용액(pH 7.0)의 존재하에서 피펫 팁으로 상기 자른 겔 분획을 갈아 단백질을 용출하였다. 각 세그먼트로부터의 단백질을 과잉의 구성 성분 II 및 구성 성분 III과 혼합하고, 디카바 O-디메틸라제에 대한 활성을 분석하였다. 구성 성분 I의 활성을 나타내고 또한 적갈색을 나타내는 상기 겔 세그먼트를 12.5%(w/v)의 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔(SES-PAGE) 상에 적재하여 시료의 순도를 체크하였다.

(ii) 구성 성분 II의 정제. 페닐-세파로스 컬럼 크로마토그래피로 수득한 구성 성분 II을 4°C에서 하룻밤 동안 완충 용액 A에 대해 투석시키고, FPLC Q-세파로스 컬럼(6cm 당 2.5)에 가하였다. 시료 용출 조건은 용출 기울기를 완충 용액 A 중에서 0에서 1M KCl로 한 것을 제외하고, 구성 성분 I에 대해 상기 언급한 조건과 동일하였다. 구성 성분 II의 활성을 나타내는 분획(분획 30-37)을 풀화하고, 완충 용액 A에 대해 투석시킨 후, 0.4ml까지 농축시켜 FPLC 슈퍼로스 12 컬럼(50cm 당 1.6)에 가하였다. 시료의 적용 및 용출 과정은 구성 성분 I에 대해 상기 언급한 바와 동일하였다. 구성 성분 II의 활성을 나타내는 분획(분획 3-6)을 풀화하고, 동일한 부피의 완충 용액 A로 희석한 후, FPLC Mono Q 컬럼에 가하였다. 상기 구성 성분 I에서와 동일한 기울기로 KCl을 사용하여 상기 컬럼으로부터 단백질을 용출하였다. 분획 20-25는 구성 성분 II의 활성을 나타내었다. 부분적으로 정제된 구성 성분 II를 구성 성분 I에 대해 상기 언급한 바와 동일한 조건으로 IEF(pH 4-6) 전기 영동하여 더 정제하였다. 부가적인 분석을 위해 구성 성분 II의 활성을 나타내는 상기 겔 세그먼트를 12.5%(w/v) SDS-PAGE에 적재하였다.

(iii) 구성 성분 III의 정제. 페닐-세파로스 컬럼 크로마토그래피로 수득한 구성 성분 III을 4°C에서 하룻밤 동안 완충 용액 A에 대하여 투석시키고, FPLC Q-세파로스 컬럼(6cm 당 2.5)에 가하였다. 조건들은 구성 성분 I에 대하여 상기에서 설명한 바와 동일하였다. 구성 성분 III의 활성을 나타내는 분획(분획 26-38)을 완충 용액 B[10mM의 트리스-HCl(pH 7.5), 2.5mM의 MgCl_2 , 5%(v/v)의 글리세롤, 1mM의 디티오프레이톨]에 대하여 투석시키고, 5ml로 농축시켰다. 청색 염료 친화성 매트릭스[Cibacron Blue 3GA type 3000(상품명, Sigma사 제)]를 FPLC 컬럼(1 x 5cm)에 패킹시키고, 20ml의 완충 용액 B로 미리 평형화시켰다. 상기 농축된 구성 성분 III을 청색 염료 컬럼에 적재하고, 컬럼 용출물의 A_{280} 이 기준선 수준에 도달할 때까지 20ml의 완충 용액 B를 사용하여 0.2ml/min의 유속으로 세정하였다. 이어서, 완충 용액 B에서 5mM NADH를 사용하여 결합된 단백질을 용출하였다. 환원 효소의 활성을 함유하는 분획은 과잉의 구성 성분 I 및 II의 존재하에서 디카바 O-디메틸라제 활성에 대한 분석을 행하여 검출하고, 또한 NADH의 존재하에서 각 분획의 DCIP 환원 능력에 의해 검출하였다. 둘 다의 분석에서 강한 환원 효소의 활성을 가지는 분획을 풀화하고, 100mM KCl을 함유하는 완충 용액 A에 대해 투석하고, 0.2ml로 농축한 후, FPLC 슈퍼로스 12 컬럼에 가하였다. 상기 슈퍼로스 컬럼을 가동하기 위하여 상기 구성 성분 I에서 설명한 바와 동일한 조건을 사용하였다. DCIP 환원을 촉매하는 단백질을 함유하는 분획을 풀화하고, 완충 용액 A에 대해 투석시켜 FPLC Mono Q 컬럼에 가하였다. 단백질은 상기 구성 성분 I에서와 같은 조건을 사용하여 용출하였다. 부분적으로 정제된 상기 구성 성분 III을 IEF(pH 4-6) 겔 전기 영동으로 더 정제하였다. 상기 IEF 겔 내에서의 단백질의 환원 효소 활성은 상기 언급한 바와 같이 아가로스 겔 오버레이(overlay)에서 DCIP 환원에 대한 분석을 행함으로써 검출하였다. 부가적인 분석을 위하여, 상기 구성 성분 II의 활성을 나타내는 상기 겔 세그먼트를 12.5%(w/v) SDS-PAGE 상에 적재하였다.

NH₂ -말단 아미노산 서열의 결정. 단백질 밴드를 IEF 겔에서 잘라내어 12.5%(w/v) SDS 폴리아크릴아미드 겔의 웰에 놓았다. 전기 영동 이후에 상기 정제된 단백질을 함유하는 겔 슬라이스를 16시간 동안 25 볼트로 Trans-Blot 세포(Bio-rad, Richmond, CA)내의 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막(Milipore) 상에 트랜스블랏(transblotted)하였다. 상기 블랏팅 완충 용액은 10mM의 CAPS[3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid]를 함유하는 pH가 10.0인 20%(v/v)의 메탄올 용액이다. 서열 분석은 Applied Biosystems사의 420 H 기계를 사용하여 에드만 분해법(Edman and Henschen(1975) pages 232-279 in S.B. Needleman (ed.), *Protein sequence determination*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York)으로 행하였다.

단백질 농도의 결정. 단백질 농도는 표준으로서 소 혈청 알부민을 사용하여 브래드 포드법(1976)(*Anal. Biochem.* 72:248-254)으로 결정하였다.

SDS-PAGE. 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(SDS-PAGE)은 변형된 라에몰리의 방법(Laemmli(1970) *Nature*, 227:680-685)에 따라 행하였다. 85 x 65 x 0.75mm의 12.5%(w/v) SDS 겔을 하기와 같이 제조하였다: 러닝겔(running gel): 2.5ml의 40%(w/v) 아크릴아미드/비스 용액(37:5:1), 1ml의 러닝 완충 용액[3M 트리스-HCl(pH 8.8), 0.8%(w/v) SDS], 4.5ml의 H₂O, 5μl의 TEMED, 및 40μl의 10%(w/v) APS; 스택킹겔(stack ing gel): 0.5ml의 40%(w/v) 아크릴아미드/비스, 0.5ml의 스택킹 완충 용액[1M의 트리스-HCl(pH 6.8), 0.8%(w/v)의 SDS], 3ml의 H₂O, 5μl의 TEMED, 및 12.5μl의 10% (w/v) APS. 상기 러닝 완충 용액의 조성은 25mM의 트리스-HCl(pH 8.3), 0.2M의 글리신, 및 0.1%(w/v)의 SDS이다. 상기 시료 완충 용액은 0.25ml의 스택킹 완충 용액, 0.6 ml의 20%(w/v) SDS, 0.2ml의 β-머캅토에탄올, 및 50%(v/v) 글리세롤 중의 0.95ml의 0.1% 브롬페놀 블루 (w/v)를 함유한다. 상기 전기 영동은 트래킹 염료(tracking dye)가 겔의 음극 말단에서 0.5cm가 될 때까지 Bio-Rad Mini Gel 장치(상품명)에서 80 볼트로 행하였다. 단백질은 이소프로판올, 물 및 아세트산을 3:6:1(v/v/v)의 비율로 혼합한 0.1%(w/v)의 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie Brilliant Blue R-250)로 염색하였다. 탈색은 메탄올, 물 및 아세트산을 7:83:10(v/v/v)의 비율로 혼합한 것 중에서 행하였다. 표준 단백질(Gibco BRL)에는 미오신(214.2 kDa), 포스포릴라제 B(111.4 kDa), 소 혈청 알부민(74.25 kDa), 난알부민(ovalumin, 45.5 kDa), 탄소 탈수 효소(carbonic anhydrase, 29.5 kDa), β-락토글로불린(18.3 kDa), 및 라이소자임(15.4 kDa)이 포함된다.

분자량의 결정. 상기 SDS-PAGE 분석을 사용하여 변성 조건 하에서의 펩티드의 분자량(M_r)을 평가하였다. 천연 그대로의 구성 성분 I, II 및 III의 분자량은 100mM의 KCl을 함유하는 완충 용액 A 중에서 0.2ml/min의 유속으로 슈퍼로스 12 HR 10/30 FPLC 컬럼(Pharmacia)을 통과시키는 겔 여과법으로 평가하였다. 측정 단백질(calibration proteins)은 Bio-Rad 유래의 겔 여과법 표준 단백질이다. 그것은 다음과 같다: 소의 타이로글로불린(bovine thyroglobulin, 670 kDa), 소 감마 글로불린(158 kDa), 닭 난알부민(44 kDa), 말 미오글로빈(17 kDa) 및 비타민 B-12(1.35 kDa). 상기 슈퍼로스 12 컬럼의 공극 부피는 Blue Dextran(상품명, M_r 2,000,000, Sigma사 제)를 사용하여 계산하였다.

IEF. 이소일렉트릭 포커싱(IEF) 겔 전기 영동은 C.B.S. 사이언티픽 회사 (Del Mar, CA)의 수직 미니-겔 장치(모델명 #MGV-100)에서 행하였다. 6%(w/v)의 폴리아크릴아미드를 가지는 IEF 겔(70 x 90 x 1 mm)은 1.6ml의 30%(w/v) 아크릴아미드/비스(37:5:1), 0.8g 글리세롤, pH 4-6인 0.32ml의 암폴라이트(Serva), pH 4-9인 0.08ml의 암폴라이트(Serva), 5.2ml H₂O, 10μl TEMED, 및 80μl의 10%(w/v) APS를 혼합하여 제조하였다. 양극 완충 용액은 100mM β-알라닌이고, 음극 완충 용액은 100mM 아세트산이다. 약 1 내지 10μl의 1%(w/v) 글리신 중의 단백질 시료를 동일한 부피의 시료 완충 용액[50%(v/v) 글리세롤, pH 4-9인 1.6%(v/v) 암폴라이트, 및 pH 4-6인 2.4%(v/v) 암폴라이트]과 혼합하였다. 상기 시료를 상기 겔의 양극 말단에 적재하고, 1.5시간 동안 200볼트 및 또다른 1.5시간 동안 400볼트에서 이동시켰다. 단백질은 SDS 폴리아크릴아미드 겔에서 설명한 과정에 따라 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 염색하였다. IEF 마커(시그마사 제)는 pI 3.6의 아밀로글루코소다제(amyloglucosodase), pI 4.2의 글루코스 산화 효소, pI 4.6의 트립신 억제제(inhibitor), pI 5.1의 β-락토글로불린 A, pI 5.4의 탄소 탈수 효소 II; pI 5.9의 탄소 탈수 효소 II, 및 pI 6.6의 탄소 탈수 효소 I이다.

반응 속도 분석(Kinetic analysis). 디카바 O-디메틸라제에 의해 촉매되는 디메틸화 반응의 속도는, 일정한 농도의 효소의 존재하에서 그 반응의 초기 속도를 분석하고, 기질 즉, 디카바의 농도를 증가시킴으로써 연구하였다. 반응 혼합물은 300μl의 전체 부피 중에 25mM 칼륨 포스페이트 완충 용액(pH 7.0), 10mM MgCl₂, 0.5mM NADH, 0.5mM FeSO₄, 25μg의 부분적으로 정제된 O-디메틸라제 효소[처리된 세 포 용해물로부터의 상기 40%-70%(w/v) (NH₄)₂SO₄ 분획], 0.5 내지 50 μM의 다양한 농도의 디카바 및 0.025 내지 2.5 μM의 다양한 농도의 [¹⁴C]디카바(U-페닐- ¹⁴C, 42.4mCi/mmol)를 포함한다. 0.5 μM 및 1 μM의 디카바 농도로 행하는 분석에 대해, 반응 부피를 900μl로 증가시켜 방사성 디카바 및 그것의 대사 산물이 검출이 가능한 정도로 충분한 양으로 존재하는지 확인하였다. 이러한 반응에서, 상기 반응의 기타 모든 구성 성분의 양을 3배로 하였다. [¹⁴C]디카바에서 [¹⁴C]3,6-DCSA로의 변환은 24시간 동안 TLC 판들에 노출된 인광체 스크린 상의 방사능을 스캔하는 PhosphorImager SF(상품명)를 사용하여 디카바의 각각의 농도에 대한 다른 시점에서 결정하였다. 활성의 한 단위는 30°C에서 분당 1nmol의 3,6-DCSA를 형성하는 효소의 양으로 정의하였다. 각 반응의 초기 속도는 각각의 기질 농도에서 시간에 대한 반응 속도를 플로팅함으로써 결정하였다. 데이터는 미카엘리스-멘텐 속도론(Michaelis-Menten kinetics)에 따라 모델화하였고, K_m 및 V_{max}의 값은 SigmaPlot(상품명, Jandel Scientific, Corte Madera, CA)를 사용하여 라인위버-버크 플

랏(Lineweaver-Burk plots)에 맞춰 결정하였다.

산소 요구량(Oxygen requirement). 클라크(Clark) 산소 전극을 사용하여 행하는 예비 실험은 기질로서 디캄바를 사용하는 표준 디캄바 O-디메틸라제 분석 중의 산소 소모량을 나타내었다. 디캄바 O-디메틸라제에 의한 디캄바의 O-디메틸화에서 산소 요구량을 확인하기 위하여, 1ppm 미만의 산소를 함유하는 혐기성 챔버 내에서 반응을 수행하였다. 상기 반응 혼합물로부터 산소를 배제하기 위한 과정은 4°C에서 행하였다. 효소를 결여시킨 상기 반응 혼합물을 바이알(vial)에 넣고 고무 매개로 봉하였다. 산소의 배제를 위하여, 바이알을 진공으로 두번 처리하고, 그 때마다 질소를 불어넣었다. 세 번째 진공 처리를 행한 이후에는 상기 바이알에 90% 질소와 10% 수소를 불어넣었다. 상기 효소 용액도 마찬가지로 효소 용액에 거품이 생기지 않도록 주의하면서 산소를 제거하였다. 상기 반응 혼합물 및 효소 용액 둘다 혐기성 챔버(95% N₂ - 5% H₂ 분위기) 내로 옮겼다. 상기 처리된 세포 용해물의 240μl를 미세 주사기로 고무 매개를 통해 주입하고, 960μl의 산소-유리 반응 혼합물과 부드럽게 혼합하였다. 반응은 30°C에서 수행되었다.

TLC 판 상에서의 반응 생성물의 조사는, 혐기성 조건 하에서 [¹⁴ C]디캄바로부터의 [¹⁴ C]3,6-DCSA 생성 속도가, 호기성 조건 하에서 동일한 양의 효소에 의한 반응 속도보다 현저하게 낮다는 것을 보여주었다. 혐기성 조건 하에서, 1시간 이내에 디캄바의 3,6-DCSA로의 변환은 사실상 없었다. 그러나, 병행 처리한 반응 혼합물을 30분 후에 혐기성 챔버에서 취하여 공기 중에서 배양하는 경우, 현저하게 양이 증가되는 디캄바 O-디메틸라제 효소 복합물의 구성 성분 중의 하나는 옥시게나제였다.

[¹⁴ C]디캄바에서의 [¹⁴ C]3,6-DCSA로의 시험관 내(*in vitro*) 변환은 기존에 문헌화된(Cork and Kreuger, *Adv. Appl. Microbiol.* **36** :1-66(1991); Yang et al., *Anal. Biochem.* **219** :37-42(1994)) 생체 내(*in vivo*) 변환 경로를 모방한다는 것을 주지시킬 수 있다. 이러한 연구에서, DCSA는 TLC 및 모세관 전기 영동의 둘 다에 의한 반응 생성물로서 동정되었다. 생체 내 및 시험관 내 모두에서 디캄바 분해의 제1 주요 산물로서 DCSA의 엄격한 동정은 가스 크로마토그래피-질량 분광 분석으로 획득하였다.

구성 성분 및 공동 인자 요구량. 페닐-세파로스 컬럼 크로마토그래피로 디캄바 O-디메틸라제의 세 가지 구성 성분의 초기 분리를 행한 후에, Q-세파로스 컬럼(6cm 당 2.5) 상에서 한번의 추가적인 정제를 통해 부분적으로 정제된 제제를 각각 취하였다. 시료를 완충 용액 A 중에서 Q-세파로스(Fast Flow) 급속 단백질 액체 크로마토그래피 컬럼(Pharmacia)에 가하고, 1.5ml 분획에서 0에서 0.6M KCl(옥시게나제 구성 성분에 대해) 또는 0에서 1.0M KCl(페레독신 및 환원 효소 구성 성분에 대해)의 직선 기울기로 100ml로 용출하였다. 상기 옥시게나제의 정제(분획 29~37), 상기 페레독신의 정제(분획 30~37), 또는 상기 환원 효소의 정제(분획 26~38)를 위한 개별적인 컬럼으로부터의 적절하게 풀화된 분획은 구성 성분 및 공동 인자 요구량의 결정에 사용하였다.

구성 성분의 요구량을 결정하기 위하여, 다양한 조합에서 O-디메틸라제 활성에 대해 상기 세 가지 구성 성분을 분석하였다.

공동 인자의 요구량을 결정하기 위해서는, [¹⁴ C]디캄바와 상기 세 가지 구성 성분의 혼합물을 사용하여 30°C에서 30분 동안 O-메틸라제 활성을 분석하였다. 상기 반응 혼합물 중에서 부분적으로 정제된 단백질의 양(최적화된 비율로 제공됨)은 옥시게나제 85μg, 페레독신 55μg 및 환원 효소 50μg이었다. 상기 반응 혼합물에 사용된 공동 인자의 농도는 NADH 0.5mM, FAD 0.2mM, FeSO₄ 0.5mM, MgCl₂ 10mM, NADPH 0.5mM, 및 FMN 0.2mM이었다.

결과

구성 성분 I. 페닐-세파로스 컬럼에 가장 강하게 결합된 디캄바 O-디메틸라제의 구성 성분(초기에 구성 성분 I로 지정되었고, 이어서 옥시게나제로 동정됨)은 확연하게 적갈색이었다. 이것은 철-황 클러스터(들) 또는 헴 그룹(들)을 함유하는 단백질(들)의 잠재적인 존재를 나타낸다. 페닐-세파로스 컬럼으로부터 구성 성분 I의 활성을 가지는 분획을 Q-세파로스(Fast Flow) 및 Mono Q 크로마토그래피로 더 정제한 후, 슈퍼로스 12 크기 배제 컬럼 상에서 분리하였다. 이어서, 상기 구성 성분 I 단백질을 IEF 겔 상에서 더 정제하였다.

IEF 겔 상의 주요 밴드로부터의 단백질(약 4.6의 겔보기 pI를 가짐)을 잘라내고, SDS-PAGE로 잔류하는 소량의 오염 원으로부터 분리해내었다. IEF에 의한 정제 이후에 수득한 주요 구성 성분 I의 단백질은, 쿠마시 블루로 염색한 SDS-폴리아크릴아미드 겔의 농도계 분석에 의해 판단된 바와 같이, 90% 이상의 순도를 가졌다.

약 40,000 달톤(Daltons)의 겔보기 분자량을 가지는 주요 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 아미노산 서열 분석의 결과는 N-말단 영역의 최초 29개의 아미노산이 하기의 서열로 존재함으로 나타내었다(괄호 안의 잔기는 최상의 추측에 의한 것이다).

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp (Asp 또는 Thr) (Pro)

[서열번호 1]

다양한 데이터베이스에서의 아미노산 서열의 비교는 다른 모노옥시게나제나 또는 디옥시게나제들에 대해 보고된 NH_2 -말단 서열과는 상동성이 거의 또는 전혀 없음을 나타내었다.

구성 성분 II. 페닐-세파로스 컬럼에 결합되지 않은 단백질 분획을 구성 성분 II로 지정하였다. 이 노란색의 분획은, 구성 부분 I 및 구성 성분 III의 조합에 대한 분석을 행할때 클로스트리디움 파스퇴리아눔(*Clostridium pasteurianum*) 유래의 페레독신으로 대체될 수 있기 때문에(그러나 반응 속도는 느림), 임시적으로 페레독신-함유 분획으로 지정하였다. 상기 클로스트리디움 페레독신은 명백하게 구성 성분 II를 대신하여 작용하지만, 이들 실험에 사용한 천연의 상기 구성 성분 II는 불순물을 다량 함유하기 때문에, DI-6 계통 유래의 추정 페레독신의 효율에 비해 클로스트리디움 효소의 효율은 현저하게 낮았다. 특히, 과잉의 상기 구성 성분 I 및 구성 성분 III과 혼합한 55 μg 의 부분적으로 정제된 상기 구성 성분 II는 3,6-DCSA로의 디카바의 변환을 $5\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 속도로 촉매한 반면에, 고도로 정제된 100 μg 의 클로스트리디움 유래의 페레독신은 단지 $0.6\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 활성을 나타내었다.

Q-세파로스(Fast Flow) 크로마토그래피, 슈퍼로스 12 겔 여과법, 및 모노 Q 크로마토그래피를 포함한 정제 단계는 초기 25g의 세포 용해물로부터 약 1mg의 정제된 단백질을 산출하였다. 이러한 분획을 상기 옥시게나제 구성 성분과 유사한 방식으로 IEF 겔 상에서의 전기 영동 및 이어지는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서의 활성 IEF 분획의 전기 영동에 의해 정제하였다.

IEF 겔의 세그먼트로부터 용출된 단백질에서 상기 구성 성분 II 활성의 분석은, 약 3.0의 pI를 가지는 분획이 상기 구성 성분 II에서 활성 단백질을 함유함을 나타내었다. 이러한 겔 슬라이스로부터 단백질을 용출하고, SDS-PAGE를 행하였다. 쿠마시 블루로 염색한 겔은 저분자량의 단백질의 번짐을 따라 하나의 두드러진 단백질(분자량 약 28,000 달톤) 밴드를 나타내었다.

구성 성분 III. 디카바 O-디메틸라제의 구성 성분 III은 고농도의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 중에서 페닐-세파로스 컬럼 상에 존속하였고, 약 4%(w/v)의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 용출되었다. 밝은 노란색의 분획은 NADH의 존재하에서 산화된 시토크롬 c 및 DCIP를 환원시키는 능력, 및 구성 성분 I 과 구성 성분 II의 분석에서 돼지 심장(Type 1, Sigma사 제) 유래의 시토크롬 c 환원 효소를 대신할 수 있었기 때문에 그것을 기초로 하여 환원 효소를 함유하는 분획으로서 잠정적으로 동정하였다. 이러한 반응 세트에서, 50 μg 의 부분적으로 정제된 상기 구성 성분 III의 사용은 상기 과잉의 구성 성분 I 및 구성 성분 II과 혼합하였을 경우 약 $5\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 반응 속도를 산출하였다. 고도로 정제된 시토크롬 c 환원 효소는, 이러한 분석에서 사용하는 상기 거친(crude) 구성 성분 III의 불순물을 고려하였을때 상기 반응에서 상기 구성 성분 III에 의해 제공되는 활성보다는 현저하게 낮은 활성인 약 $2.5\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 특정 활성을 나타내었다. 또한, 상기 구성 성분 III은 NADH의 존재하에서 시토크롬 c 또는 2,6-디클로로페놀-인도페놀(DCPIP)과 함께 배양하였을때 환원 효소의 활성을 나타내었다. 상기 구성 성분 I 및 상기 구성 성분 II의 어느 것도 이러한 두가지 환원 효소 분석에서 활성을 나타내지 않았다.

Q-세파로스(Fast Flow), 청색 염료 친화성 매트릭스, 슈퍼로스 12 및 모노 Q 패킹을 포함하는 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의한 분획의 추가적인 정제는 환원 효소의 활성을 가지는 분획에서의 단백질의 양을 소량화하였다. 상기 구성 성분 III의 단백질은 SDS-PAGE와 쿠마시 블루로 염색에 의한 분리 이후에 활성 단백질 분획을 농도계 분석하여 판단한 바와 같이 약 70%의 순도를 가졌다.

상기 구성 성분 III의 정제를 더욱 심화하기 위하여, 상기 페레독신 및 옥시게나제 화합물과 분석하였을때 환원 효소의 활성을 함유하는 상기 모노 Q 컬럼 단계 유래의 두가지의 다른 단백질 분획을 발견하였다. IEF 겔 상에서의 전기 영동에 의해 이들 두가지 분획을 더 정제하였을때, 두가지 분획의 환원 효소의 활성은 분명하게 다른 등전점(isoelectric points)을 가지는 것으로 나타났다. 이것은, IEF 겔로부터 두개의 환원 효소 분획의 각각을 함유하는 레인을 잘라내어 그 슬라이스를 DCIP 반응 혼합물을 함유하는 저용점 아가로스 패드 상부에 놓았을때 증명된다. DCIP가 무색의 환원 형태로 NADH-의존 환원되는 것에 의해, 둘 다의 겔 슬라이스에서 환원 효소의 활성이 동정되었다. 분획 27에서의 환원 효소가 약 4.8의 겔보기 pI를 나타냄에 반해, 분획 35에서의 상기 환원 효소는 약 5.6의 겔보기 pI를 나타내었다.

상기 IEF 겔 슬라이스로부터 분리된 둘 다의 환원 효소의 활성은 불안정하였고, 소량으로 존재하였다. 실제로, 모노 Q 컬럼 분별로부터의 분획 35 유래의 환원 효소만이 추가의 정제 및 특징화가 가능하도록 충분한 단백질 농도와 활성을 보유하였다. 이러한 환원 효소의 활성을 함유하는 IEF 겔로부터 슬라이스를 용출해내고, SDS-PAGE를 사용하여 오염된 단백질로부터 분리해내었다. 이러한 겔에서 두드러지는 단백질은 약 45,000 달톤의 질량을 가지는 것이다. 크기 배제 크로마토그래피는 천연의 상태로 존재하는 상기 구성 성분 III이 약 50,000 달톤의 분자량을 가짐을 나타낸다.

디카바 O-디메틸라제의 생화학적 특징. 디카바 O-디메틸라제의 활성은 20°C에서 50°C까지 범위의 온도 및 약 6에서 9까지의 pH에서 시험관 내 배양 중에 측정하였다. 활성은 30°C에서 날카로운 피크를 가지고 pH 6.5와 7.5 사이에

서 넓은 피크를 가졌다. 효소 활성은 채택한 pH 완충 용액의 형태에 의존적이었다. 예를 들어, pH 7에서 활성은, 트리스-함유 완충 용액이 포스페이트-함유 완충 용액에 비해 약 40% 낮았다.

디캄바 O-디메틸라제에 대한 K_m 및 V_{max} 값은 이중 실험으로부터의 데이터의 미카엘리스-멘텐 및 라인위버-버크 플롯에서 유래한 가장 적합한 커브를 산출하기 위하여 SigmaPlot(상품명)을 사용하여 측정하였다. 디캄바에 대한 K_m 은 약 $9.9 \pm 3.9 \mu M$ 로 측정되었고, 상기 반응에 대한 V_{max} 는 약 $108 \pm 12 \text{ nmol/min/mg}$ 로 측정되었다.

상기 세가지 구성 성분을 다양하게 조합하여 디캄바 O-디메틸라제의 활성에 대해 분석하였다. 어떤 구성 성분도 단독으로 분석한 경우에는 효소의 활성을 나타내지 않았다. 실제로, 현저한 양의 O-디메틸라제 활성은 세가지 구성 성분이 모두 조합되어 있을 때에만 검출할 수 있었다. 상기 구성 성분 I 및 구성 성분 II의 혼합물은 소량의 효소 활성을 나타내었는데, 이것은 아마도 상기 구성 성분 I 분해를 오염시키는 미량의 상기 구성 성분 III에 기인한 것이다.

NADH 및 NADPH는 둘 다 효소의 활성을 보조하였고, NADH가 NADPH에 비해 보다 더 효과적으로 보조하였다. Mg^{2+} 는 효소 활성에 필수적이었다. Fe^{2+} , 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(FAD) 및 플라빈 모노뉴클레오티드(FMN)는 이러한 실험에서 부분적으로 정제된 단백질 제제가 가지는 효소 활성을 거의 또는 전혀 자극하지 않았다. 상기 NADH, Fe^{2+} , Mg^{2+} 및 FAD의 조합을 사용했을 때 가장 높은 활성을 획득하였다.

논의

슈도모나스 말토피리아 계통 DI-6 유래의 디캄바 O-디메틸라제는 3,6-디클로로살리실산(3,6-DCSA; 2-히드록시-3,6-디클로로벤조산)으로의 제조제 즉, 디캄바(2-메톡시-3,6-디클로로벤조산)의 변환에 관여하는 세가지 구성 성분의 옥시게나제(Wang, X-Z (1996) Ph.D.thesis, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE)이다. 상기 세가지 구성 성분의 각각을 균질하거나 또는 거의 균질한 상태로 분리하도록 하는 정제 단계가 고안되어 있다.

상기 세가지 구성 성분의 초기 분리는 페닐-세파로스 컬럼 상에서의 크로마토그래피에 의하여 달성하였다. 부분적으로 정제된 구성 성분의 효소적 활성 및 기타 특징화는 상기 구성 성분을 환원 효소, 페레독신 및 옥시게나제로서 잠정적인 동정 - 이전에 많이 연구된 헴-함유 및 헴-비함유 다성분 옥시게나제에서 발견되는 것과 유사한 구성임(Batie, et al.(1992) pages 543-565, *In F. Muller(ed.), Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, vol. III, CRC Press, Boca Raton; Harayama, et al.(1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :565-601; Mason and Cammack(1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :277-305; Rosche et al.(1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1252** :177-179) - 을 가능하게 하였다. 상기 페닐-세파로스 컬럼으로부터 분리된 상기 구성 성분 III은 시토크롬 c 및 염료 DCIP 둘 다의 NADH-의존 환원을 촉매하였다. 또한, 상기 구성 성분 I 및 구성 성분 II와 조합하였을 때 3,6-DCSA로의 디캄바의 변환을 보조하는 능력은 시토크롬 c 환원 효소에 의해 부분적으로 대체될 수 있었다. 상기 구성 성분 II는 상기 구성 성분 I 및 구성 성분 III을 함유하는 반응에 클로스트리디움 파스텔리아눔 유래의 페레독신을 첨가함으로써 대체될 수 있었다. 상기 O-디메틸화 반응을 보조하는 산소 분자가 절대적으로 요구됨은, 나머지 구성 성분이 옥시게나제임을 나타낸다.

옥시게나제 DIC . 옥시게나제 DIC 로 지정된 디캄바 O-디메틸라제의 구성 성분 I을 균질하게 정제하였고, N-말단 아미노산 서열 분석을 실시하였다. 분석된 29개의 아미노산 잔기의 서열은 다양한 데이터 은행의 다른 단백질 서열과 어떤 뚜렷한 상동성도 나타내지 않았다. 그러나, 이러한 아미노산 서열로부터 획득한 정보는 구성 성분 I의 유전자를 검출하고 클론화하는데 성공적으로 사용되는 유추 올리고뉴클레오티드 프로브(degenerate oligonucleotide probes)의 설계를 가능하게 한다(실시예2 참조). 또한, 상기 데이터 베이스에서의 단백질 서열에서 유래된 아미노산 서열과 이러한 클론의 상기 뉴클레오타이드 서열에서 유래된 아미노산 서열의 비교는 다른 옥시게나제에 대한 강력한 상동성을 보여주었다(실시예2 참조).

SDS-폴리아크릴아미드 겔에서의 이동으로부터 측정한 옥시게나제 DIC 의 겔보기 분자량은 약 40,000 달톤이다. 옥시게나제의 정제된 제제는 쿠마시 블루로 염색한 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 단지 하나의 주요 밴드를 나타내었고, 상기 밴드에 함유된 단백질의 에드만 분해는 단지 한 종의 N-말단의 존재를 나타내었다. 크기 배제 컬럼 상에서 천연의 옥시게나제 DIC 의 행태로부터 유래한 측정, 약 90,000 달톤의 분자 크기를 나타내었다. 이러한 모든 결과는 천연의 옥시게나제가 호모다имер(homodimer)로서 존재함을 나타낸다.

다수의 다성분 체계의 옥시게나제/히드록실라제 구성 성분은 $(\alpha \beta)_n$ -형태의 서브 유닛 배열로 구성되어 있고, 이 배열에서 보다 큰 α 서브 유닛은 분자량이 약 50,000 달톤의 크기이며, 보다 작은 β 서브 유닛은 분자량이 약 20,000 달톤의 크기이다(Harayama, et al.(1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :565-601). 이와는 대조적으로, 상기 디캄바 O-디메틸라제의 옥시게나제 구성 성분은 천연의 상태에서 다имер로서 존재할 수 있고, 단일 서브 유닛이 약 40 kDa의 분자량을 가지는 것으로 나타난다. $(\alpha)_n$ -형태의 서브 유닛 배열은 슈도모나스 sp. 계통 CBS 유래의 4-클로로페닐 아세테이트 3,4-디옥시게나제(Markus, et al.(1986) *J. Biol. Chem.* **261** :12883-12888), 슈도모나스 세파시아 유래의 프탈레이트 디옥시게나제(Batie, et al.(1987) *J. Biol. Chem.* **262** :1510-1518), 코마모나스 테스토스테로니 유래의 4-설폰벤조에이트 3,4-디옥시게나제(Locher, et al.(1991) *Biochem. J.* , **274** :833-842), 슈도모나스 푸티

다 86(*Pseudomonas putida* 86) 유래의 2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린 8-모노옥시게나제(Rosche et al.(1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1252** :177-179), 슈도모나스 슈도알칼리게네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 유래의 4-카르복시디페닐 에테르 디옥시게나제(Dehmel, et al.(1995) *Arch. Microbiol.* **163** :35-41), 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 3-클로로벤조에이트 3,4-디옥시게나제(Nakatsu, et al.(1995) *Microbiology* (Reading) **141** :485-495)와 같이 잘 특징화된 기타의 옥시게나제에서 발견되는 것과 유사하다.

페레독신_{DIC} . 디캄바 O-디메틸라제의 구성 성분 II (페레독신_{DIC})를 컬럼 크로마토그래피와 IEF의 여러 단계들로 정제하였다. SDS-PAGE에 의한 최종 정제는 단백질($M_r \sim 28,000$)의 하나의 주요 밴드 및 보다 가벼운 단백질의 번짐을 나타내었다.

약 28,000 달톤의 겔보기 분자량을 가지는 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 이러한 아미노산 서열은 유추 올리고뉴클레오타이드 프로브의 조제를 가능하게 하고, 상기 프루브를 이러한 단백질을 코딩하는 유전적 클론을 분리하는데 사용하였다. 이러한 클론에 의해 생산된 단백질은 페레독신(페레독신_{28kDa})이었지만, 이어서 디캄바 O-디메틸라제의 다른 두 구성 성분과 조합하였을 때 디캄바의 분해에 있어서 활성을 나타내지 않음이 판정되었다(데이터는 나타내지 않음).

또다른 증거가 페레독신_{28kDa} 이 디캄바 O-디메틸라제의 페레독신 구성 성분이 아니라는 결론을 지지한다. 첫째, 이들 단백질의 분자량(28 kDa)은 박테리아 유래의 다중 구성 성분인 옥시게나제에서 발견되는 다른 페레독신의 분자량(즉, 8-13 kDa)에 비해 현저하게 크다(Batie, et al.(1992) pages 543-565, *In F. Muller(ed.), Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, vol. III, CRC Press, Boca Raton; Harayama, et al.(1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :565-601).

둘째, 유전학 컴퓨팅 그룹(Genetics Computing Group; GCG) 소프트웨어 패키지(University of Wisconsin, Madison, WI)를 사용하여 페레독신_{28kDa} 으로부터 수득한 20개의 아미노산 잔기의 N-말단 서열을 다양한 단백질 데이터뱅크의 다른 아미노산 서열과 비교하였을때, 다수의 박테리아 페레독신 디클러스터(dicluster)(슈도모나스 스투제리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 로도박터 캡슐라터스(*Rhodobacter capsulatus*) 및 아조토박터 비넬란디(*Azotobacter vinelandii*) 유래의 것)에 대한 강력한 상동성(페레독신_{28kDa}의 N-말단 서열과 가장 비슷한 것은 80-85%의 동일성)을 나타내었다. 페레독신_{28kDa}에 대해 강력한 상동성을 나타내는 네 개의 디클러스터 페레독신은 단백질의 N-말단에 [3Fe-4S] 클러스터와 이것을 뒤따르는 [4Fe-4S] 클러스터를 가진다. 이것은 페레독신_{28kDa}이 헴-비함유 다중 구성 성분 옥시게나제와 일반적으로 연관이 있는 [2Fe-2S] 클러스터를 가지는 페레독신 구성 성분과 명백하게 다르다는 것을 나타낸다(Harayama, et al.(1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :565-601; Mason and Cammack (1992) *Annu. Rev. Microbiol.* **46** :277-305; Rosche, et al.(1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1252** :177-179).

환원효소_{DIC} . 디캄바 O-디메틸라제의 구성 성분 III(환원 효소_{DIC}로 지정)은 세 가지의 구성 성분 중에서 가장 정제하기 어려운 것이었다. 그것은 DI-6 계통의 용해물에서 그것의 명백한 불안정성 및 낮은 함량에 부분적으로 기인한다. 그럼에도 불구하고, 잠정적으로 분자량 45,000 달톤이 할당된 충분한 단백질을 정제하였다. 이것은 크기 배제 크로마토그래피로부터 수득한 약 50,000 달톤의 분자량과 유사하고, 환원 효소_{DIC}가 천연에서 모노머로서 존재함을 나타낸다. 상기 환원 효소 구성 성분의 정제는, 정제된 환원 효소 제제들이 모노 Q 컬럼 및 IEF 상에서의 크로마토그래피에 의해 명백하게 구별되는 pI 값들을 가지는 두 개의 활성으로 나뉘어진다는 사실에 의해 보다 복잡해졌다. 모노 Q 컬럼으로부터의 분획 둘 다는 정제된 상기 페레독신_{DIC} 및 옥시게나제_{DIC}와 함께 조합되어 디캄바 O-디메틸라제의 활성을 나타내는데 작용하였다. 상기 세 가지의 구성 성분을 가지는 디벤조퓨란 4,4a-디옥시게나제에서 환원 효소 구성 성분과 동일한 작용을 하는 두 개의 유사한 플라보 단백질(flavoproteins)이 스팅고모나스 sp.(*Sphingomonas* sp.) RW1 계통에 존재하는 것은, 빈즈 및 쿡에 의하여 최근에 보고되었다(Bunz and Cook (1993) *J. Bacteriol.* **175** :6467-6475). 흥미롭게도, 둘 다의 환원 효소는 분자량이 44,000 달톤으로서, 45,000 달톤인 환원 효소_{DIC}의 분자량과 매우 유사하였다. 또한, 이소일렉트릭 포커싱 기술에 의해 레그헤모글로빈(leghemoglobin) 환원 효소의 다중 구성 성분이 루핀의 뿌리 마디(lupin root nodules)에서 관찰되었다(Topunov, et al.(1982) *Biokhimiya* (English edition) **162** :378-379). 이 경우, IEF는 NADH-의존 환원 효소 활성을 가지는 네 가지의 별개의 구성 성분들을 밝혀내었다. DI-6 계통에서 단지 하나의 환원 효소_{DIC}가 두 개의 형태로 존재하는지 아니면 두 개의 구별되는 환원 효소들로 존재하는지에 대한 물음의 답을 찾는 것은, 보다 많은 양의 상기 단백질을 분리해내는 개선된 과정을 개발하고/또는 포함하는 유전자를 클로닝하고 서열을 분석하는 것에 달려있을 것이다(실시예3 및 5참조).

디캄바 O-디메틸라제의 특성. 상기에서 언급한 각 구성 성분들의 물리적 및 생화학적 성질에 더하여, 효소 활성 분석은 상기 O-디메틸라제 시스템이 기질에 대해 $K_m \sim 10 \mu M$ 의 강력한 친화성을 가지고, 약 100-110nmol/min/mg의 V_{max} 를 가진다는 것을 나타내었다. 온화한 기후 지역에서 수집한 토양 박테리아에 대하여 예상되는 바와 같이, 최대의 효소 활성은 30°C 부근의 온도에서 관찰되었다. 상기 효소 시스템에 대한 최적 pH는 pH 6.5에서 pH 7.5까지의 범위였지만, 주어진 효소의 제제로 측정된 활성은 채택한 pH 완충 용액 시스템의 형태에 크게 영향을 받았다. 트리스 완충 용액의 존재하에서의 활성은 동일한 pH의 포스페이트 완충 용액의 존재하에서의 활성에 비해 적어도 40%가 낮았다.

디캄바 O-디메틸라제의 세 가지의 구성 성분에 의해 촉매되는 반응에 대한 반응 모식도를 도1에 나타낸다. NADH로부터의 전자는 환원 효소와 페레독신으로 이루어지는 짧은 전자 사슬을 통해 디캄바의 산화를 촉매하는 말단 옥시게나제로 왕복적으로 수송된다. 디캄바 O-디메틸라제와 다수의 다중 구성 성분 옥시게나제 사이의 유사성은 상기 디캄바 O-디메틸라제가 숨겨진 디옥시게나제의 활성을 잠재적으로 가질 수 있다는 것을 제시한다. 그러나, 이러한 효소가 O₂를 분열시켜 하나의 산소 원자를 주요 기질에 병합시키고, 또 다른 산소 원자를 α-케토글루타레이트와 같은 작은 유기 기질에 병합키는 디옥시게나제의 계열에 속하지 않는다는 것은 분명하다(Fukumori and Hausinger(1993) *J. Biol. Chem.* **268** :24311-24317). 실제로, 고도로 정제된 환원 효소_{DIC}, 페레독신_{DIC} 및 옥시게나제_{DIC}의 조합은 활성을 위하여 단지 O₂, NADH, Mg²⁺, Fe²⁺ 및 디캄바 만을 필요로 한다.

실시예 2: 슈도모나스 말토피리아 DI-6의 디캄바 O-디메틸라제의 옥시게나제를 코딩하는 클론의 동정 및 서열 분석

실시예 1에서 언급한 바와 같이, 옥시게나제_{DIC}의 N-말단 아미노산 서열의 최초 29개 아미노산은 하기와 같이 결정되었다(괄호 안의 잔기는 최상의 추측에 의한 것이다).

Thr Phe Val Arg **Asn Ala Trp Tyr Val Ala** Ala Leu Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp (Asp 또는 Thr) (Pro)

[서열번호 1]

상기 서열은 캐나다, 알라메다 주재의 오페론(Operon, Alameda, CA)에 의해 합성된 유추 올리고뉴클레오타이드 프로브의 설계를 가능하게 하였다. 특히, 상기에 굵은 글씨로 강조한 아미노산 서열을 엔코딩할 수 있는 가능한 뉴클레오타이드 서열을 모두 함유하는, 각각의 길이가 17 뉴클레오타이드인 32개의 프로브의 혼합물을 사용하였다. 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 인디애나주 인디애나폴리스 주재의 베링거맨하임(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)에 의해 제공된 설명서에 따라 디곡시게닌(digoxigenin; DIG)으로 3'-말단이 표지된 것이다.

상기 DIG-표지 프로브는 먼저 제한 효소의 다양한 조합으로 잘라둔 P. 말토피리아 DI-6 게놈 DNA에 병합되었고, 1%의 아가로스 겔 상에서 분해된 후, 나일론 필터에 블랏팅되었다. 이러한 결과에 기초하여, 크기별로 분별한 게놈 라이브러리를 pBluescript II KS+ 벡터 내에 맞추어 넣고, 대장균 DH5α 수용 세포를 형질 전환시켰다. 상기 게놈 라이브러리는 1-2kb의 *Xho I/Hind III* 단편을 포함하였다. 상기 DIG-표지 올리고뉴클레오타이드 프로브는 나일론 필터 상에 줄무늬를 이룬 박테리아 콜로니의 배열에 병합되었다. 양성 반응을 보이는 콜로니들로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 하부 클론화(subcloned)하였다. 각 하부 클론의 모든 가닥(strands)을 네브라스카-링컨 대학(University of Nebraska-Lincoln)에서 DNA 서열 분석 장비를 사용하여 서열 분석하였다. 상기 DIG-표지 프로브의 병합 및 검출은 베링거맨하임에서 제공된 설명서에 따라 행하였다.

옥시게나제_{DIC}를 코딩하는 게놈 DNA 클론을 동정하였다. 전체 옥시게나제_{DIC}로 추론된 아미노산 서열과 뉴클레오타이드 서열을 하기 서열 목록에 각각 서열 번호 2 및 서열 번호 3으로 나타내었다.

이러한 클론의 뉴클레오타이드로부터 유래된 아미노산 서열을 스위스 단백질 데이터베이스 내 단백질의 아미노산 서열과 비교할 경우, 다른 옥시게나제에 대해 상동성을 나타내었다. 상동성은 GCG 소프트웨어 패키지의 FASTA 프로그램을 사용하여 결정하였다. 가장 강력한 상동성은 슈도모나스 sp. ATCC 계통 19151에서 유래한 바닐레이트 디메틸라제(vanillate demethylase)의 옥시게나제 구성 성분에 대한 것이었고, 33.8%의 동일성을 나타냈다.

실시예 3: 슈도모나스 말토피리아 DI-6의 디캄바 O-디메틸라제의 다른 구성 성분의 동정 및 특징화

박테리아 배양 및 처리된 세포 용해물의 제작. 슈도모나스 말토피리아 DI-6 계통을, 탄소원으로서 글루코스(2.0mg/ml) 및 코사미드산(2.0mg/ml)을 보충한 1ℓ의 환원 염화물 배지(Kreuger, J. P. 1989. Ph. D. thesis. Illinois Institute of Technology, Chicago)를 함유하는 6개의 2ℓ용 삼각 플라스크에 주입하였다. 배양균을 오비탈 셰이커(orbital shaker, 225rpm, 30°C)에서 배양하고, Beckman Avanti J-25i 원심분리기 내의 JLA-10.500 로터를 20분 동안 4,000 ×g로 사용하여, A₆₀₀의 범위가 1.5에서 2.0이 되었을 때 세포를 수득하였다. 펠릿화된 세포를 -80°C에 저장하였다. 냉동된 세포를 40ml의 100mM MgCl₂에 재현탁하고, 상기와 같은 조건을 사용하여 다시 펠릿화한 후, 분리 완충 용액(breaking buffer, pH 7.2의 100mM 3-[N-모르폴리노]프로판술폰산(MOPS), 1mM 디티오프레아이드, 5% 글리세롤)에 세포 습윤 중량(wet weight) g 당 분리 완충 용액이 2ml의 비율이 되도록 재현탁하였다. 박테리아 추출물에 대해 세포 습윤 중량 20g 당 5ml의 비율로 행하는 Protease Inhibitor Cocktail(Sigma, P 8465)에 따라, 라이소자임을 세포 g 당 80μl의 비율로 첨가하였다. 마지막으로, 페닐메틸설포닐 플루오라이드(100% 에탄올 중의 0.1M 저장 용액)를 상기 분리 완충 용액 50ml 당 250μl의 비율로 첨가하였다. 초음파 파쇄기(Sonics and Materials Inc., Model VC X 600)로 9.0초 동안 자극을 주고, 3.0초 동안 정지시키면서 50%의 진폭으로 30분 동안 상기 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 4°C에서 Beckman Avanti J-25i 원심분리기의 JA-25.50 로터를 사용하여 56,000 ×g의 속도로 75분 동안 원심분리하였다. 상청액(처리된 세포 용해물)을 따라내고, -80°C에 저장하기 이전에, 최종 농도가 15%가 될 때

까지 글리세롤을 첨가하였다.

디캄바 O-디메틸라제 구성 성분의 초기 정제. 약 2.7g의 단백질을 함유하는 처리된 세포 용해물의 하부 분획을 50mM MOPS(pH 7.2), 1mM 디티오프레이톨 및 15%(v/v) 글리세롤(완충 용액 A)로 평형화시킨 25mL의 DEAE-세파로스(Fast Flow)를 함유하는 팔마시아사 제 XK 26/60 컬럼에 가하였다. 상기 컬럼을 Bio-CAD Perfusion Chromatography Workstation(USDA NRICGP Grant # 9504266)에 접속시키고, 5.0mL/min의 유속으로 흘려보냈다. 상기 컬럼이 적재된 후, 280nm에서의 흡광도 판독이 0.1 아래로 감소될 때까지 완충 용액 A로 세정하였다. 이러한 조건 하에서 상기 디캄바 O-디메틸라제의 모든 세 가지의 구성 성분은 상기 DEAE 컬럼에 결합되었다. 상기 컬럼을 완충 용액 A 중에서 0에서 500mM NaCl의 직선 기울기로 전개시켰다. 이에 의해, 400mM NaCl에서는 페레독신이 용출되었고, 250mM NaCl에서는 환원 효소와 옥시게나제가 동시에 용출되었다.

페레독신_{DIC}의 정제. 상기 DEAE-세파로스 컬럼에서 용출된 페레독신_{DIC}를 함유하는 분획을 풀화하고, 완충 용액을 50mM MOPS(pH 7.2), 5% 글리세롤(v/v) 및 200mM NaCl(완충 용액 B)로 교체하였다. 이어서, YM 10 막을 가지는 아미콘 세포 농축기(Amicon Cell Concentrator)를 사용하여 그것을 약 2mL까지 농축시켰다. 이어서, 이러한 시료를 완충 용액 B로 평형화시킨 미리 패키징된 Pharmacia사 제의 HiPrep 26/60 세파크릴 S-100 컬럼에 가하고, Pharmacia사 제의 FPLC 장치에 0.5mL/min의 유속으로 흘려보냈다. 활성을 나타내는 분획을 풀화하고, 완충 용액을 50mM MOPS(pH 7.2), 1mM 디티오프레이톨 및 5% 글리세롤(v/v)(완충 용액 C)로 교체하였다. 상기 분획을 약 2mL까지 농축시킨 후, 완충 용액 C로 평형화시킨 Pharmacia사 제의 모노 Q HR 5/5 컬럼에 적재하였다. 상기 컬럼을 완충 용액 C 중에서 0~2.0M NaCl의 직선 기울기로 전개시켰다. 페레독신의 활성을 함유하는 분획을 단백질의 함량에 대해 분석하고, -80°C에 저장하였다.

환원 효소_{DIC}의 정제. 상기 옥시게나제/환원 효소 구성 성분을 함유하는 초기 DEAE-세파로스 컬럼으로부터의 분획을 풀화하고, 최종 농도가 1.5M이 될 때까지 황산 암모늄을 첨가하였다. 1.5시간 동안 4°C에서 배양한 후, 상기 시료를 Beckman Avanti J-25I 원심분리기의 JA-20.50 로터를 사용하여, 4°C에서 56,000 ×g로 75분 동안 원심분리하였다. 상청액을 따라내고, 25mL의 페닐-세파로스 6 Fast Flow(high sub)를 함유하는 Pharmacia사 제의 XK 26/20 컬럼 상에 그것을 5.0mL/min의 유속으로 적재하였다. 이때 상기 페닐-세파로스 6 Fast Flow는 1.5M (NH₄)₂SO₄를 함유하는 완충 용액 A에 의해 평형화된 것이다. 상기 환원 효소의 구성 성분을 함유하는 분획을 풀화하고, 완충 용액을 완충 용액 B로 교체한 후, YM30 막을 가지는 Amicon 농축기 및 Centricon 10 농축기를 사용하여 약 2mL까지 농축시켰다. 상기 2mL의 시료를 완충 용액 B로 평형화된 미리 패키징된 Pharmacia사 제의 HiPrep 26/60 세파크릴 S-100 컬럼에 가하고, 0.5mL/min으로 흘려보냈다. 환원 효소의 활성을 함유하는 분획을 풀화하고, 완충 용액을 완충 용액 C로 교체한 후, 약 2mL까지 농축시켰다. 상기 2mL의 시료를 완충 용액 C로 평형화시킨 미리 패키징된 Pharmacia사 제의 모노 Q HR 5/5 컬럼에 적재하였다. 상기 컬럼을 완충 용액 C 중에서 0.5mL/min의 유속 및 0~2.0M NaCl의 직선 기울기로 전개시켰다. 환원 효소의 활성을 나타내는 분획을 단백질 함량에 대해 분석하고, -80°C에 저장하였다.

급속 효소 분석. 세 가지의 각각의 구성 성분에 대한 활성은, ¹⁴C가 표지된 디캄바를 사용하여 나머지 두 가지의 구성 성분을 과잉으로 함유하는 반응 중에 모니터링하였다. 각각의 반응에 대하여, pH 7.0의 24mM 칼륨 포스페이트(KP_i) 완충제, 0.48mM의 NADH, 0.48mM의 FeSO₄ 및 9.6mM의 MgCl₂로 이루어진 완충 용액을, 30μL의 마스터 혼합물(master mix, 562.4μL의 멸균수, 12.0μL의 50mM 디캄바 및 25.6μL의 ¹⁴C-디캄바 저장 용액[1.28μCi])을 함유하는 200μL의 단백질 시료에 첨가하여, 311μL의 총 부피를 가지고, 4.12μCi/mL의 ¹⁴C-디캄바 특이 활성을 가지도록 하였다. 60분 후에 50μL의 5% H₂SO₄ (v/v) 및 500μL의 에테르를 첨가하여 각 반응을 종료시켰다. 반응 튜브를 볼텍스 처리하고, 마이크로퓨즈(microfuge, Eppendorf, Model 5415C) 내에서 2분 동안 14,000 ×g로 원심 분리하였다. 효소 활성의 빠른 관능 검사(visual appraisal)를 위하여, 각 반응 튜브를 포켓용 UV 광(Fotodyne Inc., Model 3-6000) 하에 두고 반응 산물인 DCSA의 형광을 검출하였다. 효소의 활성을 보다 정확하고 반 정량적(semi-quantitative)으로 측정하기 위해서, 실시예1에서 설명하는 바와 같이, 얇은 막 크로마토그래피를 사용하여 반응 산물을 분리시켰다.

단백질 농도의 결정. 브래드포드 분석(Bradford assay, 표준 프로토콜; Bio-Rad; 실시예1 참조)을 사용하여, 상기 정제 과정의 상이한 단계에서 수득한 각 분획에 대한 단백질 농도를 분석하였다.

실시예4: 페레독신_{DIC}를 코딩하는 클론의 동정 및 서열 분석

상기 정제(실시예3에서 언급한 정제)된 페레독신 단백질로부터 수득한 N-말단 서열은 29개의 아미노산 길이를 가진다(단백질의 서열 분석은 네브라스카-링컨 대학에서 표준 에드만 분해 과정에 따라 Protein Core Facility를 사용하여 행하였다; 실시예1 참조). 유전자 은행(Genbank) 데이터베이스에 대한 상기 서열의 비교에 의하면, 슈도모나스 sp. 유래의 테르프레독신(terpredoxin)인 아드레노독신(adrenodoxin) 과에 속하는 박테리아 [2Fe-2S] 페레독신과 26개의 아미노산에서 35%의 동일성을 나타내었다. 상기 서열 정보는 세 개의 유추 올리고뉴클레오타이드 프라이머(두 개는 전방향 프라이머, 한 개는 역방향 프라이머)를 설계 하는데 사용하였다. 두 개의 17 전방향 프라이머의 서열은 상기 정제된 페레독신 단백질로부터 수득한 N-말단 아미노산 서열을 기초로 한 것이다. 상기 17 역방향 프라이머의 서열은 미리 서열 분석된 박테리아의 아드레노독신-타입의 6개의 페레독신의 C-말단에 가까운 6개의 아미노산 보존

서열을 기초로 한 것이다. 상기 프라이머를 맞춤 PCR(nested PCR) 반응에 사용하여, 전체 P. 말토피리아 DNA 유래의 191bp 산물을 증폭시켰다. 상기 산물을 pGEM-T Easy 벡터(Promega사 제, Madison, WI) 내에 클론화시키고, 서열을 분석하였다. DNA 서열 분석은 네브라스카-링컨 대학에서 표준 디데옥시-중재 사슬 종결 과정(dideoxy-mediated chain termination procedure)을 사용하여 DNA Sequencing Core Facility로 행하였다. 이러한 클론에서 추정되는 아미노산 서열의 분석에 의해, 그것이 상기 정제된 페레독신 단백질로부터 이미 얻은 N-말단 및 내부 아미노산 서열과 대등하다는 것이 확인되었다. 또한, 유도된 아미노산 서열은 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*) 유래의 [2Fe-2S] 페레독신이 가지는 전체 길이에 대해 48%의 동일성을 가진다. 상기 클론화된 단편을 표준 PCR 프로토콜(DIG/Genius 시스템 사용자 가이드)에 따라 디곡시게닌(DIG, Roche Diagnostics)으로 표지하고, 다수의 제한 효소로 잘라둔 총 P.말토피리아 DNA에 대해 서던 블랏(Southern blot)으로 병합시켰다. 유전자 주변의 제한 효소 절단 부위 지도는 상기 프루브가 병합되는 제한 단편의 크기를 기초로 하여 구축하였다. 이러한 초기 실험은 상기 유전자가 약 1kb의 길이를 가지는 *Xho* I / *Pst* I 단편 상에 포함되어 있음을 나타내었다. 이어서, 전체 P. 말토피리아 DNA를 *Xho* I 및 *Pst* I 로 자르고, 상기 제한 단편을 겔 상에 분해시켰다. 길이가 0.5 및 1.5kb 사이인 단편을 겔에서 잘라내고 pBluescript II KS+(Stratagene, Inc.) 벡터에 연결시켜, DH5 α 세포(Gibco BRL, Inc.)를 형질 전환시켰다. 크기-분별 라이브리리를 함유하는 박테리아 콜로니를 DIG-표지 프루브로 스크리닝하여, 900bp *Xho* I / *Pst* I 단편을 동정하였다. 서열 분석은 이들 클론이 105개의 아미노산 잔기[서열 식별 번호: 5]로 이루어진 11.4kDa의 단백질을 엔코딩하는 총 길이 318bp의 페레독신 유전자[서열 식별 번호: 4]를 함유한다는 것을 나타내었다. 상기 클론화된 유전자에 의해 예상되는 아미노산 서열은 상기 정제된 페레독신 단백질로부터 이전에 수득된 N-말단 및 내부 아미노산 서열과 대등하였다. 또한, 상기 예상되는 아미노산 서열은 [2Fe-2S] 박테리아 페레독신의 아드레노독신 계열의 5가지 다른 군과 전체 길이에 걸쳐 상동성을 나타내었고, 그 범위는 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*) 유래의 페레독신과의 42% 동일성에서 슈도모나스 유래의 페레독신과의 35% 동일성까지에 이르렀다(실시예2 참조). 다른 3가지의 페레독신은 카울로박터 크레첸투스(*Caulobacter crescentus*), 로도코커스 에리트로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 것이다. 이러한 과에 속하는 단백질은 단일 2Fe-2S 철-황 클러스터와 결합하고, 3개의 보존 영역(conserved motifs)을 가진다. 영역1은 2Fe-2S 리간드인 3개의 보존 시스테인을 포함한다. 영역2는 음전하를 띠는 잔기의 클러스터를 포함한다. 영역3은 2Fe-2S 클러스터의 4개의 보존 시스테인을 포함한다.

실시예5: 환원 효소 _{DIC} 를 코딩하는 클론의 동정 및 서열 분석

상기 페레독신 유전자를 클론화하는 실시예4에서 사용했던 동일한 방법으로 2개의 환원 효소 유전자를 클론화하였다. 상기 정제(실시예3에서 언급한 정제)된 환원 효소 단백질로부터 수득한 N-말단 서열은 25개의 아미노산 서열의 길이였다. 상기 서열을 유전자 은행 데이터베이스에서 비교해 보았을때, 스팅고모나스 sp.(*Sphingomonas sp.*) RW1에서 이전에 분리된 세 가지 구성 성분 효소인 디옥신 디옥시게나제(dioxin dioxygenase)의 시토크롬 P450-타입의 환원 효소 구성 성분과 20개의 아미노산에서 90%의 동일성을 가지고 오버랩되는 것을 나타내었다. 또한, 10개의 아미노산 잔기의 내부 서열은 상기 정제된 단백질의 트립틱 분해물(tryptic digests)로부터 수득할 수 있다. 상기 내부 서열은 스팅고모나스 sp. RW1(*Sphingomonas sp.* RW1) 유래의 시토크롬 P450-타입 환원 효소의 62 내지 69 잔기와 87.5%의 동일성을 가졌다. 이러한 서열 정보는 3개의 유추 올리고뉴클레오타이드 프라이머(2개는 전방향 프라이머, 1개는 역방향 프라이머)를 설계하는데 사용되었다. 상기 2개의 17 전방향 프라이머의 서열은 N-말단 아미노산 서열을 기초로 한 것이고, 17 역방향 프라이머의 서열은 내부 아미노산 서열을 기초로 한 것이다. 상기 프라이머를 맞춤 PCR 반응에 사용하여 전체 P. 말토피리아 DNA 유래의 180bp 산물을 증폭시켰다. 상기 산물을 pGEM-T Easy 벡터에 클론화시켜 서열을 분석하였다. 이러한 클론에서 예상되는 아미노산 서열의 분석에 의해, 그것은 상기 정제된 환원 효소 단백질로부터 획득한 N-말단 및 내부 아미노산 서열과 대등한 단백질을 엔코딩하는 것임이 확인되었다. 또한, 예상되는 서열은 스팅고모나스 sp. RW1(*Sphingomonas sp.* RW1)에서 유래한 디옥신 디옥시게나제의 시토크롬 P-450형 환원 효소 구성 성분의 전체 길이에 대해 80%의 상동성을 가졌다.

상기 클론화된 단편을 DIG로 표지화하고, 다수의 제한 효소로 잘라둔 전체 P. 말토피리아 DNA에 대해 서던 블랏으로 병합시켰다. 상기 서던 블랏은 상기 DIG-표지 프루브가 P. 말토피리아의 전체 DNA의 다양한 제한 효소 분해물에서 두개의 구분되는 위치를 인식한다는 것을 나타내었다. 이러한 관찰에 의해, P. 말토피리아 게놈 내의 다른 위치에 두 개의 환원 효소 유전자가 존재한다는 것이 제안된다. 상기 두 개의 유전자는 동일한 환원 효소 단백질을 엔코딩하는 동일한 복제물일 수 있다. 또한, 상기 유전자 중 하나가 본 발명의 디카바 O-디메틸라제 분석에서 낮은 활성을 가지는 완전한 길이의 단백질이나 또는 활성이 없는 절단된 단백질을 엔코딩하는 것일 수도 있다. 그것은 최적 활성을 가지는 단백질을 엔코딩하는 유전자를 클론화하는데 필요하기 때문에, 상기 DIG-표지 프루브를 둘 다의 환원 효소의 유전자를 발견하는데 사용하였다.

전체 P. 말토피리아 DNA를 *Kpn* I 및 *EcoR* I 으로 분해한 경우, 상기 DIG-표지 프루브는 약 4.0kb 길이의 하나의 제한 단편 및 약 20kb 크기를 가지는 또다른 보다 큰 단편에 병합하였다. 4.0kb의 *Kpn* I / *EcoR* I 단편 상에 위치하는 유전자 주변의 다수의 제한 효소 절단 부위 지도는 상기 프루브에 의해 병합되는 다른 제한 단편의 크기를 기초로 하여 구축하였다. 상기 제한 효소 지도는 상기 전체 유전자가 이 4.0kb의 단편 상에 위치해야 함을 나타내었다. 이어서, 전체 P. 말토피리아 DNA를 *Kpn* I 및 *EcoR* I 으로 자르고, 상기 제한 단편을 겔 상에 분해시켰다. 길이가 3.0 및 5.0kb 사이인 단편을 겔에서 잘라내고 pBluescript II KS+ 벡터에 연결시켜, DH5 α 세포를 형질 전환시켰다. 크기-

분별 라이브러리를 함유하는 박테리아 콜로니를 DIG-표지 프루브로 스크리닝하여, 4.3kb의 *Kpn* I / *EcoR* I 단편을 동정하였다. 서열 분석은 이들 클론이 408개의 아미노산[서열 식별 번호: 7]으로 이루어진 43.7kDa의 단백질을 엔코딩하는 완전한 길이의 1224bp 환원 효소 유전자[서열 식별 번호: 6]를 함유한다는 것을 나타내었다. 상기 클론화된 유전자에 의해 예상되는 아미노산 서열은 상기 정제된 페레독신 단백질로부터 이전에 수득된 N-말단 및 내부 아미노산 서열과 대등하였다. 또한, 상기 예상되는 아미노산 서열은 적어도 네개의 다른 FAD-의존 피리딘 뉴클레오티드 환원 효소와 전체 길이에 걸쳐 상동성을 나타내었고, 그 범위는 스팅고모나스 sp. RW1(*Sphingomonas* sp. RW1)로부터 유래한 디옥신 디옥시게나제의 시토크롬 P450형 환원 효소의 구성 성분과 69%의 동일성을 가지는 것으로부터 슈도모나스 종 유래의 테르프레독신(terpredoxin) 환원 효소와 36%의 동일성을 가지는 것에까지 이른다(실시예3 참조). FAD-의존 피리딘 뉴클레오티드 환원 효소 과에 속하는 단백질은 5개의 보존 영역을 가진다. 영역1 및 3은 세개의 보존 글리신 잔기를 함유하고, 각각 FAD와 NAD(P)에 대한 ADP 결합 부위에 대응한다. 영역5는 상기 FAD 플라빈의 일부(1/2)와 결합하는 부위에 대응한다.

제2의 유전자를 클론화하기 위하여, 전체 P. 말토피리아 DNA를 *Kpn* I 및 *EcoR* I으로 자르고, 결과물인 제한 단편을 아가로스 겔 상에 분해시켰다. 약 20kb의 크기를 가지는 단편을 상기 겔에서 잘라내고, 다수의 제한 효소로 자른 후, DIG- 표지 프루브를 서던 블랏으로 병합시켰다. 제2 유전자 주변의 제한 효소 절단 부위 지도는 상기 프루브가 병합되는 제한 단편의 크기를 기초로하여 구축하였다. 이러한 실험들은 완전한 길이의 제2 환원 효소 유전자가 약 3.0kb의 길이를 가지는 *Apa* I 단편 상에 포함되어 있음을 보여주었다. 이어서, 전체 P. 말토피리아 DNA를 *Apa* I로 자르고, 상기 제한 단편을 겔 상에 분해시켰다. 길이가 2.0 및 4.0kb 사이인 단편을 겔에서 잘라내고 pBluescript II KS+에 연결시켜, DH5 α 세포를 형질 전환시켰다. 크기-분별 라이브러리를 함유하는 박테리아 콜로니를 DIG-표지 프루브로 스크리닝하여, 3.0kb의 *Apa* I 단편을 동정하였다. 서열 분석은 상기 3.0kb 클론이 1227bp의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 함유하고, 409개의 아미노산으로 이루어진 43.9kDa의 단백질을 엔코딩함을 나타내었다. 상기 제2 환원 효소 유전자에 의해 엔코딩된 상기 아미노산 서열은 제1 유전자의 서열과 거의 동일(98.8% 동일)하였다.

실시예 6: 식물의 형질 전환

디캄바 O-디메틸라제의 구성 성분을 엔코딩하는 상기 세개의 유전자를 각각 식물에서의 발현에 적합한 카세트(cassettes)에 개별적으로 위치시키기 위하여, 하기의 단계를 취하였다. PCR 증폭으로 상기 세개의 유전자가 각각 5' 말단에 *Nco* I 부위와 3' 말단에 *Xba* I 부위를 가지도록 올리고뉴클레오티드 프라이머를 설계하였다. 상기 PCR 결과물의 진정성을 서열 분석으로 확인한 후, 각 유전자를 개별적으로 pRTL2 벡터(네브라스카 소재 네브라스카 링컨 대학의 Plant Transformation Core Research Facility의 톰 클레멘트 박사에 의해 제공됨)로 클론화하였다. 상기 벡터는 5' 말단의 폴리 링커(polylinker)에 담배 에칭 바이러스(tobacco etch virus, TEV) 유래의 144bp의 번역 인핸서 서열(translation enhancer sequence)을 포함한다. 이어서, 각각 5' 번역 인핸서를 가지는 상기 옥시게나제, 환원 효소 및 페레독신 유전자를 *Xho* I / *Xba* I 단편으로서 pKLP36 식물 발현 벡터(켄터키 주재 렉싱턴의 켄터키 대학 Indu Maiti로부터 수득)로 개별적으로 클론화하였다(Maiti and Shepard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**:440-444(1998)). 이러한 2성분 벡터는, 식물에서의 연속적인 발현을 위한 복제된 인핸서 도메인 및 효과적인 전사의 종료를 위한 pea rbcS 3' 서열을 가지는 완전한 길이의 땅콩 백화 바이러스 프로모터(PCISV FLt36)를 포함한다(Maiti and Shepherd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**:440-444(1998)). 하나의 2성분 벡터에 상기 세개의 유전자를 모두 가진 구축물은, 여러개의 다른 순서 및 방향으로 상기 세 유전자를 조합함으로써 제작할 수 있다.

상기 옥시게나제, 페레독신 및 환원 효소의 구축물을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 각각 이동시키고, 각 구축물로 아라비도시스(*Arabidopsis*) 및 담배를 형질 전환시키기 위해, 하기와 같은 방법을 채택하였다. 상기 Plant Transformation Core Research Facility에서 일반적으로 사용되는 변형된 3중 근원 접합(triparental mating) 과정에 따라 상기 세개의 구축물을 A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 내로 이동시켰다. 여기에는 A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 세포와 각 구축물의 혼합물을 지닌 대장균, 및 플라스미드의 이동을 위한 보조 플라스미드 pRK2013를 지닌 대장균을 배양하는 단계가 포함된다. 이어서, 각 구축물을 포함하는 A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 세포를 Plant Transformation Core Research Facility의 보조 하에서 담배와 아라비도시스를 형질 전환시키는데 사용하였다. 담배에 대해서는, 각 구축물을 함유하는 A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 세포의 현탁액과 함께 잎 외식편(explants)을 배양하고, 카나마이신을 함유하는 고형 배지에서 지맥(shoots)을 재생시켰다(Horsch et al., *Science*, **227**:1229-1231(1985)). 담배를 형질 전환시키는 프로토콜의 상세한 설명은 하기와 같다.

담배 외식편의 제조:

1달 된 식물로부터 3-4 인치의 잎(상부 2 잎)을 선택하였다. 이것은 30-40개의 외식편의 제조에 충분하다. 상기 잎을 큰 비커에 놓고 20-30분 동안 dH₂O로 덮어두었다. 상기 물을 따라내고, 상기 잎을 10%의 Chlorox(상품명)에 Tween 20(상품명, 50ml 당 1 방울)을 더한 것으로 덮어두었다. 15분 동안 잎이 잠기도록 한 후, 무균 dH₂O로 3회 내지 5회 세정하였다. 잎의 끝 및 잎자루를 따라 잎의 가장자리를 잘라내고, 주맥(midrib)을 제거한 후, 나머지 조직을 0.5 × 0.5cm의 정사각형으로 분할하였다. 상기 외식편을 플레이트 당 30개씩, 배양 전 하루 동안, 굴대의 측면이 발생할 때 까지 미리 배양하였다.

아그로박테리움 접종물 제조:

적절한 항생제를 가한 YEP 배지(10g/ℓ의 펩톤, 10g/ℓ의 NaCl 및 5g/ℓ의 효모 추출액, pH 7.0)에 2mℓ의 아그로박테리움 배양액을 도입하였다. 상기 배양액은 포화되어도 된다. 상기 2mℓ의 배양액을 50mℓ의 YEP 배지에서 2차 배양하고, 28°C에서 지속적으로 교반하면서 6-8시간 동안 성장시켰다. 상기 세포를 원심 분리(3,000-4,000)로 회수하였다. 상기 박테리아의 펠렛을 최종 OD₆₆₀이 0.3-1.0이 되도록 공동-배양 배지에 재현탁시켰다.

제작된 아그로박테리움 접종물을 페트리 플레이트로 옮기고, 상기 미리 배양한 외식편을 30분 동안 접종시켰다. 상기 외식편을 무균의 필터 페이퍼에 블랏팅하고, 0.8%의 아가(agar)에 의해 고체화된 공동-배양 배지 상에 플레이트 당 10개의 외식편을 놓아두고, 그 위를 상기 무균 필터 페이퍼로 덮었다(공동-배양 외식편의 굴대의 측면이 발생). 상기 외식편을 3일 동안 공동-배양시켰다. 상기 공동-배양 기간 이후에, 상기 외식편을 재생 배지에서 간단히 세정하였다.

상기 세정된 외식편을 무균의 필터 페이퍼에 블랏팅하고, 상기 조직(플레이트 당 10개의 외식편)을 0.8%의 아가에 의해 고형화된, 적절한 선별제(카나마이신 150mg/ℓ)를 함유하는 재생 배지로 옮겼다. 상기 외식편을 굴대의 측면이 발생할 때까지 배양하였다. 상기 조직을 매 2주마다 신선한 재생 배지로 옮기고, 뿌리를 3cm보다 길게 잘라, 뿌리 배양 배지(rooting medium)에서 2차 배양하였다. 이어서, 상기 뿌리를 내린 지맥을 토양에 순응시켰다.

시약:

선행배양 배지(Preculture medium, PM) : 비타민 B5를 가지는 MS 염, 1mg/ℓ의 BAP를 함유하는 3% 수크로스, 0.1mg/ℓ의 NAA 및 8-μg/ℓ의 pCPA(p-클로로페녹시아세트산), pH 5.7(필터를 모든 성장 조절제로부터 멸균).

공동-배양 배지(Co-cultivation medium, CM) : 3%의 수크로스, 1.0mg/ℓ의 BAP, 0.1mg/ℓ의 NAA 및 8μg/ℓ의 pCAP를 함유하는 1/10 MS/B5 배지.

재생 배지(Regeneration medium, RM) : 1.0mg/ℓ의 BAP, 0.1mg/ℓ의 NAA 및 3%의 수크로스를 함유하는 pH 5.7의 MS/B5 배지. 항생제로서 카르베니실린(carbenicillin, 500mg/ℓ) 및 세프트락심(cefotaxime, 100mg/ℓ)을 사용.

뿌리 배양 배지(Rooting medium) : 0.1mg/ℓ의 NAA 및 1% 수크로스가 함유된, 완전한 길이의 B5 비타민을 가지는 MS 염. 0.8%의 아가로 배지를 고형화함. npt II를 75mg/ℓ 사용할 경우, 카르베니실린(500mg/ℓ) 및 세프트락심(100mg/ℓ)의 항생제로 유지시킴.

상기 세 개의 형질 전환 실험의 각각으로부터, 상기 지맥을 선택하고, 수 주 동안 뿌리 배양 배지에 둔 후, 온실 내의 용기로 이동시켰다. 아라비도시스에 대해, 꽃을 피운 식물이 담긴 용기를 각 추출물을 함유하는 A. 튜메파시엔스(*A. tumefaciens*) 현탁액에서 배양시킨 후, 상기 식물이 씨앗을 맺도록 하였다(Bechtold et al., *C. R. Acad. Sci. Paris. Science de la vie/Life Science*, **316**:1194-1199(1993); Clough and Bent, *Plant J.*, **16(6)**:735-743(1998)). 상기 씨앗을 회수하여 카나마이신을 함유하는 배지에서 싹트게 하였다. 어린 나무가 충분한 뿌리계를 가지도록 성장시킨 후, 각 형질 전환 실험으로부터 몇몇 식물을 선택하여 성장 챔버 내의 용기로 이동시켰다.

형질 전환된 식물에서의 각 유전자의 발현을 평가하기 위하여, 몇몇 형질 전환된 식물로부터의 잎 용해물에 대한 웨스턴 블랏(Western blots)을 준비하였고, 디카바 O-디메틸라제의 세 가지의 구성 성분을 검출하는 다클론 항체를 사용하여 탐침시켰다. 식물 추출물 내의 각 효소에 대한 효소 활성을 판단하기 위하여, 상기 옥시게나제, 페레독신 또는 환원 효소 단백질을 발현하는 형질 전환된 식물로부터 잎 용해물을 P. 말토피리아 DI-6 계통으로부터 정제한 과량의 다른 O-디메틸라제 구성 성분과 혼합하였다. 표준 14C-표지 디카바 분석(실시예 1 및 3 참조) 및 기질로서 HPLC 분석의 둘 다를 사용하여, 이들 혼합물을 디카바 O-디메틸라제의 활성에 대해 테스트하였다(디카바 및 3,6-DCSA는 HPLC의 다른 시점에서 용출되었고, 정량화될 수 있었다).

엽록체 부분에서의 유전자 산물의 발현을 테스트하기 위하여, 상기 옥시게나제, 페레독신 및 환원 효소 유전자의 5' 말단에 통과 펩티드 서열을 가지도록 구축물을 제작하였다. 그러한 접근 방법은 담배 식물에 설폰일유레아(sulfonylurea)계 제초제에 대한 내성을 부여하는데 있어 성공적이었다(O'Keefe et al., *Plant Physiol.*, 105:473-478(1994)). 보다 구체적으로, 완두콩 리볼로스 1,5-비스포스페이트 카르복실라제의 작은 하부 단위 통과 펩티드(신호) 서열(서열 식별 번호: 19로 나타난 핵산 서열)을 상기 옥시게나제, 페레독신 또는 환원 효소의 유전자를 함유하고, 자체적으로 각각 발현 제어 서열(상기 참조)을 가지는 매개 pRTL2 벡터에 유전학적으로 가공하였다. 이것은 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 PCR 프로토콜을 사용하여 상기 통과 펩티드의 양 말단에 Nco I 부위를 형성함으로써 수행되었다. 상기 Nco I 부위는 pRTL2 벡터의 TEV 선도 서열(leader sequence)과 상기 보고 유전자(reporter gene, 즉, 옥시게나제, 환원 효소 또는 페레독신)의 사이에 상기 통과 펩티드를 도입시키는 것을 용이하게 한다. 이어서, 상기 전체 카세트(상기 TEV 선도 서열, 상기 통과 펩티드 및 상기 보고 유전자)를 Xho I/Xba I 단편으로서 pRTL2 벡터로부터 잘라내어, PCISV FLt36 프로모터와 rbcS 3' 전사 종결 시그널(terminator)을 포함하는 2성분 벡터의 pKLP36에 도

입하였다.

상기 박테리아 페레독신 유전자의 코돈 사용(codon usage)이 식물 세포 내에서 효과적으로 번역되도록 충분히 최적화되지 않았음에 대한 가능성을 테스트하기 위하여, P. 말토피리아 DI-6 계통의 페레독신과 동일한 아미노산 서열을 엔코딩하지만 쌍떡잎 식물에 대해 최적화된 특정 코돈 선호도(codon bias)를 가지는 합성 페레독신 유전자를 Entelechon, GmbH(Regensburg, Germany)로 합성하였다. 코돈 사용에서의 변화는 식물 세포 내에서 박테리아의 B. t. 독성 유전자가 최적으로 발현하기 위해 필수적이라는 사실이 잘 문헌화되어있다(예를 들면, Diehn et al., *Genetic Engineering*, **18**:83-99(1996)).

실시예7: 식물에의 분무

유전자 이식 담배 식물의 디캄바에 대한 저항성을 테스트하기 위하여, 상기 실시예6에서 언급한 T₀ 세대에서부터의 씨앗을 발아시키고, 10-12개의 잎을 가지는 시기(leaf stage)까지 성장시켰다. 농학과의 보조로, ISCO에 의해 제작된 주문 제작 분무기(Burnside, Weed Science Vol.17, No.1, 102-104,1969)를 사용하여 이들 식물에 '일정 속도 분무'를 행하였다. 상기 분무는 TEEJET 노즐과 스크린을 가지고, 1.87mph 속도 및 42PSI 압력을 가지는 발사 장치를 사용한다. 상기 노즐의 높이는 덮개 상부 8'로 설정하였다. 압축된 공기 하에서, 에이커(acre) 당 20 갤런의 속도로 비이온성 계면 활성제를 혼합한 다양한 농도의 디캄바(시판품-Clarity)를 상기 식물에 분무하였다.

초기 사멸 곡선을 확립하기 위하여, 0에서 0.5lbs/acre의 범위로 디캄바의 농도를 증가시키면서, 야생형 담배 식물에 디캄바를 처리하였다. 0.5lbs/acre 농도의 디캄바에 대한 상기 야생형 식물의 민감도를 100%로 정하고, 0.5lbs/acre에서 5lbs/acre의 범위로 디캄바의 농도를 증가시키면서, 상기 통과 단백질질을 포함하거나 포함하지 않는 상기 옥시게나제 유전자만을 함유하는 유전자 이식 식물에 디캄바를 처리하였다. 옥시게나제 유전자 구축물은 보유하고 있지만, 통과 펩티드 코딩 서열을 가지지 않는 유전자 이식 식물은 적어도 2.5lbs/acre의 디캄바 처리에 저항성을 나타내었다(즉, 성장하였고, 건강하였다). 상기 통과 펩티드를 가지는 옥시게나제 유전자 구축물을 보유하는 상기 유전자 이식 담배 식물은 5lbs/acre까지 디캄바의 농도를 증가시켜 분무하였을 때에도 성장하였고, 건강하였다. 즉, 통과 펩티드 코딩 서열을 가지고 있거나, 가지고 있지 않은 옥시게나제 유전자를 함유하는 유전자 이식 식물은 적어도 지정된 양의 디캄바까지는 디캄바를 처리하지 않은 대조 식물과 유사한 양상을 나타내는 반면에 유전자 이식되지 않은 식물을 동일한 양의 디캄바로 처리하였을 때 성장이 감소되고, 시들었으며, 심각한 괴사를 나타내었다.

유사한 실험에서, 상기 세 가지의 유전자(옥시게나제, 페레독신 및 환원 효소 유전자) 구축물을 함유하는 유전자 이식 식물에 0.125lbs/acre의 디캄바를 분무하였다. 상기 세 가지의 유전자 구축물을 함유하는 유전자 이식 식물은 이러한 농도의 디캄바를 분무하였을 때에도 성장하고 건강한 반면에, 동일한 양의 디캄바를 처리한 유전자 이식되지 않은 식물은 성장이 감소되고, 시들었으며, 심각한 괴사를 나타내었다. 상기 옥시게나제 구축물만을 가지는 유전자 이식 식물이 2.5lbs/acre 농도까지의 디캄바에 대해 저항성을 나타내었기 때문에, 상기 세 가지의 유전자 구축물을 함유하는 유전자 이식 식물도 2.5lbs/acre 또는 그 이상의 디캄바 농도까지 유사한 저항성을 나타낼 것으로 예상된다.

이러한 결과는, 본 발명에 따른 디캄바-분해 옥시게나제 또는 상기 세 가지의 유전자 구축물로 형질 전환시킨 유전자 이식 식물이 디캄바에 대한 저항성을 획득하였음을 명백하게 증명한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- a. 서열 식별 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열;
- b. 서열 식별 번호: 5의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및
- c. 서열 식별 번호: 5와 적어도 약 65% 동일하고, 디캄바-분해 페레독신 활성을 가지는 아미노산 서열;

로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자.

청구항 2.

제1항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자.

청구항 3.

제1항에 있어서,

서열 식별 번호: 4의 핵산 서열을 포함하는

DNA 분자.

청구항 4.

발현 제어 서열에 작용적으로 연결된, 제1항에 따른 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체.

청구항 5.

제4항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

DNA 구조체.

청구항 6.

제4항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 4의 핵산 서열을 포함하는

DNA 구조체.

청구항 7.

디캄바-분해 페레독신의 효소 활성을 가지는

a. 서열 식별 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열;

b. 서열 식별 번호: 5의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및

c. 서열 식별 번호: 5와 적어도 약 65% 동일한 아미노산 서열;

로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 페레독신.

청구항 8.

제7항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는

디캄바-분해 페레독신.

청구항 9.

a. 서열 식별 번호: 7과 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열;

b. 상기 (a)의 아미노산 서열의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및

c. 상기 (a)의 아미노산 서열과 적어도 약 75% 동일하고, 디캄바-분해 환원 효소 활성을 가지는 아미노산 서열;

로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자.

청구항 10.

제9항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

DNA 분자.

청구항 11.

제9항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자.

청구항 12.

제9항에 있어서,

서열 식별 번호: 6 및 서열 식별 번호: 8로 이루어진 그룹에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 DNA 분자.

청구항 13.

발현 제어 서열에 작용적으로 연결된, 제9항에 따른 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체.

청구항 14.

제13항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체.

청구항 15.

제13항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체.

청구항 16.

제13항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 6 및 서열 식별 번호: 8로 이루어진 그룹에서 선택된 핵산 서열을 포함하는 DNA 구조체.

청구항 17.

a. 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열;

b. 상기 (a)의 아미노산 서열의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및

c. 상기 (a)의 아미노산 서열과 적어도 약 75% 동일한 아미노산 서열;

로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 - 상기 아미노산 서열은 디캄바-분해 환원 효소의 효소 활성을 가짐 - 분리되고 적어도 부분적으로 정제된 디캄바-분해 환원 효소.

청구항 18.

제17항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는

디캄바-분해 환원 효소.

청구항 19.

제17항에 있어서,

상기 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는

디캄바-분해 환원 효소.

청구항 20.

디캄바-분해 옥시게나제를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체로서, 디캄바-분해 옥시게나제를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드(transit peptide)를 엔코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되고, 여기서 상기 디캄바-분해 옥시게나제는

a. 서열 식별 번호: 3;

b. 서열 식별 번호: 3의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및

c. 서열 식별 번호: 3과 적어도 약 65% 동일하고, 디캄바-분해 옥시게나제 활성을 가지는 아미노산 서열;

로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는

DNA 구조체.

청구항 21.

제20항에 있어서,

상기 디캄바-분해 옥시게나제를 엔코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 2를 포함하는

DNA 구조체.

청구항 22.

디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체로서, 디캄바-분해 페레독신을 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되고, 여기서 상기 디캄바-분해 페레독신은

a. 서열 식별 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열;

b. 서열 식별 번호: 5의 생물학적 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및

c. 서열 식별 번호: 5와 적어도 약 65% 동일하고, 디캄바-분해 페레독신 활성을 가지는 아미노산 서열;

로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는

DNA 구조체.

청구항 23.

제22항에 있어서,

상기 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 4를 포함하는

DNA 구조체.

청구항 24.

제22항에 있어서,

상기 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 핵산 서열은 쌍떡잎 식물에서의 최적의 발현을 위해 선택된 코돈을 가지는

DNA 구조체.

청구항 25.

디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체로서, 디캄바-분해 환원 효소를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열에 작용적으로 연결되고, 여기서 상기 디캄바-분해 환원 효소는

- a. 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열;
 - b. 상기 (a)의 아미노산 서열의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및
 - c. 상기 (a)의 아미노산 서열과 적어도 약 75% 동일하고, 디캄바-분해 환원 효소 활성을 가지는 아미노산 서열;
- 로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는

DNA 구조체.

청구항 26.

제25항에 있어서,

상기 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 6 및 서열 식별 번호: 8로 이루어진 그룹에서 선택된 핵산 서열을 포함하는

DNA 구조체.

청구항 27.

디캄바-분해 O-디메틸라제를 엔코딩하는 DNA 구조체로서, 상기 디캄바-분해 O-디메틸라제는 발현 제어 서열에 작용적으로 연결된 DNA 서열을 포함하고, 여기서 상기 DNA 서열은

- a. i. 서열 식별 번호: 3;
- ii. 서열 식별 번호: 3의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및
- iii. 서열 식별 번호: 3와 적어도 약 65% 동일하고, 디캄바-분해 옥시게나제 활성을 가지는 아미노산 서열;로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 옥시게나제,
- b. i. 서열 식별 번호: 5를 포함하는 아미노산 서열;
- ii. 서열 식별 번호: 5의 생물학적 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및
- iii. 서열 식별 번호: 5와 적어도 약 65% 동일하고, 디캄바-분해 페레독신 활성을 가지는 아미노산 서열;로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 페레독신,
- c. i. 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열;
- ii. 상기 (a)의 아미노산 서열의 효소 활성이 있는 단편의 아미노산 서열; 및
- iii. 상기 (a)의 아미노산 서열과 적어도 약 75% 동일하고, 디캄바-분해 환원 효소 활성을 가지는 아미노산 서열;로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 디캄바-분해 환원 효소,

를 엔코딩하는 DNA 구조체.

청구항 28.

제27항에 있어서,

상기 구조체는, 상기 디캄바-분해 옥시게나제를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 더 포함하는

DNA 구조체.

청구항 29.

제20항, 제22항, 제25항 또는 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

DNA 구조체.

청구항 30.

제4~6항, 제13~16항 또는 제20~28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 벡터인

DNA 구조체.

청구항 31.

제4~6항, 제13~16항 또는 제20~28항 중 어느 한 항에 따른 DNA 구조체를 포함하는 유전자 이식 숙주 세포.

청구항 32.

제31항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 33.

제32항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 환원 효소를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 더 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 34.

제33항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 35.

제31항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 36.

제35항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 페레독신을 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 더 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 37.

제36항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 38.

제31항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 옥시게나제를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 옥시게나제를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하고, 상기 디캄바-분해 옥시게나제는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 39.

제38항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 40.

제31항에 있어서,

상기 DNA 구조체는, 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 옥시게나제, 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 페레독신, 및 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 41.

제40항에 있어서,

상기 DNA 구조체는, 상기 디캄바-분해 옥시게나제, 상기 디캄바-분해 페레독신 및 상기 디캄바-분해 환원 효소를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 더 포함하는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 42.

제41항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 43.

제31항에 있어서,

상기 유전자 이식 숙주 세포는 식물 세포인

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 44.

제31항에 있어서,

상기 유전자 이식 숙주 세포는 미생물인

유전자 이식 숙주 세포.

청구항 45.

제4~6항, 제13~16항 또는 제20~28항 중 어느 한 항에 따른 DNA 구조체를 포함하는 한 개 이상의 세포를 포함하는 유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 46.

제45항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 47.

제46항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 환원 효소를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 단백질을 더 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 48.

제47항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 49.

제45항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 페레독신을 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 50.

제49항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 페레독신을 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 단백질을 더 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 51.

제50항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 52.

제45항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 옥시게나제를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열 및 발현 제어 서열에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 옥시게나제를 엔코딩하는 DNA 서열을

포함하고, 상기 디캄바-분해 옥시게나제는 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 53.

제52항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 19에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 54.

제45항에 있어서,

상기 DNA 구조체는, 서열 식별 번호: 3의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 옥시게나제, 서열 식별 번호: 5의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 페레독신, 및 서열 식별 번호: 7 및 서열 식별 번호: 9로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 환원 효소를 엔코딩하는 DNA 서열을 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 55.

제54항에 있어서,

상기 DNA 구조체는 상기 디캄바-분해 옥시게나제, 상기 디캄바-분해 페레독신 및 상기 디캄바-환원 효소를 식물 세포의 세포 기관에 대하여 표적화시키는 통과 펩티드를 더 포함하는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 56.

제55항에 있어서,

상기 통과 펩티드는 서열 식별 번호: 9에 의해 엔코딩되는

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 57.

제56항에 있어서,

상기 식물은 디캄바에 대해 내성이 있는 쌍떡잎 식물 또는 외떡잎 식물인

유전자 이식 식물 또는 식물의 부분.

청구항 58.

목초지의 잡초를 제어하는 유효량의 디캄바를 목초지에 적용하는 단계를 포함하는, 제45항에 따른 디캄바-내성 유전자 이식 식물을 포함하는

목초지에서의 잡초 제어 방법.

청구항 59.

디캄바를 함유하는 물질에서 적어도 일부의 디캄바를 분해하는데 효과적인 양의 제44항에 따른 디캄바-분해 유전자 이식 미생물을 상기 물질에 적용하는 단계를 포함하는 디캄바 함유 물질의 오염 제거 방법.

청구항 60.

디캄바를 함유하는 물질에서 적어도 일부의 디캄바를 분해하는데 효과적인 양으로, 제7항에 따른 디캄바-분해 페레독신, 제17항에 따른 디캄바-분해 환원 효소 또는 제27항에 따른 DNA 구조체에 의해 엔코딩된 디캄바-분해 O-디메틸라제를 상기 물질에 적용하는 단계를 포함하는 디캄바 함유 물질의 오염 제거 방법.

청구항 61.

식물 세포의 군집을 구비하는 단계;

상기 식물 세포의 군집 중의 식물 세포의 적어도 일부를, 디캄바에 대해 내성을 가지도록 제4~6항, 제13~16항 또는 제 20~28항 중 어느 한 항에 따른 DNA 구조체로 형질 전환시키는 단계; 및

형질 전환된 식물 세포는 성장하고, 형질 전환되지 않은 식물 세포는 성장하지 못하도록 선택된 농도로 디캄바가 함유된 배지에 결과물인 식물 세포의 군집을 성장시키는 단계;

를 포함하는 형질 전환된 식물 세포의 선별 방법.

청구항 62.

디캄바에 대해 내성을 가지도록 제4~6항, 제13~16항 또는 제20~28항 중 어느 한 항에 따른 DNA 구조체로 형질 전환시킨 식물을 포함할 수 있는 식물의 군집을 구비하는 단계; 및

형질 전환된 식물은 성장하고, 형질 전환되지 않은 식물의 성장은 억제되도록 선택된 양의 디캄바를 상기 식물 군집에 적용하는 단계;

를 포함하는 형질 전환된 식물의 선별 방법.

청구항 63.

디캄바를 분해할 수 있도록 제4~6항, 제13~16항 또는 제20~28항 중 어느 한 항에 따른 DNA 구조체로 형질 전환시킨 숙주 세포, 완전한 유기체 또는 유기체의 부분을 포함할 수 있는 숙주 세포의 군집, 완전한 유기체의 군집 또는 유기체 부분의 군집을 구비하는 단계;

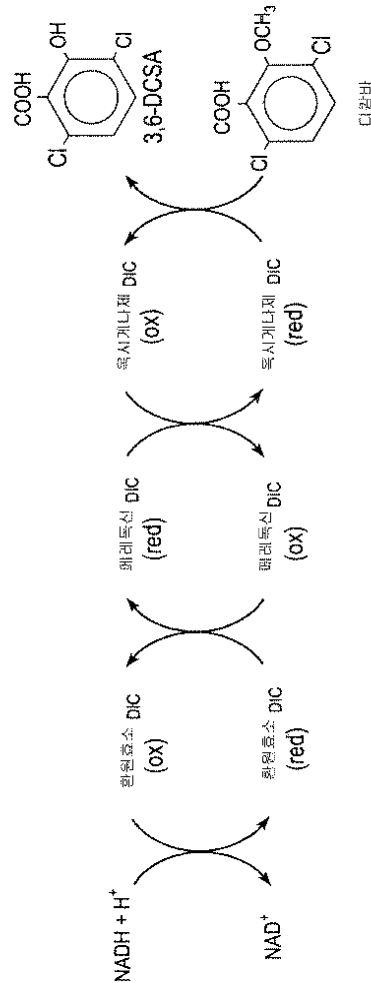
상기 숙주 세포의 군집, 완전한 유기체의 군집 또는 유기체 부분의 군집을 디캄바와 접촉시키는 단계; 및

디캄바 분해의 결과로서 상기 숙주 세포, 완전한 유기체 또는 유기체의 부분에서 생성되는 3,6-디클로로살리실산에 기인하여, 형광의 존재 및 수준을 조사하는 단계;

를 포함하는, 형질 전환된 숙주 세포, 완전한 유기체 및 유기체의 부분을 선별하거나 또는 스크리닝하는 방법.

도면

도면1



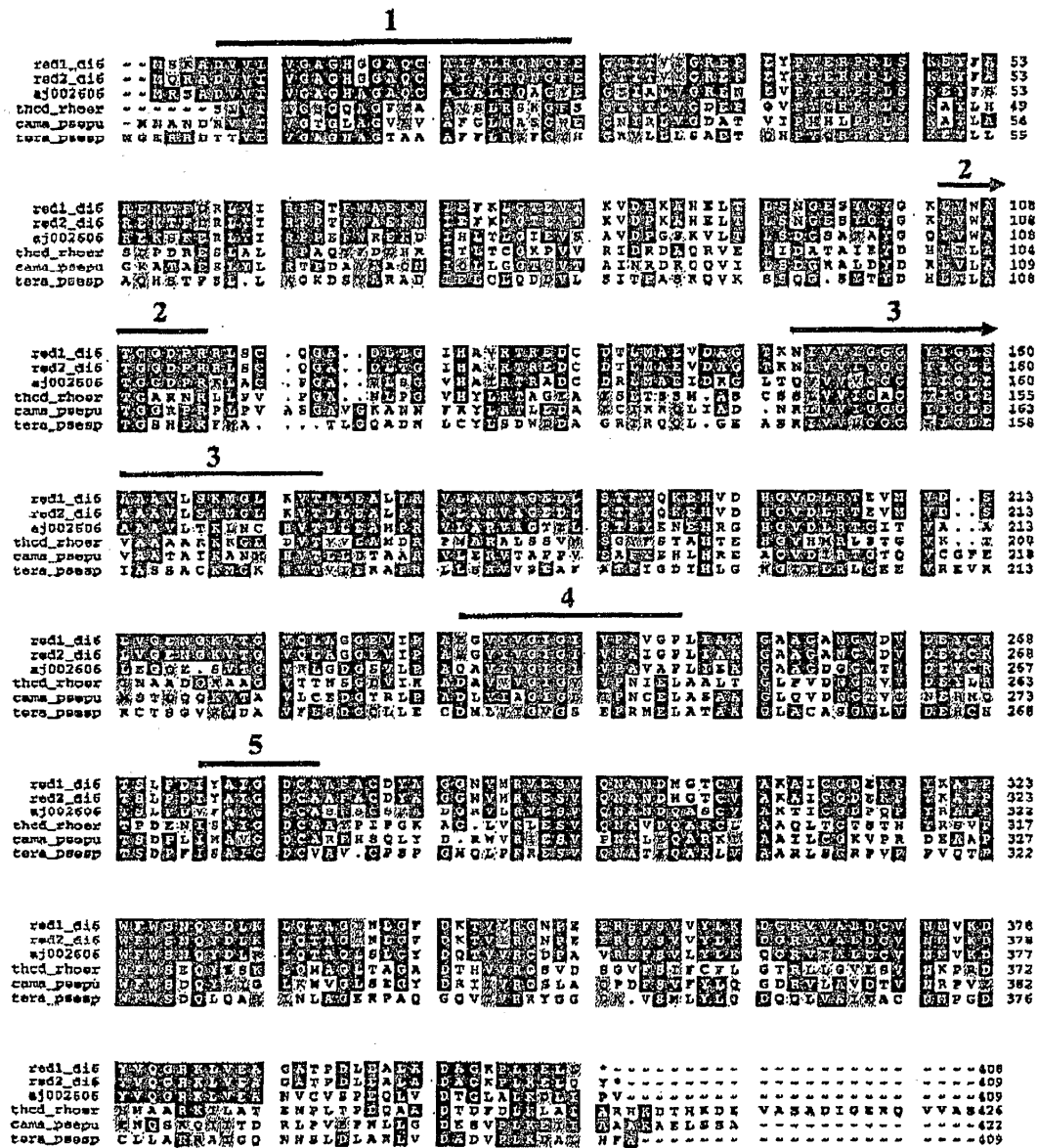
도면2

fer6_rhoca	- A K I I I T E H N	G T R H E V E A K F	G T T V V P A A R D	N C V P G T	35
fer_caucr	- A K I I I I Q H D	G A E Q V V D V K E	G L T V V E G A V R	N N Y P G I	36
thcc_rhoer	- E T V V V V H F D	G T K H E V E V P F	G K R V V G A A I G	A G I D G I	35
putx_psepu	- S K V V V V S H D	G T R R E L D V A D	G A S L M A A V S	N C Y D I	35
terp_pseep	- D V V V I D E Q	S G E A A D A Q D	G Q S L M E V A T Q	N G Y E G I	35
ferr_di6	- E E Q I I V V N Q S	G E E S S V E A S E	G R L L M E V I R D	S G F D E I	36

fer6_rhoca	D D D C G G A C A C	S T C H A Y V D P A	V D K L E K A L P	T E T D M I	71
fer_caucr	D A D C G G A C A C	A T C H V V V D E A	V L D K T G K A	N E E S M I	72
thcc_rhoer	V A E C G G Q A M C	A T C H V V V S P	A A D F S I S E	E E C C V I	71
putx_psepu	V G D C C G S A S C	A T C H V V V N E A	F T D R V P A A N E	R E I G M I	71
terp_pseep	V A E C C G S Q V C	A T C R E E L D A	V V E I V G E A N P	D E N D M I	71
ferr_di6	E A L C G G C C S C	A T C H V V V D P A	F M D R L E L M S E	D E A D M I	72

fer6_rhoca	D F A Y E E N P A T	S R L L C C Q I K Y A	S L L D G L V V H L	P E K O I I 106
fer_caucr	D F A E N V E P . N	S R L S C C Q I K Y S	D A L D G L V V F L	P E S O H 106
thcc_rhoer	D D T V S E R T E A	S R L S C C Q I V V S	D D V D G L V V F L	P E E Q V 106
putx_psepu	C V T A E L K P N	S R L C C Q I I M M	P E L D G L V V D V	P E E Q W 106
terp_pseep	Q S T G E E M T A G	T R L S C C Q I F E D	P S M D G L V V V V	P L P A - 105
ferr_di6	D S S . H R N E Y	S R L S C C Q I P A T	G A L E C K M T	A C E D - 105

도면3



- <110> WEEKS, Donald, P.
WANG, Xiao-Zhuo
HERMAN, Patricia, L.
- <120> Methods and Materials for Making and Using Transgenic
Dicamba-Degrading Organisms
- <130> P03SR154/KR
- <150> US09/797,238
- <151> 2001-02-28
- <160> 19
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 29

<212> PRT
 <213> Pseudomonas maltophilia DI-6
 <220>
 <221> UNSURE
 <222> (28)
 <223> Best guess for Xaa = Asp or Thr
 <220>
 <221> UNSURE
 <222> (29)
 <223> Best guess for Xaa = Pro
 <400> 1

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu Leu

1 5 10 15

Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Xaa Xaa

20 25

<210> 2

<211> 1020

<212> DNA

<213> Pseudomonas maltophilia DI-6

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1017)

<400> 2

atg acc ttc gtc cgc aat gcc tgg tat gtg gcg gcg ctg ccc gag gaa 48

Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu

1 5 10 15

ctg tcc gaa aag ccg ctc ggc cgg acg att ctc gac aca ccg ctc gcg 96

Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala

20 25 30

ctc tac cgc cag ccc gac ggt gtg gtc gcg gcg ctg ctc gac atc tgt 144

Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys

35 40 45

ccg cac cgc ttc gcg ccg ctg agc gac ggc atc ctc gtc aac ggc cat 192

Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His

50	55	60	
ctc caa tgc ccc tat cac ggg ctg gaa ttc gat ggc ggc ggg cag tgc			240
Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln Cys			
65	70	75	80
gtc cat aac ccg cac ggc aat ggc gcc cgc ccg gct tcg ctc aac gtc			288
Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val			
85	90	95	
cgc tcc ttc ccg gtg gtg gag cgc gac gcg ctg atc tgg atc tgg ccc			336
Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro			
100	105	110	
ggc gat ccg gcg ctg gcc gat cct ggg gcg atc ccc gac ttc ggc tgc			384
Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys			
115	120	125	
cgc gtc gat ccc gcc tat cgg acc gtc ggc ggc tat ggg cat gtc gac			432
Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp			
130	135	140	
tgc aac tac aag ctg ctg gtc gac aac ctg atg gac ctc ggc cac gcc			480
Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala			
145	150	155	160
caa tat gtc cat cgc gcc aac gcc cag acc gac gcc ttc gac cgg ctg			528
Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu			
165	170	175	
gag cgc gag gtg atc gtc ggc gac ggt gag ata cag gcg ctg atg aag			576
Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys			
180	185	190	
att ccc ggc ggc acg ccg agc gtg ctg atg gcc aag ttc ctg cgc ggc			624
Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Gly			
195	200	205	
gcc aat acc ccc gtc gac gct tgg aac gac atc cgc tgg aac aag gtg			672
Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val			
210	215	220	
agc gcg atg ctc aac ttc atc gcg gtg gcg ccg gaa ggc acc ccg aag			720
Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro Lys			
225	230	235	240

gag cag agc atc cac tcg cgc ggt acc cat atc ctg acc ccc gag acg	768
Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu Thr	
245 250 255	
gag gcg agc tgc cat tat ttc ttc ggc tcc tcg cgc aat ttc ggc atc	816
Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly Ile	
260 265 270	
gac gat ccg gag atg gac ggc gtg ctg cgc agc tgg cag gct cag gcg	864
Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala	
275 280 285	
ctg gtc aag gag gac aag gtc gtc gtc gag gcg atc gag cgc cgc cgc	912
Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg	
290 295 300	
gcc tat gtc gag gcg aat ggc atc cgc ccg gcg atg ctg tcg tgc gac	960
Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp	
305 310 315 320	
gaa gcc gca gtc cgt gtc agc cgc gag atc gag aag ctt gag cag ctc	1008
Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu	
325 330 335	
gaa gcc gcc tga 1020	
Glu Ala Ala	
<210> 3	
<211> 339	
<212> PRT	
<213> Pseudomonas maltophilia DI-6	
<400> 3	
Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu	
1 5 10 15	
Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala	
20 25 30	
Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys	
35 40 45	
Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His	
50 55 60	
Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln Cys	

65	70	75	80
Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val			
	85	90	95
Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro			
100	105	110	
Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys			
115	120	125	
Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp			
130	135	140	
Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala			
145	150	155	160
Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu			
	165	170	175
Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys			
180	185	190	
Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Gly			
195	200	205	
Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val			
210	215	220	
Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro Lys			
225	230	235	240
Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu Thr			
	245	250	255
Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly Ile			
260	265	270	
Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala			
275	280	285	
Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg			
290	295	300	
Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp			
305	310	315	320
Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu			
	325	330	335
Glu Ala Ala			

<210> 4
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas maltophilia DI-6
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(315)
 <400> 4

atg ccg cag att acc gtc gtc aac cag tcg ggt gaa gaa tcc agc gtc 48
 Met Pro Gln Ile Thr Val Val Asn Gln Ser Gly Glu Glu Ser Ser Val
 1 5 10 15

gag gcg agt gaa ggc cgc acc ctg atg gaa gtc atc cgc gac agc ggt 96
 Glu Ala Ser Glu Gly Arg Thr Leu Met Glu Val Ile Arg Asp Ser Gly
 20 25 30

ttt gac gaa ctc ctg gcg ctt tgc ggc ggc tgc tgc tcg tgc gcg acc 144
 Phe Asp Glu Leu Leu Ala Leu Cys Gly Gly Cys Cys Ser Cys Ala Thr
 35 40 45

tgc cac gtc cac atc gac ccg gcc ttc atg gac aag ctg ccg gag atg 192
 Cys His Val His Ile Asp Pro Ala Phe Met Asp Lys Leu Pro Glu Met
 50 55 60

agc gaa gac gag aac gac ctg ctc gac agc tcg gac cac cgc aac gag 240
 Ser Glu Asp Glu Asn Asp Leu Leu Asp Ser Ser Asp His Arg Asn Glu
 65 70 75 80

tac tcg cgt ctc tcg tgc cag att ccg gtc acc ggc gcc ctc gaa ggc 288
 Tyr Ser Arg Leu Ser Cys Gln Ile Pro Val Thr Gly Ala Leu Glu Gly
 85 90 95

atc aag gtg acg atc gcg cag gaa gac tga 318
 Ile Lys Val Thr Ile Ala Gln Glu Asp
 100 105

<210> 5
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas maltophilia DI-6
 <400> 5

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

<210> 6

<211> 1227

<212> DNA

<213> Pseudomonas maltophilia DI-6

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1224)

<400> 6

atg agc aag gca gac gtc gta atc gtg gga gcc ggg cat ggc ggc gca 48
 Met Ser Lys Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ala Gly His Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 cag tgc gcg atc gcc ctt cgc cag aac ggc ttc gaa gga acc atc acc 96
 Gln Cys Ala Ile Ala Leu Arg Gln Asn Gly Phe Glu Gly Thr Ile Thr
 20 25 30
 gtc atc ggt cgt gag ccg gaa tat ccc tat gag cgt ccg ccg ctc tcg 144
 Val Ile Gly Arg Glu Pro Glu Tyr Pro Tyr Glu Arg Pro Pro Leu Ser
 35 40 45
 aag gaa tat ttc gcg cgc gag aag acc ttc gac cgc ctc tac atc cgt 192
 Lys Glu Tyr Phe Ala Arg Glu Lys Thr Phe Asp Arg Leu Tyr Ile Arg
 50 55 60

ccg ccg acg ttc tgg gcc gag aag aac atc gag ttc aag ctt ggc acc	240
Pro Pro Thr Phe Trp Ala Glu Lys Asn Ile Glu Phe Lys Leu Gly Thr	
65 70 75 80	
gaa gtc acc aag gtc gat ccc aag gcg cac gaa ctg acg ctc tcc aac	288
Glu Val Thr Lys Val Asp Pro Lys Ala His Glu Leu Thr Leu Ser Asn	
85 90 95	
ggc gag agc tac ggt tat ggc aag ctc gtc tgg gcc acc ggc ggc gat	336
Gly Glu Ser Tyr Gly Tyr Gly Lys Leu Val Trp Ala Thr Gly Gly Asp	
100 105 110	
ccg cgt cgc ctt tct tgc cag ggg gcc gac ctc acc ggc atc cac gcc	384
Pro Arg Arg Leu Ser Cys Gln Gly Ala Asp Leu Thr Gly Ile His Ala	
115 120 125	
gtg cgc acc cgc gag gac tgc gac acg ctg atg gcc gaa gtc gat gcg	432
Val Arg Thr Arg Glu Asp Cys Asp Thr Leu Met Ala Glu Val Asp Ala	
130 135 140	
ggc acg aag aac atc gtc gtc atc ggc ggc ggc tac atc ggt ctg gaa	480
Gly Thr Lys Asn Ile Val Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Leu Glu	
145 150 155 160	
gcc gct gcg gtg ctg tcc aag atg ggc ctc aag gtc acc ctg ctc gaa	528
Ala Ala Ala Val Leu Ser Lys Met Gly Leu Lys Val Thr Leu Leu Glu	
165 170 175	
gcg ctt ccg cgc gtg ctg gcg cgc gtt gcg ggt gaa gac ctc tcg acc	576
Ala Leu Pro Arg Val Leu Ala Arg Val Ala Gly Glu Asp Leu Ser Thr	
180 185 190	
ttc tac cag aag gaa cat gtc gat cac ggc gtc gac ctg cgc acc gaa	624
Phe Tyr Gln Lys Glu His Val Asp His Gly Val Asp Leu Arg Thr Glu	
195 200 205	
gtc atg gtc gac agc ctc gtc ggc gaa aac ggc aag gtc acc ggc gtg	672
Val Met Val Asp Ser Leu Val Gly Glu Asn Gly Lys Val Thr Gly Val	
210 215 220	
cag ctt gcc ggc ggc gaa gtg atc ccg gcc gaa ggc gtc atc gtc ggc	720
Gln Leu Ala Gly Gly Glu Val Ile Pro Ala Glu Gly Val Ile Val Gly	
225 230 235 240	
atc ggc atc gtg cct gcc gtc ggt ccg ctg atc gcg gcc ggc gcg gcc	768

Ile Gly Ile Val Pro Ala Val Gly Pro Leu Ile Ala Ala Gly Ala Ala	
245 250 255	
ggt gcc aac ggc gtc gac gtg gac gag tac tgc cgc acc tcg ctg ccc	816
Gly Ala Asn Gly Val Asp Val Asp Glu Tyr Cys Arg Thr Ser Leu Pro	
260 265 270	
gac atc tat gcg atc ggc gac tgt gcg gct ttc gcc tgc gac tac gcc	864
Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ala Phe Ala Cys Asp Tyr Ala	
275 280 285	
ggc ggc aac gtg atg cgc gtg gaa tcg gtc cag aac gcc aac gac atg	912
Gly Gly Asn Val Met Arg Val Glu Ser Val Gln Asn Ala Asn Asp Met	
290 295 300	
ggc acc tgc gtg gcc aag gcg atc tgc ggc gac gag aag ccc tac aag	960
Gly Thr Cys Val Ala Lys Ala Ile Cys Gly Asp Glu Lys Pro Tyr Lys	
305 310 315 320	
gcg ttc ccg tgg ttc tgg tcc aac cag tac gac ctc aag ctg cag acc	1008
Ala Phe Pro Trp Phe Trp Ser Asn Gln Tyr Asp Leu Lys Leu Gln Thr	
325 330 335	
gcc ggc atc aac ctg ggc ttc gac aag acc gtg atc cgc ggc aat ccg	1056
Ala Gly Ile Asn Leu Gly Phe Asp Lys Thr Val Ile Arg Gly Asn Pro	
340 345 350	
gag gag cgc agc ttc tcg gtc gtc tat ctc aag gac ggc cgc gtg gtc	1104
Glu Glu Arg Ser Phe Ser Val Val Tyr Leu Lys Asp Gly Arg Val Val	
355 360 365	
gcg ctg gac tgc gtg aac atg gtc aag gat tac gtg cag ggc cgc aag	1152
Ala Leu Asp Cys Val Asn Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Gly Arg Lys	
370 375 380	
ctg gtc gaa gcc ggg gcc acc ccc gac ctc gaa gcg ctg gcc gat gcc	1200
Leu Val Glu Ala Gly Ala Thr Pro Asp Leu Glu Ala Leu Ala Asp Ala	
385 390 395 400	
ggc aag ccg ctc aag gaa ctg ctc tag	1227
Gly Lys Pro Leu Lys Glu Leu Leu	
405	

<210> 7

<211> 408

<212> PRT

<213> *Pseudomonas maltophilia* DI-6

<400> 7

```

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

```

245 250 255
 Gly Ala Asn Gly Val Asp Val Asp Glu Tyr Cys Arg Thr Ser Leu Pro
 260 265 270
 Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ala Phe Ala Cys Asp Tyr Ala
 275 280 285
 Gly Gly Asn Val Met Arg Val Glu Ser Val Gln Asn Ala Asn Asp Met
 290 295 300
 Gly Thr Cys Val Ala Lys Ala Ile Cys Gly Asp Glu Lys Pro Tyr Lys
 305 310 315 320
 Ala Phe Pro Trp Phe Trp Ser Asn Gln Tyr Asp Leu Lys Leu Gln Thr
 325 330 335
 Ala Gly Ile Asn Leu Gly Phe Asp Lys Thr Val Ile Arg Gly Asn Pro
 340 345 350
 Glu Glu Arg Ser Phe Ser Val Val Tyr Leu Lys Asp Gly Arg Val Val
 355 360 365
 Ala Leu Asp Cys Val Asn Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Gly Arg Lys
 370 375 380
 Leu Val Glu Ala Gly Ala Thr Pro Asp Leu Glu Ala Leu Ala Asp Ala
 385 390 395 400
 Gly Lys Pro Leu Lys Glu Leu Leu

405

<210> 8

<211> 1230

<212> DNA

<213> Pseudomonas maltophilia DI-6

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1227)

<400> 8

atg cag agg gca gac gtc gta atc gtg gga gcc ggg cat ggc ggt gca 48

Met Gln Arg Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ala Gly His Gly Gly Ala

1 5 10 15

cag tgc gcg atc gcc ctt cgc cag aac ggc ttc gaa ggc acc atc acc 96

Gln Cys Ala Ile Ala Leu Arg Gln Asn Gly Phe Glu Gly Thr Ile Thr

20	25	30	
gtc atc ggt cgt gag ccg gaa tat ccc tat gag cgt ccg ccg ctc tcg			144
Val Ile Gly Arg Glu Pro Glu Tyr Pro Tyr Glu Arg Pro Pro Leu Ser			
35	40	45	
aag gaa tat ttc gcg cgc gag aag acc ttc gac cgc ctc tac atc cgt			192
Lys Glu Tyr Phe Ala Arg Glu Lys Thr Phe Asp Arg Leu Tyr Ile Arg			
50	55	60	
ccg ccg acg ttc tgg gcc gag aag aac atc gag ttc aag ctt ggc acc			240
Pro Pro Thr Phe Trp Ala Glu Lys Asn Ile Glu Phe Lys Leu Gly Thr			
65	70	75	80
gaa gtc acc aag gtc gat ccc aag gcg cac gaa ctg acg ctc tcc aac			288
Glu Val Thr Lys Val Asp Pro Lys Ala His Glu Leu Thr Leu Ser Asn			
85	90	95	
ggc gag agc tac ggt tat ggc aag ctc gtc tgg gcc acc ggc ggc gat			336
Gly Glu Ser Tyr Gly Tyr Gly Lys Leu Val Trp Ala Thr Gly Gly Asp			
100	105	110	
ccg cgt cgc ctt tct tgc cag ggg gcc gac ctc acc ggc atc cac gcc			384
Pro Arg Arg Leu Ser Cys Gln Gly Ala Asp Leu Thr Gly Ile His Ala			
115	120	125	
gtg cgc acc cgc gag gac tgc gac acg ctg atg gcc gaa gtc gat gcg			432
Val Arg Thr Arg Glu Asp Cys Asp Thr Leu Met Ala Glu Val Asp Ala			
130	135	140	
ggc acg aag aac atc gtc gtc atc ggc ggc ggc tac atc ggt ctg gaa			480
Gly Thr Lys Asn Ile Val Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Leu Glu			
145	150	155	160
gcc gct gcg gtg ctg tcc aag atg ggc ctc aag gtc acc ctg ctc gaa			528
Ala Ala Ala Val Leu Ser Lys Met Gly Leu Lys Val Thr Leu Leu Glu			
165	170	175	
gcg ctt ccg cgc gtg ctg gcg cgc gtt gcg ggt gaa gac ctc tcg acc			576
Ala Leu Pro Arg Val Leu Ala Arg Val Ala Gly Glu Asp Leu Ser Thr			
180	185	190	
ttc tac cag aag gaa cat gtc gat cac ggc gtc gac ctg cgc acc gaa			624
Phe Tyr Gln Lys Glu His Val Asp His Gly Val Asp Leu Arg Thr Glu			
195	200	205	

gtc atg gtc gac agc ctc gtc ggc gaa aac ggc aag gtc acc ggc gtg	672
Val Met Val Asp Ser Leu Val Gly Glu Asn Gly Lys Val Thr Gly Val	
210 215 220	
cag ctt gcc ggc ggc gaa gtg atc ccg gcc gaa ggc gtc atc gtc ggc	720
Gln Leu Ala Gly Gly Glu Val Ile Pro Ala Glu Gly Val Ile Val Gly	
225 230 235 240	
atc ggc atc gtg cct gcc atc ggt ccg ctg atc gcg gcc ggc gcg gcc	768
Ile Gly Ile Val Pro Ala Ile Gly Pro Leu Ile Ala Ala Gly Ala Ala	
245 250 255	
ggc gcc aac ggc gtc gac gtg gac gag tac tgc cgc acc tcg ctg ccc	816
Gly Ala Asn Gly Val Asp Val Asp Glu Tyr Cys Arg Thr Ser Leu Pro	
260 265 270	
gac atc tat gcg atc ggc gac tgt gcg gct ttc gcc tgc gac tac gcc	864
Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ala Phe Ala Cys Asp Tyr Ala	
275 280 285	
ggc ggc aac gtg atg cgc gtg gaa tcg gtc cag aac gcc aac gac atg	912
Gly Gly Asn Val Met Arg Val Glu Ser Val Gln Asn Ala Asn Asp Met	
290 295 300	
ggc acc tgc gtg gcc aag gcg atc tgc ggc gac gag aag ccc tac aag	960
Gly Thr Cys Val Ala Lys Ala Ile Cys Gly Asp Glu Lys Pro Tyr Lys	
305 310 315 320	
gcg ttc ccg tgg ttc tgg tcc aac cag tac gac ctc aag ctg cag acc	1008
Ala Phe Pro Trp Phe Trp Ser Asn Gln Tyr Asp Leu Lys Leu Gln Thr	
325 330 335	
gcc ggc atc aac ctg ggc ttc gac aag acc gtg atc cgc ggc aat ccg	1056
Ala Gly Ile Asn Leu Gly Phe Asp Lys Thr Val Ile Arg Gly Asn Pro	
340 345 350	
gag gag cgc agc ttc tcg gtc gtc tat ctc aag gac ggc cgc gtg gtc	1104
Glu Glu Arg Ser Phe Ser Val Val Tyr Leu Lys Asp Gly Arg Val Val	
355 360 365	
gcg ctg gac tgc gtg aac atg gtc aag gat tac gtg cag ggc cgc aag	1152
Ala Leu Asp Cys Val Asn Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Gly Arg Lys	
370 375 380	
ctg gtc gaa gcc ggg gcc acc ccc gac ctc gaa gcg ctg gcc gat gcc	1200

Leu Val Glu Ala Gly Ala Thr Pro Asp Leu Glu Ala Leu Ala Asp Ala
 385 390 395 400
 ggc aag ccg ctc aag gaa ctg caa tac tag 1230
 Gly Lys Pro Leu Lys Glu Leu Gln Tyr
 405

<210> 9

<211> 409

<212> PRT

<213> Pseudomonas maltophilia DI-6

<400> 9

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

Phe Tyr Gln Lys Glu His Val Asp His Gly Val Asp Leu Arg Thr Glu
 195 200 205
 Val Met Val Asp Ser Leu Val Gly Glu Asn Gly Lys Val Thr Gly Val
 210 215 220
 Gln Leu Ala Gly Gly Glu Val Ile Pro Ala Glu Gly Val Ile Val Gly
 225 230 235 240
 Ile Gly Ile Val Pro Ala Ile Gly Pro Leu Ile Ala Ala Gly Ala Ala
 245 250 255
 Gly Ala Asn Gly Val Asp Val Asp Glu Tyr Cys Arg Thr Ser Leu Pro
 260 265 270
 Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ala Phe Ala Cys Asp Tyr Ala
 275 280 285
 Gly Gly Asn Val Met Arg Val Glu Ser Val Gln Asn Ala Asn Asp Met
 290 295 300
 Gly Thr Cys Val Ala Lys Ala Ile Cys Gly Asp Glu Lys Pro Tyr Lys
 305 310 315 320
 Ala Phe Pro Trp Phe Trp Ser Asn Gln Tyr Asp Leu Lys Leu Gln Thr
 325 330 335
 Ala Gly Ile Asn Leu Gly Phe Asp Lys Thr Val Ile Arg Gly Asn Pro
 340 345 350
 Glu Glu Arg Ser Phe Ser Val Val Tyr Leu Lys Asp Gly Arg Val Val
 355 360 365
 Ala Leu Asp Cys Val Asn Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Gly Arg Lys
 370 375 380
 Leu Val Glu Ala Gly Ala Thr Pro Asp Leu Glu Ala Leu Ala Asp Ala
 385 390 395 400
 Gly Lys Pro Leu Lys Glu Leu Gln Tyr
 405

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Rhodobacter capsulatus

<400> 10

Ala Lys Ile Ile Phe Ile Glu His Asn Gly Thr Arg His Glu Val Glu

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

100	105
-----	-----

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> *Caulobacter crescentus*

<400> 11

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

100	105
-----	-----

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Rhodococcus erythropolis

<400> 12

Pro Thr Val Thr Tyr Val His Pro Asp Gly Thr Lys His Glu Val Glu

1 5 10 15

Val Pro Thr Gly Lys Arg Val Met Gln Ala Ala Ile Gly Ala Gly Ile

20 25 30

Asp Gly Ile Val Ala Glu Cys Gly Gly Gln Ala Met Cys Ala Thr Cys

35 40 45

His Val Tyr Val Glu Ser Pro Trp Ala Asp Lys Phe Pro Ser Ile Ser

50 55 60

Glu Glu Glu Asp Glu Met Leu Asp Asp Thr Val Ser Pro Arg Thr Glu

65 70 75 80

Ala Ser Arg Leu Ser Cys Gln Leu Val Val Ser Asp Asp Val Asp Gly

85 90 95

Leu Ile Val Arg Leu Pro Glu Glu Gln Val

100 105

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 13

Ser Lys Val Val Tyr Val Ser His Asp Gly Thr Arg Arg Glu Leu Asp

1 5 10 15

Val Ala Asp Gly Val Ser Leu Met Gln Ala Ala Val Ser Asn Gly Ile

20 25 30

Tyr Asp Ile Val Gly Asp Cys Gly Gly Ser Ala Ser Cys Ala Thr Cys

35 40 45

His Val Tyr Val Asn Glu Ala Phe Thr Asp Lys Val Pro Ala Ala Asn

50 55 60

Glu Arg Glu Ile Gly Met Leu Glu Cys Val Thr Ala Glu Leu Lys Pro

65 70 75 80

Asn Ser Arg Leu Cys Cys Gln Ile Ile Met Thr Pro Glu Leu Asp Gly

85 90 95

Ile Val Val Asp Val Pro Asp Arg Gln Trp

100 105

<210> 14

<211> 105

<212> PRT

<213> Pseudomonas sp.

<400> 14

Pro Arg Val Val Phe Ile Asp Glu Gln Ser Gly Glu Tyr Ala Val Asp

1 5 10 15

Ala Gln Asp Gly Gln Ser Leu Met Glu Val Ala Thr Gln Asn Gly Val

20 25 30

Pro Gly Ile Val Ala Glu Cys Gly Gly Ser Cys Val Cys Ala Thr Cys

35 40 45

Arg Ile Glu Ile Glu Asp Ala Trp Val Glu Ile Val Gly Glu Ala Asn

50 55 60

Pro Asp Glu Asn Asp Leu Leu Gln Ser Thr Gly Glu Pro Met Thr Ala

65 70 75 80

Gly Thr Arg Leu Ser Cys Gln Val Phe Ile Asp Pro Ser Met Asp Gly

85 90 95

Leu Ile Val Arg Val Pro Leu Pro Ala

100 105

<210> 15

<211> 409

<212> PRT

<213> Sphingomonas sp.

<400> 15

Met Arg Ser Ala Asp Val Val Ile Val Gly Ala Gly His Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gln Cys Ala Ile Ala Leu Arg Gln Ala Gly Tyr Glu Gly Ser Ile Ala

20 25 30

Leu Val Gly Arg Glu Asn Glu Val Pro Tyr Glu Arg Pro Pro Leu Ser

35 40 45

Lys Glu Tyr Phe Ser Arg Glu Lys Ser Phe Glu Arg Leu Tyr Ile Arg

50 55 60

Pro Pro Glu Phe Trp Arg Glu Lys Asp Ile His Leu Thr Leu Gly Ile
65 70 75 80
Glu Val Ser Ala Val Asp Pro Gly Ser Lys Val Leu Thr Leu Ser Asp
85 90 95
Gly Ser Ala Phe Ala Tyr Gly Gln Leu Val Trp Ala Thr Gly Gly Asp
100 105 110
Pro Arg Lys Leu Ala Cys Pro Gly Ala Glu Leu Ser Gly Val His Ala
115 120 125
Ile Arg Thr Arg Ala Asp Cys Asp Arg Leu Met Ala Glu Ile Asp Arg
130 135 140
Gly Leu Thr Gln Val Val Val Val Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Leu Glu
145 150 155 160
Ala Ala Ala Val Leu Thr Lys Leu Asn Cys His Val Thr Leu Leu Glu
165 170 175
Ala Met Pro Arg Val Leu Ala Arg Val Ala Gly Thr Glu Leu Ser Thr
180 185 190
Phe Tyr Glu Asn Glu His Arg Gly His Gly Val Asp Leu Arg Thr Gly
195 200 205
Ile Thr Val Ala Ala Leu Glu Gly Gln Glu Ser Val Thr Gly Val Arg
210 215 220
Leu Gly Asp Gly Ser Val Leu Pro Ala Gln Ala Val Ile Val Gly Ile
225 230 235 240
Gly Ile Val Pro Ala Val Ala Pro Leu Ile Glu Ala Gly Ala Ala Gly
245 250 255
Asp Gly Gly Val Thr Val Asp Glu Tyr Cys Arg Thr Ser Leu Pro Asp
260 265 270
Val Phe Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Phe Ser Cys Ser Phe Ala Asp
275 280 285
Gly Arg Val Leu Arg Val Glu Ser Val Gln Asn Ala Asn Asp Gln Ala
290 295 300
Ser Cys Val Ala Lys Thr Ile Cys Gly Asp Pro Gln Pro Tyr Arg Ala
305 310 315 320
Phe Pro Trp Phe Trp Ser Asn Gln Tyr Asp Leu Arg Leu Gln Thr Ala
325 330 335

Gly Leu Ser Leu Gly Tyr Asp Gln Thr Val Val Arg Gly Asp Pro Ala
 340 345 350
 Val Arg Ser Phe Ser Val Leu Tyr Leu Lys Gln Gly Arg Val Ile Ala
 355 360 365
 Leu Asp Cys Val Asn Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Gly Arg Lys Leu
 370 375 380
 Val Glu Ala Asn Val Cys Val Ser Pro Glu Gln Leu Val Asp Thr Gly
 385 390 395 400
 Leu Ala Leu Lys Asp Leu Ile Pro Val
 405
 <210> 16
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus erythropolis
 <400> 16
 Ser Ile Val Ile Ile Gly Ser Gly Gln Ala Gly Phe Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ser His Gly Phe Ser Gly Thr Ile Thr Leu Val Gly Asp
 20 25 30
 Glu Pro Gly Val Pro Tyr Gln Arg Pro Pro Leu Ser Lys Ala Tyr Leu
 35 40 45
 His Ser Asp Pro Asp Arg Glu Ser Leu Ala Leu Arg Pro Ala Gln Tyr
 50 55 60
 Phe Asp Asp His Arg Ile Thr Leu Thr Cys Gly Lys Pro Val Val Arg
 65 70 75 80
 Ile Asp Arg Asp Ala Gln Arg Val Glu Leu Ile Asp Ala Thr Ala Ile
 85 90 95
 Glu Tyr Asp His Leu Ile Leu Ala Thr Gly Ala Arg Asn Arg Leu Leu
 100 105 110
 Pro Val Pro Gly Ala Asn Leu Pro Gly Val His Tyr Leu Arg Thr Ala
 115 120 125
 Gly Glu Ala Glu Ser Leu Thr Ser Ser Met Ala Ser Cys Ser Ser Leu
 130 135 140
 Val Val Ile Gly Ala Gly Phe Ile Gly Leu Glu Val Ala Ala Ala Ala

145	150	155	160
Arg Lys Lys Gly Leu Asp Val Thr Val Val Glu Ala Met Asp Arg Pro			
	165	170	175
Met Ala Arg Ala Leu Ser Ser Val Met Ser Gly Tyr Phe Ser Thr Ala			
	180	185	190
His Thr Glu His Gly Val His Met Arg Leu Ser Thr Gly Val Lys Thr			
	195	200	205
Ile Asn Ala Ala Asp Gly Arg Ala Ala Gly Val Thr Thr Asn Ser Gly			
	210	215	220
Asp Val Ile His Ala Asp Ala Val Val Val Gly Ile Gly Val Val Pro			
225	230	235	240
Asn Ile Glu Leu Ala Ala Leu Thr Gly Leu Pro Val Asp Asn Gly Ile			
	245	250	255
Val Val Asp Glu Tyr Leu Arg Thr Pro Asp Glu Asn Ile Ser Ala Ile			
	260	265	270
Gly Asp Cys Ala Ala Tyr Pro Ile Pro Gly Lys Ala Gly Leu Val Arg			
	275	280	285
Leu Glu Ser Val Gln Asn Ala Val Asp Gln Ala Arg Cys Leu Ala Ala			
	290	295	300
Gln Leu Thr Gly Thr Ser Thr His Tyr Arg Ser Val Pro Trp Phe Trp			
305	310	315	320
Ser Glu Gln Tyr Glu Ser Lys Leu Gln Met Ala Gly Leu Thr Ala Gly			
	325	330	335
Ala Asp Thr His Val Val Arg Gly Ser Val Asp Ser Gly Val Phe Ser			
	340	345	350
Ile Phe Cys Phe Leu Gly Thr Arg Leu Leu Gly Val Glu Ser Val Asn			
	355	360	365
Lys Pro Arg Asp His Met Ala Ala Arg Lys Ile Leu Ala Thr Glu Met			
	370	375	380
Pro Leu Thr Pro Glu Gln Ala Ala Asp Thr Asp Phe Asp Leu Lys Leu			
385	390	395	400
Ala Ile Ala Arg His Lys Asp Thr His Glu Lys Asp Glu Val Ala Ser			
	405	410	415
Ala Asp Ile Gly Glu Arg Gln Val Val Ala Ser			

420 425

<210> 17

<211> 422

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 17

Met Asn Ala Asn Asp Asn Val Val Ile Val Gly Thr Gly Leu Ala Gly

1 5 10 15

Val Glu Val Ala Phe Gly Leu Arg Ala Ser Gly Trp Glu Gly Asn Ile

20 25 30

Arg Leu Val Gly Asp Ala Thr Val Ile Pro His His Leu Pro Pro Leu

35 40 45

Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Ala Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Leu

50 55 60

Arg Thr Pro Asp Ala Tyr Ala Ala Gln Asn Ile Gln Leu Leu Gly Gly

65 70 75 80

Thr Gln Val Thr Ala Ile Asn Arg Asp Arg Gln Gln Val Ile Leu Ser

85 90 95

Asp Gly Arg Ala Leu Asp Tyr Asp Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Gly

100 105 110

Arg Pro Arg Pro Leu Pro Val Ala Ser Gly Ala Val Gly Lys Ala Asn

115 120 125

Asn Phe Arg Tyr Leu Arg Thr Leu Glu Asp Ala Glu Cys Ile Arg Arg

130 135 140

Gln Leu Ile Ala Asp Asn Arg Leu Val Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile

145 150 155 160

Gly Leu Glu Val Ala Ala Thr Ala Ile Lys Ala Asn Met His Val Thr

165 170 175

Leu Leu Asp Thr Ala Ala Arg Val Leu Glu Arg Val Thr Ala Pro Pro

180 185 190

Val Ser Ala Phe Tyr Glu His Leu His Arg Glu Ala Gly Val Asp Ile

195 200 205

Arg Thr Gly Thr Gln Val Cys Gly Phe Glu Met Ser Thr Asp Gln Gln

210 215 220

Lys Val Thr Ala Val Leu Cys Glu Asp Gly Thr Arg Leu Pro Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Ala Gly Ile Gly Leu Ile Pro Asn Cys Glu Leu Ala Ser
 245 250 255
 Ala Ala Gly Leu Gln Val Asp Asn Gly Ile Val Ile Asn Glu His Met
 260 265 270
 Gln Thr Ser Asp Pro Leu Ile Met Ala Val Gly Asp Cys Ala Arg Phe
 275 280 285
 His Ser Gln Leu Tyr Asp Arg Trp Val Arg Ile Glu Ser Val Pro Asn
 290 295 300
 Ala Leu Glu Gln Ala Arg Lys Ile Ala Ala Ile Leu Cys Gly Lys Val
 305 310 315 320
 Pro Arg Asp Glu Ala Ala Pro Trp Phe Trp Ser Asp Gln Tyr Glu Ile
 325 330 335
 Gly Leu Lys Met Val Gly Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Arg Ile Ile Val
 340 345 350
 Arg Gly Ser Leu Ala Gln Pro Asp Phe Ser Val Phe Tyr Leu Gln Gly
 355 360 365
 Asp Arg Val Leu Ala Val Asp Thr Val Asn Arg Pro Val Glu Phe Asn
 370 375 380
 Gln Ser Lys Gln Ile Ile Thr Asp Arg Leu Pro Val Glu Pro Asn Leu
 385 390 395 400
 Leu Gly Asp Glu Ser Val Pro Leu Lys Glu Ile Ile Ala Ala Ala Lys
 405 410 415

Ala Glu Leu Ser Ser Ala
 420

<210> 18

<211> 409

<212> PRT

<213> Pseudomonas sp.

<400> 18

Met Gly Glu Arg Arg Asp Thr Thr Val Ile Val Gly Ala Gly His Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Ala Ala Ala Phe Phe Leu Arg Glu Phe Gly Tyr His Gly Arg

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

290 295 300
 Arg Leu Val Ala Ala Arg Leu Ser Gly Arg Pro Val Pro Pro Val Gln
 305 310 315 320
 Thr Pro Trp Phe Trp Ser Asp Gln Leu Gln Ala Arg Ile Asn Leu Ala
 325 330 335
 Gly Glu Arg Pro Ala Gln Gly Gln Val Ile Val Arg Arg Tyr Gly Gly
 340 345 350
 Asp Lys Val Ser Met Leu Tyr Leu Gln Asp Gln Gln Leu Val Ala Ile
 355 360 365
 Glu Ala Cys Asn Met Pro Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Arg Ala Ile
 370 375 380
 Gly Gln Asn His Ser Leu Asp Leu Ala Arg Leu Val Asp Ala Asp Val
 385 390 395 400
 Pro Leu Lys Asp Ala Leu His Phe Ala

405

<210> 19

<211> 274

<212> DNA

<213> Pisum sativum

<400> 19

gaattcccat ggcccgggaa tctctcgta atggtggcaa ataggaaaga gtctcaaact	60
tcttctttcc aattggaggc cacacctgca tgcactttac tcttcacca ttgcttgtaa	120
tggaagtaat gtcagtgttg accttcctca ctgggaatcc agtcatggat ttgaggccgc	180
cgaatggagc cattgcggcg gattgcccc tagaggcacg gctgactgtt gtcacagcgg	240
aagaggatat catagaagcc atggatcctc taga	274