

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2006년03월10일
C12N 15/00 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0558838
C12N 15/52 (2006.01)	(24) 등록일자	2006년03월02일

(21) 출원번호	10-1999-7009092	(65) 공개번호	10-2001-0006014
(22) 출원일자	1999년10월04일	(43) 공개일자	2001년01월15일
번역문 제출일자	1999년10월04일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/006589	(87) 국제공개번호	WO 1998/45424
국제출원일자	1998년04월03일	국제공개일자	1998년10월15일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 가나, 시에라리온, 인도네시아, 기니비사우,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장	60/042,666	1997년04월04일	미국(US)
	60/042,941	1997년04월04일	미국(US)

(73) 특허권자 보드 오브 리젠츠 오브 디 유니버시티 오브 네브라스카
미국 네브라스카 68503 링컨 홀드레지 스트리트 3835

(72) 발명자 위크스도날드피.
미국네브라스카68510링컨레이니어드라이브6340

왕지아오주오
미국노스캐롤라이나27516채플힐트레몬트써클211

허르만패트리시아엘.
미국네브라스카68462웨이버리록크리크로드9200

(74) 대리인 특허법인 신성

심사관 : 김재현

본 발명은 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 효소들, 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 분리된 DNA 분자들, 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 DNA 구조체들, 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자이식 숙주 세포들, 및 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 DNA를 포함하는 하나 또는 그 이상의 세포들을 포함하는 유전자이식 식물들 및 식물의 부분들을 제공한다. 디캄바-분해 효소들의 발현은 디캄바-내성 식물들을 포함하여, 디캄바-분해 유기체들의 생산을 낳는다. 또한, 본 발명은 본 발명의 유전자이식 디캄바-내성 식물들을 포함하는 서식지에서 잡초들을 통제하는 방법 및 본 발명의 유전자이식 미생물 또는 디캄바-분해 효소의 유효량을 디캄바를 포함하는 물질에 적용하는 단계를 포함하는, 디캄바를 포함하는 물질을 정화시키는 방법을 제공한다. 마지막으로, 본 발명은 디캄바 내성에 기초하여 형질전환된 식물들 및 식물 세포들을 선택하는 방법 및 디캄바 분해의 결과로서 생성되는 3,6-디클로로살리실산의 형광에 기초하여 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들 및 유기체의 부분들을 선택하거나 스크리닝하는 방법을 제공한다.

대표도

도 1

색인어

디캄바, O-디메틸라제, 옥시게나제, 페레독신, 환원효소, O-디메틸화, 3,6-디클로로살리실산, 디캄바 내성, 디캄바 분해

명세서

기술분야

본 발명은 제초제 디캄바(dicamba)를 분해할 수 있는 유전자이식 유기체들(transgenic organisms)에 관한 것이다. 이 유전자이식 유기체들은 디캄바에 내성이 있도록 만들어진 유전자이식 식물들을 포함한다. 또한, 본 발명은 디캄바-분해 효소들(dicamba-degrading enzymes) 및 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 DNA 분자들 및 DNA 구조체들(DNA constructs)에 관한 것이다. 더 나아가, 본 발명은 디캄바-내성 유전자이식 식물들의 사용지들(fields)에서 잡초들을 통제(control)하는 방법 및 디캄바로 오염된 물질들로부터 디캄바를 제거하는 방법에 관한 것이다(생물치료; bioremediation). 마지막으로, 본 발명은 디캄바 내성(tolerance)에 기초하거나 또는 디캄바 분해의 결과로서 생성되는 3,6-디클로로살리실산(3,6-dichlorosalicylic acid)의 형광을 검출하는 것에 기초하여 형질전환체들(transformants)를 선택하는 방법들에 관한 것이다.

배경기술

제초제들은 농업적 생산에서 일상적으로 사용된다. 이들의 효과는 종종 농작물 사용지들(crop fields)에서 잡초 성장을 죽이는 이들의 능력 및 제초제에 대한 환금 농작물(換金 農作物; cash crop)의 내성에 의하여 결정된다. 만약 환금 농작물이 제초제에 내성이 없다면, 제초제는 환금 농작물의 생산성을 감소시키거나 또는 환금 농작물을 함께 죽일 것이다. 반대로, 만약 제초제가 충분히 강하지 않다면, 그것은 농작물 사용지에서 너무 많은 잡초가 성장하게 하고, 그럼으로써 환금 농작물의 생산성을 감소시킬 것이다. 그러므로, 제초제들에 내성을 가지는 경제적으로 중요한 식물들을 생산하는 것이 요구된다. 물과 농지의 환경 품질을 보호하기 위하여, 제초제를 우연히 엮지른 경우 또는 받아들이 수 없는 높은 정도의 토양 또는 물의 오염의 경우에 제초제들을 분해하는 기술들을 개발하는 것 역시 요구된다.

제초제들 및 다른 외래의 것을 싫어하는(xenophobic) 화합물들을 불활성화시키는 효소를 엔코딩하는 유전자들은 이전에 다양한 원핵생물 및 진핵생물의 유기체들로부터 분리되었다. 어떤 경우들에서, 이러한 유전자들은 식물들에서 성공적인 발현을 위하여 유전공학적으로 처리되었다. 이 접근 방법을 통하여, 제초제들 2,4-디클로로페녹시아세트산 (Streber 및 Willmitzer (1989) Bio/Technology 7:811-816; 2,4-D), 브로모자이닐(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 포스피노트리신(phosphinothricin) (De Block et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518; 상표명 Basta)에 내성을 가지는 식물들이 개발되었다.

디캄바(상표명 Banvel)는 일년생 및 다년생 넓은 잎(broadleaf) 잡초들 및 옥수수, 사탕수수(sorghum), 작은 곡물들, 목초, 건초, 서식지(rangeland), 사탕수수(sugarcane), 아스파라거스(asparagus), 잔디 및 풀 종자 농작물들에서 다양한 연초록색의 잡초들(grassy weeds)을 통제하기 위한 사전-긴급 및 사후-긴급 제초제(pre-emergent and post-emergent herbicide)로서 사용된다. Crop Protection Reference, 1803-1821쪽 (Chemical & Pharmaceutical Press, Inc., New

York, NY, 11th ed., 1995)를 보라. 불행하게도, 디캄바는 (강낭콩, 대두, 목화, 완두콩, 감자, 해바라기, 토마토, 담배 및 과일 나무를 포함하는) 많은 상업적 농작물들, 장식 식물들 및 나무들 그리고 넓은 잎 식물들과 접촉하게 될 때, 상처를 줄 수 있다 (동일문헌들). 디캄바는 화학적으로 안정하고 종종 환경에서 분해되기 어렵다.

디캄바는 벤조산 제조제의 부류에 속한다. 디캄바를 포함하는 벤조산 제조제에 내성을 가지는 식물들은 1-아미노시클로 프로판-1-카르복실산(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACC) 신타제(synthase) 안티센스 유전자, ACC 산화 효소(oxidase) 안티센스 유전자, ACC 디아미나제(deaminase) 유전자 또는 이들의 조합을 식물들에 병합시킴으로써 생산 될 수 있다고 제안되었다. 캐나다 특허 출원 제2,165,036호(1996년 6월 16일 공표)를 보라. 그러나, 이 출원에는 그러한 내성을 보여주는 실험적 데이터는 제시되지 않았다. 디캄바를 물질대사로 변화시키는 박테리아는 알려져 있다. 미국 특허 제5,445,962호; 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 보라. 이러한 박테리아에 의한 디캄바 물질대사를 맡고 있는 특정 유전자들이 분리되고 디캄바-저항성 식물들 및 다른 유기체들을 생산하는 데 사용될 수 있었다고 제안되었다. 상기의 동일한 문헌들 및 Yang 등의 Anal. Biochem., 219:37-42 (1994)를 보라. 그러나, 본 발명 전에, 그러한 유전자들이 확인되고 분리되지는 못했다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 모두 아래에서 정의하고 설명하는 바와 같은, 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 O-디메틸라제, 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 옥시게나제, 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 페레독신(ferredoxin), 및 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 환원효소(reductase)를 제공한다.

또한, 본 발명은 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자, 및 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 분리된 DNA 분자를 제공한다. 더 나아가, 본 발명은 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체 및 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체를 제공한다.

또한, 본 발명은 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자가식 숙주 세포(host cell) 및 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자가식 숙주 세포를 제공한다. 유전자가식 숙주 세포는 모두 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 옥시게나제 및 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA를 포함한다. 유전자가식 숙주 세포는 식물 세포 또는 원핵 또는 진핵의 미생물일 수 있다.

게다가, 본 발명은 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA를 포함하는 하나 또는 그 이상의 세포들을 포함하는 유전자가식 식물 또는 식물의 부분을 제공한다. 식물 또는 식물의 부분의 하나 또는 그 이상의 세포들은 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 페레독신을 코딩하는 DNA를 더 포함할 수 있다. 유전자가식 식물 또는 식물의 부분은 디캄바에 대하여 내성적이거나 디캄바-분해 옥시게나제의 발현 또는 디캄바-분해 옥시게나제 및 페레독신의 발현의 결과로서 증가하는 디캄바에 대한 내성을 가진다.

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자가식 디캄바-내성 식물들을 포함하는 서식지에서 잡초들을 통제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 잡초들을 통제하기에 유효한 양의 디캄바를 서식지에 적용하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명은 디캄바를 함유하는 물질을 정화하는 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 이 방법은 유효량의 본 발명의 유전자가식 디캄바-분해 미생물을 그 물질에 적용하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 이 방법은 유효량의 디캄바-분해 O-디메틸라제 또는 디캄바-분해 옥시게나제, 디캄바-분해 페레독신 및 디캄바-분해 환원효소의 조합을 그 물질에 적용하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명은 선택 마커로서 디캄바 내성을 사용하여 형질전환된 식물 세포들 및 형질전환된 식물들을 선택하는 방법을 제공한다. 한 실시예에서, 이 방법은 본 발명에 따른 DNA 구조체를 가지는 식물 세포들의 군집에서 최소한 어느 정도의 그 식물 세포들을 형질전환시키는 단계 및 획득된 식물 세포들의 군집을 형질전환된 식물 세포들은 성장하고 형질전환되지 않은 식물 세포들은 성장하지 못하도록 선택된 농도에서 디캄바를 함유하는 배양 배지에서 성장시키는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 이 방법은 디캄바 분해를 위해 마련된 본 발명에 따른 DNA 구조체를 포함하는 것으로 짐작되는 식물들의 군집에 디캄바를 적용하는 단계를 포함한다. 여기에서, 디캄바는 형질전환된 식물들은 성장하고 형질전환되지 않은 식물들의 성장은 억제되도록 선택된 양으로 적용된다.

마지막으로, 본 발명은 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들 및 유기체들의 부분들을 선택하거나 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이 방법은 디캄바 분해를 위하여 마련된 본 발명에 따른 DNA 구조체를 포함하는 것으로 짐작되는 숙주 세포들, 완전한 유기체들 또는 유기체들의 부분들의 군집을 준비하는 단계 및 3,6-디클로로살리실산에 기인하는 형광의 존재 또는 정도를 확인하는 단계를 포함한다. 3,6-디클로로살리실산은 디캄바의 분해의 결과로서 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들 또는 유기체들의 부분들에서 생성되지만, 형질전환되지 않은 숙주 세포들, 완전한 유기체들 또는 유기체들의 부분들에서는 생성되지 않을 것이다.

이전의 연구들 (Cork 및 Kreuger, *Advan. Appl. Microbiol.* 36:1-56 그리고 Yang et al. (1994) *Anal. Biochem.* 219:37-42)은 토양 박테리아, 수도모나스 말토피리아(*Pseudomonas maltophilia*), 스트레인(strain) DI-6가 디캄바(3,6-디클로로-2-메톡시벤조산)이 3,6-디클로로살리실산(3,6-DCSA)으로 변화되는 한 단계의 반응을 통하여 디캄바의 제조 활성을 파괴할 수 있다는 것을 보여주었다. 3,6-DCSA는 제조 활성을 가지지 않으며, 식물들에 대하여 어떠한 해로운 효과를 보여주지도 않았다. 게다가, 3,6-DCSA는 토양에 존재하는 보통의 박테리아 군집(flora)에 의하여 쉽게 분해된다.

여기에서 설명된 실험들은 O-디메틸라제가 P. 말토피리아 스트레인 DI-6에 의한 3,6-DCSA로의 디캄바의 변환에 대한 책임이 있다는 Yang 등(동일한 문헌을 참조하라)의 가설을 확인하고, O-디메틸라제가 환원효소, 페레독신 및 옥시게나제로 구성되는 삼-성분 효소 시스템이라는 것을 확립한다. P. 말토피리아 O-디메틸라제 및 그것의 삼 성분들의 분리, 정제 및 특성을 상세하게 서술하는 실시예 1을 보라. 디캄바 O-디메틸라제의 삼 성분들에 의하여 촉매되는 반응에 대한 반응 구도는 도 1에 제시되어 있다. 도 1에 도시된 바와 같이, NADH로부터의 전자들은 환원효소 및 페레독신으로 구성되는 짧은 전자 사슬을 통하여 3,6-DCSA를 생산하는 디캄바의 산화를 촉매하는 말단 옥시게나제로 왕복적으로 수송된다.

제1 실시예에 있어서, 본 발명은 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 효소들을 제공한다. "분리된"은 효소들이 생산된 (즉, 세포 용해물(cell lysate)에 포함된) 그 세포로부터 최소한 제거되는 것을 의미하는 것으로 여기에서 사용된다. "최소한 부분적으로 정제된"은 그것들이 세포 용해물의 다른 성분들로부터 최소한 부분적으로 분리되는 것을 의미하는 것으로 여기에서 사용된다. 바람직하게, 효소들은 효소 제제들이 최소한 약 70% 균등질이 될 정도로 충분히 정제되었다.

특히, 본 발명은 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 O-디메틸라제를 제공한다. "디캄바-분해 O-디메틸라제"는 모두 아래에서 정의되는 디캄바-분해 옥시게나제, 디캄바-분해 페레독신 및 디캄바-분해 환원효소의 조합을 의미하는 것으로 여기에서 정의된다.

또한, 본 발명은 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 옥시게나제를 제공한다. "디캄바-분해 옥시게나제"는 P. 말토피리아 스트레인 DI-6으로부터 정제된 옥시게나제 및 P. 말토피리아 옥시게나제의 것에 대하여 최소한 약 65% 상동관계, 바람직하게는 최소한 약 85% 상동관계인 아미노산 서열을 가지고 디캄바의 분해에 참여할 수 있는 옥시게나제들을 의미하는 것으로 여기에서 정의된다. "디캄바-분해 옥시게나제들"은 P. 말토피리아 옥시게나제의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 옥시게나제들을 포함하며, 여기에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산들이 P. 말토피리아 옥시게나제 서열의 아미노산들에 대하여 추가되거나, 제거되거나, 치환되었다. 디캄바-분해 옥시게나제들의 활성은 실시예 1에서 설명하는 바와 같이 결정될 수 있다.

또한, 본 발명은 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 페레독신을 제공한다. "디캄바-분해 페레독신"은 P. 말토피리아 스트레인 DI-6으로부터 정제된 페레독신 및 P. 말토피리아 페레독신의 것에 대하여 최소한 약 65% 상동관계, 바람직하게는 최소한 약 85% 상동관계인 아미노산 서열을 가지며 디캄바의 분해에 참여할 수 있는 페레독신들을 의미하는 것으로 여기에서 정의된다. "디캄바-분해 페레독신들"은 P. 말토피리아 페레독신의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 페레독신들을 포함하며, 여기에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산들이 P. 말토피리아 페레독신 서열의 아미노산들에 대하여 추가되거나 제거되거나 치환되었다. 디캄바-분해 페레독신들의 활성은 실시예 1에서 설명하는 바와 같이 결정될 수 있다.

마지막으로, 본 발명은 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 환원효소를 제공한다. "디캄바-분해 환원효소"는 P. 말토피리아 스트레인 DI-6으로부터 정제된 환원효소 및 P. 말토피리아 환원효소의 것에 대하여 최소한 약 65% 상동관계, 바람직하게는 최소한 약 85% 상동관계인 아미노산 서열을 가지며 디캄바의 분해에 참여할 수 있는 환원효소들을 의미하는 것으로 여기에서 정의된다. "디캄바-분해 환원효소들"은 P. 말토피리아 환원효소의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 환원효소들을 포함하며, 여기에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산들이 P. 말토피리아 환원효소 서열의 아미노산들에 대하여 추가되거나 제거되거나 치환되었다. 디캄바-분해 환원효소들의 활성은 실시예 1에서 설명하는 바와 같이 결정될 수 있다.

아미노산 서열들의 상동관계의 정도를 결정하는 방법들은 본 발명의 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 유전학 컴퓨팅 그룹(Genetics Computing Group; GCG) 소프트웨어 패키지의 FASTA 프로그램 (WI, 매디슨 소재의 위스콘신 대학)은 스위스 단백질 데이터베이스와 같은 다양한 단백질 데이터베이스들에서 서열들을 비교하기 위하여 사용될 수 있다.

본 발명의 디캄바-분해 효소들은 P. 말토피리아 또는 다른 유기체들로부터 실시예 1에서 설명하는 바와 같이 분리되고 정제될 수 있다. 적합한 다른 유기체들은 디캄바를 분해하는 P. 말토피리아 스트레인 DI-6와는 다른 박테리아를 포함한다. 그러한 박테리아의 여러 가지 스트레인들이 알려져 있다. 미국 특허 제5,445,962호; 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 보라. 다른 디캄바-분해 박테리아 스트레인들은 본 발명의 분야에서 잘 알려져 있는 방법들에 의하여 이러한 스트레인들과 마찬가지로 분리될 수 있다.

그러나, 바람직하게, 본 발명의 디캄바-분해 효소들은 재조합 DNA 기술들을 사용하여 제조될 수 있다(아래 참조). 특히, P. 말토피리아 서열의 아미노산들에 대하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 서열들이 추가되거나 제거되거나 또는 치환된, P. 말토피리아 효소의 아미노산 서열을 가지는 돌연변이 효소들은 예를 들어, 올리고뉴클레오티드-유도된 유전자변이 (mutagenesis), 링커-스캐닝(linker-scanning) 유전자변이, 중합효소 사슬 반응을 이용하는 유전자변이 등을 사용하는 이 방식으로 제조된다. Ausubel 등 (eds.), Current Protocols In Molecular Biology (Wiley Interscience 1990) 및 McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)을 보라.

제2 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 분리된 DNA 분자들을 제공한다. "분리된"은 DNA 분자가 그것의 자연 환경으로부터 제거되었거나 또는 자연적으로 발생하는 DNA 분자가 아닌 것을 의미하는 것으로 여기에서 사용된다. 이러한 DNA 분자들을 제조하는 방법들은 본 발명의 분야에서 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 보라.

예를 들어, 본 발명의 DNA 분자들은 분리된 cDNA 또는 게놈 클론들일 수 있다. P. 말토피리아 스트레인 DI-6의 디캄바-분해 옥시게나제 및 페레독신을 코딩하는 클론들의 확인 및 분리는 실시예 2 및 3에서 설명된다. 디캄바-분해 환원효소들을 코딩하는 클론들을 포함하여, 디캄바-분해 효소들을 코딩하는 추가의 클론들은 유사한 방식으로 얻어질 수 있다. 분리된 클론들 또는 그들의 부분들은 그 클론들이 최초로 분리된 것들과는 다른 유기체들로부터 추가적인 클론들을 확인하고 분리하기 위한 프로브들로서 사용될 수 있다. 적합한 유기체들은 디캄바를 분해하는 박테리아를 포함한다. 상기에서 지적한 바와 같이, P. 말토피리아 스트레인 DI-6에 더하여, 디캄바를 분해하는 다양한 박테리아의 스트레인들이 알려져 있다. 미국 특허 제5,445,962호; 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 보라.

또한, 본 발명의 DNA 분자들은 분리된 클론들의 서열들을 이용하여 화학적으로 합성될 수도 있다. 그러한 기술들은 본 발명의 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, DNA 서열들은 자동화 DNA 합성기에서의 포스포아미디트(phosphoramidite) 화학에 의하여 합성될 수 있다. 화학적 합성은 많은 이점들을 가지고 있다. 특히, DNA 서열이 발현될 숙주에 의해 선호되는(preferred) 코돈들이 발현을 최적화하는 데 사용될 수 있기 때문에 화학적 합성은 바람직하다. 모든 코돈들이 개선된 발현을 획득하기 위하여 변경될 필요는 없지만, 바람직하게는 최소한 숙주에서 드물게 사용되는 코돈들은 숙주-선호 코돈들로 변경된다. 발현의 높은 수준들은 숙주-선호 코돈들에 대하여 그 코돈들의 약 50% 이상, 보다 바람직하게는 최소한 약 80%를 변경함에 의하여 획득될 수 있다. 많은 숙주의 코돈 선호들이 알려져 있다. 예를 들어, Maximizing Gene Expression, 225-85쪽 (Reznikoff & Gold, eds., 1986), PCT WO 97/31115, PCT WO 97/11086, EP 646643, EP 553494 및 미국 특허 제5,689,052호, 제5,567,862호, 제5,567,600호, 제5,552,299호 및 제5,017,692호를 보라. 다른 숙주 세포들의 코돈 선호들은 본 발명의 분야에서 알려진 방법들에 의하여 추론될 수 있다. 또한, 화학적 합성을 이용하여, DNA 분자의 서열 또는 그것의 엔코딩된 단백질은 예를 들어, 발현을 최적화하도록 (예를 들어, 전사 또는 번역을 방해하는 mRNA 2차 구조들을 제거하도록), 편리한 자리들에 유일한 제한 자리들을 첨가하도록, 프로테아제 절단 자리들을 삭제하도록 하는 등의 변경을 쉽게 할 수 있다.

제3의 실시예에 있어서, 본 발명은 발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 디캄바-분해 효소를 코딩하는 DNA를 포함하는 DNA 구조체들을 제공한다. "DNA 구조체들"은 DNA를 숙주 세포들에 도입하는 데 유용한 구축된 (자연적으로 발생하는 것이 아닌) DNA 분자들로 여기에서 정의되며, 이 용어는 키메라 유전자들, 발현 카세트들 및 벡터들을 포함한다.

여기에서 사용된 바와 같은 "작용적으로 연결된"은 엔코딩된 단백질들이 발현되는 방식으로 (서열들의 순서, 서열들의 방향성, 및 다양한 서열들의 상대적 공간을 포함하는) DNA 서열들의 연결을 말한다. 코딩 서열들에 발현 제어 서열들을 작

용적으로 연결하는 방법들은 본 발명의 분야에서 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 보라.

"발현 제어 서열들"은 원핵생물들 또는 진핵생물들에서 전사 또는 번역의 제어에서 어떤 방식으로든 관여하는 DNA 서열들이다. 적합한 발현 제어 서열들 및 그것들을 만들고 사용하는 방법들은 본 발명의 분야에서 잘 알려져 있다.

발현 제어 서열들은 프로모터를 포함해야 한다. 프로모터는 선택된 숙주 세포 또는 유기체에서 전사 활성을 보이는 임의의 DNA 서열일 수 있다. 프로모터는 유도된 것이거나 만들어진 것일 수 있다. 그것은 자연발생적인 것이거나, 다양한 자연발생적인 프로모터들의 부분으로 구성되거나 또는 부분적으로 또는 완전히 합성된 것일 수 있다. 프로모터들의 설계에 대한 지침은 Harley 및 Reynolds의 Nucleic Acids Res., 15, 2343-61 (1987)의 것과 같은 프로모터 구조의 연구들에 의하여 제공된다. 또한, 전사 시작점에 대한 프로모터의 위치는 최적화될 수 있다. 예를 들어, Roberts 등의 Proc. Natl Acad. Sci. USA, 76, 760-4(1979)를 보라. 원핵생물들 및 진핵생물들에서 사용하기 위한 많은 적합한 프로모터들이 본 발명의 분야에서 잘 알려져 있다.

예를 들어, 식물들에서 사용하기 위하여 만들어진 적합한 프로모터들은 다음의 것을 포함한다: 양배추꽃 모자이크 바이러스 유래의 35S 프로모터 (Odell et al., Nature 313:810-812 (1985)), 클로렐라 바이러스 메틸트랜스퍼라제 유전자들의 프로모터들 (미국 특허 제5,563,328호), 및 현삼(figwort) 모자이크 바이러스 유래의 완전한 길이의 전사 프로모터 (미국 특허 제5,378,619호)와 같은 식물 바이러스들 유래의 프로모터들; 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)과 같은 유전자들 유래의 프로모터들; 및 다양한 아그로박테리움 유전자들의 프로모터들 (미국 특허 제4,771,002호, 제5,102,796호, 제5,182,200호, 제5,428,147호).

식물들에서 사용하기 위한 적합한 유도(inducible) 프로모터들은 다음의 것을 포함한다: 구리에 응답하는 ACE1 시스템 유래의 프로모터 (Mett et al., PNAS 90:4567-4571 (1993)); 벤젠술폰아미드 제조제 완화제들에 응답하는 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 Tn10으로부터의 Tet 억제자의 프로모터 (Gatz et al., Mol. Gen. Genet. 227:229-237 (1991)). 식물들에서 사용하기 위한 특히 바람직한 유도 프로모터는 식물들이 보통 반응하지 않는 유도제에 반응하는 것이다. 이 형태의 유도 프로모터의 예는 스테로이드 호르몬 유전자 유래의 프로모터이며, 이것의 전사 활성은 글루코코르티코스테로이드 호르몬(glucocorticosteroid hormone)에 의하여 유도된다 (Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421 (1991)). 식물들에서 사용하기 위한 다른 유도 프로모터들은 EP 332104, PCT WO 93/21334 및 PCT WO 97/06269에 서술되어 있다.

박테리아에서 사용하기 위한 적합한 프로모터들은 바실러스 스테아로테르모필러스(Bacillus Stearothermophilus) 말토제닉(maltogenic) 아밀라제 유전자, 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis) 알파-아밀라제 유전자, 바실러스 아밀롤리퀴파시엔스(Bacillus amyloliquefaciens) BAN 아밀라제 유전자, 바실러스 썩틸리스(Bacillus subtilis) 알칼라인 프로테아제 유전자, 바실러스 푸밀러스(Bacillus pumilus) 자일로시다제(xylosidase) 유전자의 프로모터, 파지 람다 P_R 및 P_L 프로모터들 및 에셰리치아 콜리(Escherichia coli) lac, trp 및 tac 프로모터들을 포함한다.

이스트 숙주 세포들에 사용하기 위한 적합한 프로모터들은 이스트 글리콜리틱(glycolytic) 유전자들 유래의 프로모터들, 알콜 디히드로제나제 유전자들 유래의 프로모터들, TPI1 프로모터, 및 ADH2-4c 프로모터를 포함한다. PCT WO 96/23898을 보라.

실모양의 진균류에서 사용하기 위한 적합한 프로모터들은 ADH3 프로모터, tpiA 프로모터, 아스페르길러스 오리제(Aspergillus oryzae) TAKA 아밀라제, 리조무코르 미에헤이(Rhizomucor miehei) 아스파르틱(aspartic) 프로테이나제, 아스페르길러스 니거(Aspergillus niger) 중성 알파-아밀라제, A. 니거 산 안정 알파-아밀라제(acid stable alpha-amylase), A. 니거 또는 아스페르길러스 아와모리(Aspergillus awamori) 글루코아밀라제, R. 미에헤이 리파제, A. 오리제(A. oryzae) 염기성 프로테아제, A. 오리제 트리오스 포스페이트 이소메라제(triose phosphate isomerase) 및 아스페르길러스 니둘란스(Aspergillus nidulans) 아세트아미다제(acetamidase)를 엔코딩하는 유전자들의 프로모터들을 포함한다. PCT WO 96/23898을 보라.

포유동물의 세포들에서 사용하기 위한 적합한 프로모터들은 SV40 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 유전자 프로모터, 쥐와 동물의 유방 종양 바이러스 프로모터, 로우스 육종(sarcoma) 바이러스 프로모터, 및 아데노바이러스 2 주요 늦은 프로모터 (adenovirus 2 major late promotor)를 포함한다. PCT WO 96/23898 및 PCT WO 97/42320을 보라.

곤충 세포들에서 사용하기 위한 적합한 프로모터들은 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터, P10 프로모터, 오토그라파 칼리포르니카(Autographa californica) 폴리헤드로시스(polyhedrosis) 바이러스 기반 단백질 프로모터, 바쿨로바이러스 아주 초기 유전자 1 프로모터(baculovirus immediate early gene 1 promotor) 및 바쿨로바이러스 39K 지연된-초기 유전자 프로모터(Baculovirus 39K delayed-early gene promotor)를 포함한다. PCT WO 96/23898을 보라.

마지막으로, 다른 프로모터들의 부분들 및 부분적인 또는 완전한 합성 프로모터들로 구성되는 프로모터들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 식물들에서 사용하기 위한 그러한 프로모터들을 서술하고 있는 Ni et al., Plant J., 7:661-676 (1995) 및 PCT WO 95/14098을 보라.

프로모터는 하나 또는 그 이상의 인헨서 요소들을 포함하거나 또는 포함하여 변형될 수 있다. 바람직하게, 프로모터는 복수의 인헨서 요소들을 포함할 것이다. 인헨서 요소들을 함유하는 프로모터들은 그것들을 포함하지 않는 프로모터들과 비교하여 높은 레벨들의 전사를 위하여 마련된다. 식물들에서 사용하기 위한 적합한 인헨서 요소들은 양배추꽃 모자이크 바이러스 유래의 35S 인헨서 요소 (미국 특허 제5,106,739호 및 제5,164,316호) 및 현삼 모자이크 바이러스 유래의 인헨서 요소 (Maiti et al., Transgenic Res., 6, 143-156 (1997))을 포함한다. 다른 세포들에서 사용하기 위한 다른 적합한 인헨서들은 알려져 있다. PCT WO 96/23898 및 Enhancers And Eukaryotic Expression (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1983)을 보라.

효율적인 발현을 위하여, 코딩 서열들은 또한, 바람직하게, 3'번역되지 않는 서열(3'untranslated sequence)에 작용적으로 연결된다. 3'번역되지 않는 서열은 전사 및/또는 번역 말단 서열들을 함유한다. 3'번역되지 않는 영역들은 박테리아, 식물 또는 다른 진핵생물 세포들 유래의 유전자들의 측면 영역들(flanking regions)로부터 획득될 수 있다. 원핵생물들에서 사용하기 위하여, 3'번역되지 않는 영역은 전사 말단 서열을 포함할 것이다. 식물들 및 다른 진핵생물들에서 사용하기 위하여, 3'번역되지 않는 영역은 전사 말단 서열 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 것이다. 식물들에서 사용하기 위한 적합한 3'번역되지 않는 서열들은 양배추꽃 모자이크 바이러스 35S 유전자, 파세올린(phaseolin) 종자 저장 단백질 유전자, 완두콩 리블로스 바이오포스페이트 카르복실라제 작은 하부단위 E9 유전자, 대두 7S 저장 단백질 유전자들, 옥토피(octopine) 신타제 유전자, 및 노팔린(nopaline) 신타제 유전자의 그것들을 포함한다.

식물들 및 다른 진핵생물들에서, 5'번역되지 않는 서열이 역시 채용된다. 5'번역되지 않는 서열은 5'CAP 자리로부터 번역 시작 코돈으로 연장되는 mRNA의 부분이다. mRNA의 이 영역은 진핵생물들에서 번역 시작을 위하여 필요하며 유전자 발현의 조절에 있어서 어떤 역할을 한다. 식물들에서 사용하기 위한 적합한 5'번역되지 않는 영역들은 알팔파(alfalfa) 모자이크 바이러스, 오이 모자이크 바이러스 코트 단백질 유전자 및 담배 모자이크 바이러스의 그것들을 포함한다.

상기에서 언급한 바와 같이, DNA 구조체는 벡터일 수 있다. 벡터는 벡터가 숙주 세포들에서 복제되도록 하는 하나 또는 그 이상의 복제 시스템들을 함유한다. 자체-복제 벡터들은 플라스미드들, 코스미드들 및 바이러스 벡터들을 포함한다. 이와 다르게, 벡터는 융합된 벡터(integrating vector)일 수 있으며, 이것은 본 발명의 다감마-분해 효소를 코딩하는 서열의 숙주 세포의 염색체 내로의 융합을 허용한다. 또한, 벡터는 바람직하게, DNA 서열들의 삽입을 위한 유일한 제한 자리들을 가진다. 만약 어떤 벡터가 유일한 제한 자리들을 가지지 않는다면, 그것은 앞으로의 조작에 보다 적합하게 만들기 위하여 제한 자리들을 도입하거나 삭제하여 변형될 수 있다.

본 발명의 DNA 구조체들은 다양한 숙주 세포들을 형질전환시키는 데 사용될 수 있다(아래 참조). 유전학적 마커가 형질전환된 숙주 세포들을 선택하기 위하여 사용되어야 한다 ("선택 마커"). 선택 마커들은 전형적으로 형질전환된 세포들이 네거티브 선택 (즉, 선택 마커를 포함하지 않는 세포들의 성장 억제)에 의하여 또는 선택 마커에 의하여 엔코딩된 생성물을 스크리닝함에 의하여 회수되게 한다.

식물 형질전환을 위하여 가장 일반적으로 사용되는 선택할 수 있는 마커 유전자는 식물 조절 신호들의 제어 하에 놓일 때 카나마이신에 대한 저항성을 수반하는, Tn5로부터 분리되는 네오마이신 포스포트랜스페라제 II (nptII) 유전자이다 (Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4803 (1983)). 일반적으로 사용되는 다른 선택할 수 있는 마커 유전자는 항생물질 히그로마이신(hygromycin)에 대한 저항성을 수반하는 히그로마이신 포스포트랜스페라제 유전자이다 (Vanden Elzen et al., Plant Mol. Biol., 5:299 (1985)).

항생물질에 저항성을 수반하는 박테리아 유래의 추가적인 선택할 수 있는 마커 유전자들은 젠타마이신 아세틸 트랜스페라제, 스트렙토마이신 포스포트랜스페라제, 아미노글리코사이드-3'-아데닐 트랜스페라제, 및 블레오마이신(bleomycin) 저항 결정소를 포함한다 (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)). 다른 선택할 수 있는 마커 유전자들은 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트(glufosinate) 또는 브로목시닐(bromoxynil)과 같은 제초제들에 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)).

식물 형질전환을 위한 다른 선택할 수 있는 마커 유전자들은 박테리아 유래의 것이 아니다. 이러한 유전자들은 예를 들어, 쥐 디하이드로폴레이트(dihydrofolate) 환원효소, 식물 5-에놀피루빌쉬키메이트-3-포스페이트(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) 신타제 및 식물 아세토락테이트(acetolactate) 신타제를 포함한다 (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)).

형질전환된 것으로 추정되는 세포들을 스크리닝하기 위하여 일반적으로 사용되는 유전자들은 β -글루쿠로니다제(β -glucuronidase; GUS), β -갈락토시다제, 루시페라제(luciferase), 및 클로람페니콜 아세틸트랜스페라제(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)를 포함한다. 상대적으로 드문 형질전환 결과들을 확인하기 위한 다른 접근방법으로 지 메이스 안토시아닌 착색 경로(Zea mays anthocyanin pigmentation pathway)의 두드러지게 구성된 조절자를 엔코딩하는 유전자의 사용이 있었다 (Ludwig et al., Science 247:449 (1990)).

원핵생물들 및 식물과는 다른 진핵생물들에서 사용하기 위한 적합한 선택 마커들도 역시 잘 알려져 있다. 예를 들어, PCT WO 96/23898 및 PCT WO 97/42320을 보라. 예를 들어, 항생물질(암피실린, 카나마이신, 테트라실린, 클로람페니콜, 네오마이신 또는 히그로마이신)에 대한 저항성은 선택 마커로서 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 측면에 따라서, 디카바에 대한 내성은 식물들 및 식물 세포들에 대하여 선택 마커로서 사용될 수 있다. "내성"은 형질전환된 식물 세포들이 형질전환되지 않은 세포들이 성장하지 못하게 할 정도의 디카바를 함유하는 배양 배지에 놓일 때 성장(생존해서 식물들로 재생)할 수 있다는 것을 의미한다. "내성"은 또한, 형질전환된 식물들이 형질전환되지 않은 식물들의 성장을 억제하는 양의 디카바를 적용한 후에도 성장할 수 있다는 것을 의미한다.

형질전환된 식물 세포들을 선택하는 방법들은 본 발명의 분야에서 잘 알려져 있다. 요약하면, 식물 세포들의 군집 (예를 들어, 외식편(explant) 또는 배의(embryonic) 현탁 배양물)에서 최소한 식물 세포들의 몇몇은 디카바 분해를 위하여 마련된 본 발명에 따른 DNA 구조체로 형질전환된다. 결과되는 식물세포들의 군집은, 형질전환된 식물 세포들은 성장하고 반면에 형질전환되지 않은 식물 세포들은 성장하지 않도록 선택된 농도에서 디카바를 함유하는 배양 배지에 놓여진다. 디카바의 적합한 농도들은 본 발명의 분야에서 알려진 바와 같이 실험적으로 결정될 수 있다.

형질전환된 식물들을 선택하는 방법들도 역시 본 발명의 분야에서 알려져 있다. 요약하면, 디카바는 디카바 분해를 위하여 마련된 본 발명에 따른 DNA 구조체를 포함하는 것으로 짐작되는 식물들의 군집에 적용된다. 디카바의 양은 형질전환된 식물들은 성장하고 형질전환되지 않은 식물들의 성장은 억제되도록 선택된다. 억제의 정도는 형질전환된 식물들 및 형질전환되지 않은 식물들이 쉽게 구별될 수 있을 정도로 충분해야 한다 (즉, 억제는 통계학적으로 유의할만해야 한다). 그러한 양들은 본 발명의 분야에서 알려진 바와 같이 실험적으로 결정될 수 있다.

더 나아가, 디카바의 분해의 결과로서 3,6-DCSA의 생성은 선택 및 스크리닝을 위하여 사용될 수 있다. 3,6-DCSA의 생성은 이 화합물의 형광을 관찰함으로써 쉽게 확인될 수 있으며, 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들, 및 유기체들의 부분들 (예를 들어, 미생물들, 식물들, 식물의 부분들, 및 식물 세포들)의 선택 및 스크리닝을 허용한다. 이러한 측면에서, 본 발명은 녹색 형광 단백질(GFP)에 대한 것과 같은 방식으로 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들 및 유기체들의 부분들의 선택 및 스크리닝을 고려한다. 모두 여기에서 참조로서 병합되는 미국 특허 제5,162,227호, 제5,491,084호 및 PCT 출원 WO 96/27675, WO 97/11094, WO 97/41228 및 WO 97/42320을 보라. 특히, 3,6-DCSA는 통상적인 분광 광도 측정 방법들(spectrophotometric methods)을 사용하여 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들 및 유기체들의 부분들에서 검출될 수 있다. 예를 들어, 현미경들은 형광 여기 및 검출을 위한 적합한 필터 조합들로 알맞게 될 수 있다. 손전등

(hand-held lamp)은 작업대에서의 작업(benchtop work) 또는 현장 작업(field work)을 위하여 사용될 수 있다 (실시예 1을 보라). 형광-활성화된 세포 정렬도 역시 채용될 수 있다. 3,6-DCSA는 312-313 nm의 파장에서 여기되고 424 nm의 최대 발광 파장을 가진다.

유기체들의 "부분들"은 기관들, 조직들, 또는 임의의 다른 부분을 포함한다. "식물 부분들"은 종자들, 꽃가루, 배(embryo)들, 꽃들, 과일들, 가지들(shoots), 잎들, 뿌리들, 줄기들, 외식편들 등을 포함한다.

디캄바 내성 또는 디캄바 분해에 기초하는 선택은 다른 선택 마커의 사용이 필요하지 않은 경우에, 디캄바-내성 식물들 또는 디캄바-분해 미생물들의 생산에 사용될 수 있다. 디캄바 내성 또는 디캄바 분해에 기초하는 선택은 또한, 관심의 대상인 다른 유전자들을 발현시키는 유전자이식 세포들 또는 유기체들의 생산에 사용될 수 있다. 그러한 많은 유전자들은 알려져 있으며, 상업적으로 가치있는 단백질들을 코딩하는 유전자들 및 식물에 대한 개선된 농경법의 특징을 수반하는 유전자들을 포함한다. (예를 들어, PCT WO 97/41228을 보라. 이것의 전체 개시 내용은 참조로서 여기에 병합된다.)

본 발명의 DNA 구조체들은 원핵생물 및 진핵생물들을 포함하여, 다양한 숙주 세포들을 형질전환시키는 데 사용될 수 있다. 디캄바-분해 효소(들) 및 별개의 선택 마커가 사용된다면, 그 선택 마커는 동일하거나 다른 DNA 구조체들 상에 있을 수 있다. 바람직하게는, 그들은 모든 코딩 서열들이 함께 발현되도록 전사 단위로서 단일의 DNA 구조체 상에 배열된다. 또한, 관심의 대상인 유전자(들) 및 디캄바-내성 또는 디캄바-분해가 선택 마커로서 사용될 때, 디캄바-분해 효소(들)을 코딩하는 DNA 서열들은 동일하거나 다른 DNA 구조체들 상에 있을 수 있다. 그러한 구조체들은 상기에서 서술한 바와 동일한 방식으로 제조된다.

적합한 숙주 세포들은 원핵생물 및 진핵생물의 미생물들 (예를 들어, (아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 및 에셰리치아 콜리(*Escherichia coli*))를 포함하는) 박테리아, (사카로마이세스 세레피시애(*Saccharomyces cerevisiae*))를 포함하는) 이스트, (아스페르길러스(*Aspergillus*) sp.를 포함하는) 다른 진균류, 식물 세포들, 곤충 세포들 및 포유동물의 세포들을 포함한다. 바람직하게, 숙주 세포는 일반적으로 디캄바를 분해하지 않는 것이다. 그러나, 본 발명은 또한, 일반적으로 디캄바를 분해하는 숙주 세포들에서 디캄바 분해의 정도를 증가시키는 데 사용될 수 있다.

그래서, 본 발명의 "유전자이식(transgenic)" 세포들 및 유기체들은 일반적으로 디캄바를 분해하지 않는 세포들 및 유기체들을 포함하며, 반면에, 이것들은 본 발명에 따라 형질전환되어 이 제조제를 분해할 수 있다. 본 발명의 "유전자이식" 세포들 및 유기체들은 또한, 일반적으로 디캄바를 분해하는 세포들 및 유기체들을 포함하며, 반면에, 이것들은 본 발명에 따라 형질전환되어 이 제조제의 보다 많은 양을 분해하거나 또는 이 제조제를 보다 효율적으로 분해할 수 있다.

원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포들을 형질전환시키는 방법들은 본 발명의 분야에서 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 보라.

예를 들어, 식물 형질전환을 위한 많은 방법들이 생물학적 및 물리적 형질전환 프로토콜들을 포함하여 개발되었다. 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 보라. 게다가, 벡터들 및 식물 세포 또는 조직 형질전환 및 식물들의 재생을 위한 시험관내 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) pp. 89-119를 보라.

발현 벡터를 식물들 내에 도입하기 위한 가장 널리 활용되는 방법은 아그로박테리움의 자연적 형질전환 시스템에 기초한다. 예를 들어, Horsch et al., *Science* 227:1229 (1985)를 보라. A. 튜메파시엔스 및 A. 리조게네스(rhizogenes)는 유전학적으로 식물 세포들을 형질전환시키는 식물 병원성 토양 박테리아이다. 각각 A. 튜메파시엔스 및 A. 리조게네스의 Ti 및 Ri 플라스미드들은 식물의 유전학적 형질전환에 대한 책임이 있는 유전자들을 운반한다. 예를 들어, Kado, C.I., *Crit. Rev. Plant. Sci* 10:1 (1991)을 보라. 아그로박테리움 벡터 시스템들 및 아그로박테리움-매개된 유전자 전달에 대한 서술들은 다음의 문헌들을 포함하여 많은 참조 문헌들에 의하여 제공된다: Gruber et al., *supra*, Miki et al., *supra*, Moloney et al., *Plant Cell Reports* 8:238 (1989), 및 미국 특허 제4,940,838 및 제5,464,763호.

식물 형질전환을 일반적으로 적용할 수 있는 방법은 미세발사체-매개된 형질전환이며, 여기에서, DNA는 미세발사체들의 표면 상에 있는 상태로 운반된다. 발현 벡터는 미세발사체들을 식물 세포벽들 및 막들을 통과하기에 충분한 속도로 가속

시키는 바이오리스틱 장치(biolistic device)로 식물 조직들 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)).

식물들로 DNA를 물리적으로 운반하는 다른 방법은 목표 세포들의 초음파 분해이다 (Zhang et al., Bio/Technology 9:996 (1991)). 대안적으로, 리포솜 또는 스페로플라스트(spheroplast) 접합이 식물들로 발현 벡터들을 도입하는데 사용되었다 (Deshayes et al., EMBO J., 4:2731 (1985), Christou et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:3962 (1987)). CaCl_2 침전, 폴리비닐 알콜 또는 폴리-L-오르니틴을 사용하여 원형질체들에 DNA를 직접 집어넣는 것도 역시 보고되었다 (Hain et al., Mol. Gen. Genet. 199:161 (1985) 및 Draper et al., Plant Cell Physiol. 23:451 (1982)). 원형질체들 및 전체 세포들 및 조직들의 전기천공도 역시 서술되었다 (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)).

임의의 형태의 유전자이식 디카바-내성 식물들은 본 발명에 따라 생산될 수 있다. 특히, 디카바에 의하여 상처를 입는 것으로 현재 알려진 (강낭콩들, 대두들, 목화, 완두콩들, 감자들, 해바라기들, 토마토들, 담배, 과일 나무들 및 장식 식물들 및 나무들을 포함하는) 넓은 잎 식물들은 이 제초제에 내성을 가지도록 형질전환될 수 있다. 디카바에 내성이 있는 것으로 현재 간주되고 있는 (옥수수, 사탕수수(sorghum), 작은 곡물들, 사탕수수(sugarcane), 아스파라거스 및 풀과 같은) 다른 식물들은 이 제초제에 대한 그들의 내성을 증가시키도록 형질전환될 수 있다. "내성"은 형질전환된 식물들이 형질전환되지 않은 식물들의 성장을 억제하는 양의 디카바의 존재에서도 성장할 수 있는 것을 의미한다.

본 발명의 디카바-분해 옥시게나제들은 디카바를 분해하는 유전자이식 숙주 세포들 및 유기체들에서 발견되는 내생적인 환원효소들 및 페레독신들과 함께 작용할 수 있다고 예상된다. 식물 엽록체들은 특히, 환원효소들 및 페레독신들이 풍부하다. 따라서, 유전자이식 디카바-분해 식물들의 생산을 위한 바람직한 실시예는 디카바-분해 옥시게나제를 엽록체들로 넣게 하는 펩티드를 코딩하는 서열의 사용이다 ("엽록체 목표 서열"). 엽록체 목표 서열을 코딩하는 DNA는 바람직하게는 디카바-분해 옥시게나제를 코딩하는 서열의 상류 (5')에 놓여지지만, 그 코딩 서열의 하류 (3')에 놓여지거나 또는 그 코딩 서열의 상류 및 하류 모두에 놓여질 수 있다. 엽록체 목표 서열들의 예는 옥수수 cab-m7 시그널 서열 (Becher et al., Plant Mol. Biol. 20:49 (1992) 및 PCT WO 97/41228을 보라) 및 완두콩 글루타티온(glutathione) 환원효소 시그널 서열 (Creissen et al., Plant J. 2:129 (1991) 및 PCT WO 97/41228)을 포함한다. 대안적인 바람직한 실시예는 엽록체들에서 옥시게나제의 발현을 획득하기 위하여 엽록체들에서 기능하는 프로모터를 포함하는 구조체를 사용하는 엽록체들의 직접 형질전환이다. 예를 들어, PCT 출원 WO 95/24492 및 미국 특허 제5,545,818호를 보라.

또한, 다른 실시예에서, 본 발명은 유전자이식 디카바-분해 식물들이 성장하는 서식지에서 잡초들을 통제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 잡초들을 통제하기 위하여 그 서식지에 유효량의 디카바를 적용하는 단계를 포함한다. 디카바를 적용하는 방법들 및 다양한 잡초들을 통제하기 위한 디카바의 양은 알려져 있다. Crop Protection Reference, 1803-1821쪽 (Chemical & Pharmaceutical Press, Inc., New York, NY, 11th ed. 1995)를 보라.

다른 실시예에서, 본 발명은 토양, 물, 또는 디카바 제조 설비의 폐기물들과 같은 물질에 존재하는 디카바를 분해하는 방법을 제공한다. 그러한 분해는 본 발명의 디카바-분해 효소들을 사용하여 달성될 수 있다. 그 효소들은 그것들을 자연적으로 발현시키는 미생물들로부터 정제될 수 있거나(실시예 1 참조) 또는 그것들을 생산하는 유전자이식 숙주 세포들로부터 정제될 수 있다. 효소들이 그러한 방법들에서 사용된다면, 적합한 공동인자들이 또한 제공된다(실시예 1 참조). 유효량들은 본 발명의 분야에서 알려진 바와 같이 실험적으로 결정될 수 있다(실시예 1 참조). 대안적으로, 유전자이식 원핵생물 및 진핵생물의 미생물들이 그러한 물질들에서 디카바를 분해하는 데 사용될 수 있다. 유전자이식 원핵생물 및 진핵생물의 미생물들은 상기에서 서술한 바와 같이 생산될 수 있으며, 유효량들은 본 발명의 분야에서 알려진 바와 같이 실험적으로 결정될 수 있다.

디카바는 지속적인 기반 상에서 많은 양으로 환경으로 배출되고 있다. 디카바의 제거는 지구의 토양 및 물에서 사는 미생물들에서 발견되는 효소 시스템의 활동에 크게 의존한다. 디카바-분해 O-디메틸라제들 및 그들의 삼 성분들을 포함하여, 이러한 효소 시스템들의 이해는 오염된 토양, 물 및 다른 물질들의 생물학적 치료 및 회복을 위하여 자연적 및 유전공학적으로 변형된 미생물들을 이용하려는 노력들에 있어서 중요하다. 그래서, 본 발명의 디카바-분해 효소들, DNA 분자들, DNA 구조체들 등은 디카바 분해 및 생물학적 치료의 연구를 위한 연구 도구들로서 사용될 수 있다.

마지막으로, 본 발명의 디캄바-분해 효소들은 디캄바에 대한 분석에서 사용될 수 있다. 디캄바를 함유하는 것으로 짐작되는 시료는 디캄바-분해 O-디메틸라제 또는 디캄바-분해 옥시게나제, 디캄바-분해 페레독신 및 디캄바-분해 환원효소의 조합과 함께 혼합된다. 적합한 평가들은 실시예 1에 서술되어 있다. 특히, 3,6-DCSA의 생성에 기인하는 형광의 검출 및 정량화는 편리한 분석에 이바지한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 디캄바 O-디메틸라제에 대한 제안된 전자 수송 개략도이다. NADH로부터의 전자들은 연속적으로 환원효소_{DIC} (reductase_{DIC})로부터 페레독신_{DIC} (ferredoxin_{DIC})으로 그런 후 옥시게나제_{DIC} (oxygenase_{DIC})로 이동된다. 3,6-디클로로살리실산을 형성하는 기질 디캄바와 산소의 반응은 산화된 옥시게나제_{DIC}; 환원된 옥시게나제_{DIC}에 의하여 촉매된다.

실시예

실시예 1 : 수도모나스 말토피리아(Pseudomonas maltophilia) DI-6의 디캄바 O-디메틸라제의 성분들의 정제 및 특성화

방법들 및 물질들 :

박테리아 및 성장 조건들. 수도모나스 말토피리아, 스트레인 DI-6 (Kreuger, et al., (1989) J. Agric. Food Chem., 37:534-538)은 디캄바로 지속적으로 오염된 토양 자리로부터 분리되었다. 그 박테리아는 일리노이 기술 연구소 (Chicago, IL)의 더글라스 콕 박사에 의하여 제공되었고, 환원된 클로라이드 배지에서 유지되었으며 (Kreuger, J.P., (1989) Ph.D. thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL), 디캄바 (2 mg/ml)로 또는 글루코스 (2 mg/ml)와 카사미노산들(2 mg/ml)의 혼합물로 보충되었다. 탄소 소스들은 필터-소독되었고(filter-sterilized) 압력솥으로 처리된 (autoclaved) 후 배지에 첨가되었다. 고체 배지는 1% (wt/vol) 젤라이트를 첨가함으로써 제조되었다 (Scott Laboratories, West Warwick, R.I.).

화학약품들 및 시약들. 디캄바, 3,6-DCSA, 및 [¹⁴C]디캄바 (U-페닐-¹⁴C, 42.4 mCi/mmol, 98% 이상의 방사능약품 순도)는 산도즈 아그로사(Sandoz Agro, Inc. (Des Plaines, IL))에 의해 공급되었다. 용해도를 증가시키기 위하여, 디캄바 및 3,6-DCSA 재료 용액들은 KOH로 pH 7.0으로 적정함으로써 제조되었다. 모든 화학약품들은 다른 언급이 없다면, 시그마 화학회사 (Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO))로부터 구입되었다. FPLC (Fast performance liquid chromatography) 장치를 위한 수퍼로스 12, 모노 Q, Q-세파로스 (빠른 유속; Fast Flow) 및 페닐-세파로스 (CL-4B) 컬럼 패키징들은 파마시아(Pharmacia (Milwaukee, WI))로부터 획득되었다. 암폴라이트(Ampholyte) pH 4-6 및 암폴라이트 pH 4-9는 서바(Serva (Heidelberg, FRG))로부터 구입되었다. 아크릴아미드, β-머캅토에탄올, N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED) 및 암모늄 퍼설페이트(APS)는 바이오-래드 래버러토리즈(Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA))로부터 온 것이다. 박층 크로마토그래피(TLC) 판들은 UV 254 지시약을 가지는 실리카 겔 (250 μm 두께)이고, J.T. 바커 화학회사(J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ))로부터 구입되었다.

효소 분석들. 디캄바 O-메틸라제 활성은 [¹⁴C]디캄바로부터의 [¹⁴C]3,6-DCSA 형성을 측정함으로써 분석되었다. 요약하면, 효소 성분들의 혼합물들에서의 활성은 25 mM 칼륨 포스페이트 완충용액 (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADH (beta-nicotinamide adenin dinucleotide, 환원 형태), 0.5 mM 제1철 설페이트, 50 μM 차가운 디캄바, 2.5 μM [¹⁴C] 디캄바 (방사성 디캄바의 최종적인 특정 활성은 1.9 mCi/mmol이었음), 및 서로 다른 양들의 세포 용해물 또는 부분적으로 정제된 효소를 함유하는 표준 300 μl 반응 혼합물로 30°C에서 측정되었다. 최종적인 정제 단계들 중의 모든 효소 분석들은, 디캄바 O-디메틸라제 활성을 위한 pH 최적조건이 포스페이트 완충용액들의 중간 범위에서 찾아졌기 때문에, 포스페이트 완충용액에서 유도되었으며, 트리스-HCl [tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride] 완충용액과 비교하여 보다 높은 효소 활성이 pH 7.0에서 포스페이트 완충용액에서 관찰되었다. 반응들은 기질, 디캄바의 첨가에 의하여 시작되었다. 특정 시간들에서, 반응들은 50 μl의 5% (vol/vol) H₂SO₄를 첨가함으로써 중지되었다. 그런 다음에, 디캄바 및 디캄바 대사물질들은 한 부피의 에테르로 2회 추출되었고, 이 추출물들은 용매 증발되어 건조되었다. 추출 과정에 대한 회수율들(평균 ± 표준편차들)은 디캄바에 대하여 87% ± 2%였고, 3,6-DCSA에 대하여는 85% ± 3%이었다 (Yang et al., Anal. Biochem. 219:37-42 (1994)).

[^{14}C]디캄바 및 ^{14}C -표지된 대사물질들은 박층 크로마토그래피(TLC)에 의하여 분리되었다. 에테르-추출된 디캄바 및 그것의 대사물질들은 TLC 판 상에 점 찍히기 전에 $50\ \mu\text{l}$ 의 에테르에 재용해되었다. TLC를 수행하기 위한 용매 시스템은 클로로포름-에탄올-아세트산 (85:10:5 [vol/vol/vol])이었다. 분해된 반응 생성물들은 24시간 동안 인광 스크린에 TLC 판을 노출시키고 그런 후, 인광 이미지 생성기(PhosphorImager) SF (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)에서 그 스크린을 스캐닝함으로써 가시화되고 정량화되었다. TLC 판 상의 특별한 점에서의 방사능의 양의 평가들은 알려진 양의

[^{14}C]디캄바를 함유하는 동일한 판 상의 어떤 점에 대하여 그 점에서의 전체 픽셀 카운트를 비교함으로써 결정되었다. 활성의 한 단위는 30°C 에서 분당 디캄바로부터의 $1\ \text{nmol}$ 의 3,6-DCSA의 형성을 촉매하는 효소의 양으로서 정의되었다. 특정 활성들은 분석 혼합물의 전체 단백질 농도에 기초되었다.

디캄바 디메틸라제의 환원효소 성분의 활성은 히타치(Hitachi) U-2000 분광 광도계(spectrophotometer)로 2,6-디클로로페놀인도페놀 (2,6-dichlorophenolindophenol; DCIP)의 환원을 측정함으로써 분석되었다. 그 반응은 $1\ \text{ml}$ 의 전체 부피에서 $0.5\ \text{mM}$ NADH, $0.2\ \text{mM}$ FAD (flavin adenine dinucleotide), $50\ \mu\text{M}$ DCIP, $20\ \text{mM}$ 트리스 완충용액 (pH 8.0), 및 $10\text{--}100\ \mu\text{l}$ 의 효소 시료를 포함하였다. 시간에 따른 $600\ \text{nm}$ 에서 흡수도의 변화가 실온에서 측정되었다. 특정 활성은 환원된 DCIP에 대한 $21.0\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 $600\ \text{nm}$ 에서 흡광계수(extinction coefficient)를 사용하여 계산되었다. 특정 활성은 단백질의 $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 환원된 nmol DCIP로서 표현되었다.

게다가, 인 시추(in situ) DCIP 분석은 이소일렉트릭 포커싱(isoelectric focusing; IEF) 겔들 상에 분리된 단백질 제제들에서 환원효소 활성을 검출하고 위치시키는 데 사용되었다. IEF 겔 상에서의 단백질들의 전기영동 후에, 겔로부터 잘려진 레인들(lanes)은 $20\ \text{ml}$ 의 차가운 $20\ \text{mM}$ 트리스-HCl 완충용액 (pH 8.0)으로 세척되었다. 저용점 아가로스는 $1.5\%(\text{w/v})$ 의 최종 농도에서 $10\ \text{ml}$ 의 $20\ \text{mM}$ 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 가열함으로써 용해되었다. 그 아가로스가 실온 근처로 냉각될 때, 그것은 $0.2\ \text{mM}$ FAD, $50\ \mu\text{M}$ DCIP, 및 $0.5\ \text{mM}$ NADH로 보충되었다. 분석 혼합물들은 유리판 상으로 부어져서 고체화되었다. 그 겔 조각은 고체화된 반응 혼합물 상에 놓여졌고 15분 동안 실온에서 세팅되었다. 그 겔 슬라이스가 환원효소 활성을 가지는 단백질을 포함하면, 환원된 DCIP의 무색의 밴드가 DCIP의 청색 배경에서 생성되었다.

세포 용해물들(Cell lysates). 세포들은 로터리 셰이커(rotary shaker) (30°C 에서 $250\ \text{rpm}$)에서 글루코스 및 카사미노산들의 혼합물을 포함하는 액체 환원 클로라이드 배지에서 1.3 내지 1.5의 $550\ \text{nm}$ 에서 최적의 농도로 성장되었다. 그 세포들은 원심분리에 의하여 수확되었으며, 차가운 $100\ \text{mM}$ MgCl_2 로 2회 세척되었고, 다시 원심분리되었다. 세포 페이스트들은 즉시 사용되었거나 또는 재빨리 액체 질소에서 냉동되어 -80°C 에서 저장되었다. 효소 정제 시에, $25\ \text{g}$ 의 냉동된 세포들은 해동되어 $25\ \text{mM}$ 트리스 완충용액 (pH 7.0), $10\ \text{mM}$ MgCl_2 , 및 $0.5\ \text{mM}$ EDTA를 포함하는 $50\ \text{ml}$ 의 분리 완충용액에 재현탁되었다. 페닐메틸설포닐 플루오라이드 및 디티오프레이톨(dithiothreitol)이 각각 $0.5\ \text{mM}$ 및 $1\ \text{mM}$ 의 최종 농도들이 되도록 첨가되었다. $10\ \text{mg}$ 의 라이소자임 및 $1\ \text{mg}$ 의 디나제(DNase)의 첨가 후에, 세포들은 얼음 상에서 10분간 교반되었고 20 초간의 작동 및 40초간의 유식 간격의 12회로 세팅(세팅 5)된 수단에서 얼음 상에서 초음파분쇄 (모델 XL2020 초음파분쇄기; Heat Systems)에 의하여 분쇄되었다. 이렇게 얻어진 세포 용해물들은 분리 완충용액으로 $90\ \text{ml}$ 로 희석되었고 4°C 에서 $76,000 \times g$ 로 원심분리되었다. 그 상등액은 맑은 세포 분쇄물의 소스로서 사용되었다.

효소 정제. 모든 과정들은 다른 언급이 없는 한, 4°C 에서 수행되었다. 고체 암모늄 설페이트는 계속적으로 교반하면서, $90\ \text{ml}$ 부피의 맑은 세포 용해물에 $40\%(\text{wt/vol})$ 포화도가 되도록 첨가되었다. 15분간의 교반 후에, 그 혼합물들은 15분 동안 $15,400 \times g$ 에서 원심분리되었으며, 그 침전물은 제거되었다. 추가적으로 고체 암모늄 설페이트가, 그 상등액을 계속적으로 교반하면서 하면서, $70\%(\text{wt/vol})$ 포화도가 되도록 첨가되었다. 15분간의 교반 후에, 그 혼합물은 상기에서 서술한 조건들 하에서 원심분리되었다. 그 상등액은 제거되었고, 그 침전물은 최소한 부피의 완충용액 A ($20\ \text{mM}$ 트리스 [pH 8.0], $2.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0.5\ \text{mM}$ EDTA, $5\%(\text{vol/vol})$ 글리세롤, 및 $1\ \text{mM}$ 디티오프레이톨)에 재현탁되었다.

다음으로, 상기의 $40\text{--}70\%$ 암모늄 설페이트 처리물은 FPLC 장치 (Pharmacia)에 연결된 페닐-세파로스 컬럼 ($10\ \text{cm}$ 당 2.5) 상으로 적재되었고, $10\%(\text{w/v})$ 에서 $0\%(\text{w/v})$ 로 직선적으로 기울기가 감소하는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 용출되었다. 그 컬럼은 $10\%(\text{wt/vol})$ 암모늄 설페이트를 포함하는 완충용액 A로 미리 평형화되었다. 유속은 $1\ \text{ml/min}$ 이었다. 단백질 농도들은 컬럼 용출 동안에 계속적으로 A_{280} 에서 모니터링되었다. 그 컬럼은 베이스라인 A_{280} 판독들이 얻어질 때까지 $10\%(\text{wt/vol})$ 암모늄 설페이트를 포함하는 $120\ \text{ml}$ 의 완충용액 A로 세척되었다. 결합된 단백질들은 완충용액 A에서 감소하는 기울기의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [$210\ \text{ml}$ 의 전체 부피에서 10% 에서 $0\%(\text{wt/vol})$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]로 용출되었다. $2\ \text{ml}$ 의 분획들(fractions)이 수집되었다. $10\ \mu\text{l}$ 의 하부분획들(aliquots)이 각 분획으로부터 취해졌고, 지방산성 디캄바가 기질로 사용된

경우를 제외하고, 표준 디카바 O-디메틸라제 분석 혼합물(상기 참조)에 첨가되었다. 디카바 O-디메틸라제 활성은 암실에서 핸드-헬드 UV 램프(312 nm, Fotodyne)로 높은 형광 반응 생성물 3,6-DCSA로의 디카바의 변환을 모니터링함으로써 검출되었다.

이 과정은(성분 I, II 및 III으로 지정된) 별개의 성분들을 포함하는 3개의 풀들(pools)로 디카바 O-디메틸라제의 분해를 허용한다. 각 성분은 디카바 O-디메틸라제 활성을 위하여 필수적이다(아래 참조). 어떤 하나의 성분이 분석되었을 때, 다른 두 성분들은 과잉으로 공급되었다. 단일 형태의 활성을 포함하는 분획들은(성분 I, 분획들 128-145; 성분 II, 결합되지 않은 분획들 12-33; 성분 III, 분획들 62-92) 풀화(pooled)되었다.

(i) 성분 I의 정제. 성분 I 활성을 포함하는 분획들(0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 페닐-세파로스 컬럼으로부터 용출된 것, 분획들 128-145)은 34 ml의 전체 부피를 제공하도록 풀화되었다. 그 풀화된 시료들은 센트리프립-10(Centrifrep-10) 장치(Amicon)에서의 원심분리에 의하여 10 ml로 농축되었고, 그런 후, 완충용액 A로 평형화된 Q-세파로스(빠른 유속) FPLC 컬럼(Pharmacia)(6 cm 당 2.5)에 적용되고 80 ml의 완충용액 A으로 세척되었다. 그 컬럼에 결합된 단백질들은 1 ml/min의 유속에서 완충용액 A에서 0에서 0.6 M KCl의 직선 기울기의 100 ml로 용출되었다. 분획들은 1.5분 간격마다 수집되었다. 성분 I 활성을 발휘하는 이러한 분획들(분획들 29-37)은 풀화되고, 4°C에서 밤새 완충용액 A에 대하여 투석되고, 완충용액 A에서 Mono Q HR 5/5 FPLC 음이온-교환 컬럼에 적용되었다. 단백질들은 증가하는 KCl 농도(0에서 0.5 M)의 50 ml 기울기를 사용함에 의하여 1 ml/min로 용출되었다. 성분 I 활성을 보여주는 분획들(분획들 19에서 25)은 풀화되었고 센트리콘-10(Centricon-10) 장치에서의 원심분리에 의하여 0.4 ml로 농축되었다. 그런 후, 그 농축된 시료는 100 mM KCl을 포함하는 완충용액 A로 0.2 ml/min의 유속에서 수퍼로스 12 FPLC 컬럼(50 cm 당 1.6) 상의 크로마토그래피에 적용되었다. 성분 I 활성을 보이는 분획들 7-10은 풀화되었고 센트리콘-10 장치에서의 원심분리에 의하여 농축되었다.

부분적으로 정제된 성분 I은 차가운 1% (w/v) 글리신으로 희석되었고, 3회 이상 센트리콘-10 장치에서의 원심분리에 의하여 농축되어 IEF 전기영동을 위하여 제제에서 염 제거(desalt)되었다. 다음으로, 염 제거되고 농축된 시료는 6% (w/v) IEF (pH 4-6) 겔에 적용되었고, 4°C에서 1.5 시간 동안 전기영동에 적용되었다(아래 참조). 전기영동 후에, 그 겔은 5분 동안 25 mM 차가운 포스페이트 완충용액(pH 7.0)으로 세척되었고, 그런 후, 그 겔 레인(lane)의 각 슬라이스(slice)는 작은(6 mm x 4 mm) 조각들로 절단되었다. 단백질은 10 μl 의 25 mM 포스페이트 완충용액(pH 7.0)의 존재에서 피펫 팁으로 절단된 겔 단편들을 감으로써 그 겔 단편들로부터 용출되었다. 각 세그먼트로부터의 단백질은 성분 II 및 III의 과잉량과 혼합되었고 디카바 O-디메틸라제 활성에 대하여 분석되었다.(또한 적갈색인) 성분 I 활성을 보이는 그 겔 세그먼트는 시료 순도를 확인하기 위하여 12.5% (w/v) 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔(SDS-PAGE) 상에 적재되었다.

(ii) 성분 II의 정제. 페닐-세파로스 컬럼 크로마토그래피에 의하여 획득된 성분 II는 4°C에서 밤새 완충용액 A에 대하여 투석되었고 FPLC Q-세파로스 컬럼(6 cm 당 2.5)에 적용되었다. 시료 용출 조건들은 용출 기울기가 완충용액 A에서 0에서 1 M KCl인 것을 제외하고는 성분 I에 대하여 상기에서 서술한 것들과 동일하다. 성분 II 활성을 발휘하는 분획들(분획들 30-37)은 풀화되었고, 완충용액 A에 대하여 투석되었으며, 0.4 ml로 농축되었고, FPLC 수퍼로스 12 컬럼(50 cm 당 1.6)에 적용되었다. 시료 적용 및 용출에 대한 과정들은 성분 I에 대하여 상기에서 서술된 것들과 동일하다. 성분 II 활성을 보이는 분획들(분획들 3-6)은 풀화되었고, 동일한 부피의 완충용액 A로 희석되었으며, FPLC Mono Q 컬럼에 적용되었다. 단백질들은 성분 I에 대한 것과 같은 KCl 기울기를 사용하여 그 컬럼으로부터 용출되었다. 분획들 20-25는 성분 II 활성을 보였다. 부분적으로 정제된 성분 II는 성분 I에 대하여 서술된 것과 동일한 조건들을 사용한 IEF (pH 4-6) 전기영동에 의하여 더 정제되었다. 성분 II 활성을 보이는 그 겔 세그먼트는 앞으로의 분석을 위하여 12.5% (w/v) SDS-PAGE 상으로 적재되었다.

(iii) 성분 III의 정제. 페닐-세파로스 컬럼 크로마토그래피에 의하여 획득된 성분 III는 4°C에서 밤새 완충용액 A에 대하여 투석되었고 FPLC Q-세파로스 컬럼(6 cm 당 2.5)에 적용되었다. 조건들은 성분 I에 대하여 상기에서 서술한 것들과 동일하다. 성분 III 활성을 발휘하는 분획들(분획들 26-38)은 완충용액 B [10 mM 트리스-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl_2 , 5% (v/v) 글리세롤, 1 mM 디티오프레이톨]에 대하여 투석되었으며, 5 ml로 농축되었다. 청색 염료 친화성 매트릭스 [Cibacron Blue 3GA type 3000 (Sigma)]는 FPLC 컬럼(1 x 5 cm)로 패키징되었고, 20 ml의 완충용액 B로 미리 평형화되었다. 농축된 성분 III는 청색 염료 컬럼 상으로 적재되었고, 컬럼 방출물의 A_{280} 이 베이스라인 레벨들에 도달할 때까지 0.2 ml/min의 유속에서 20 ml의 완충용액 B로 세척되었다. 그런 후, 결합된 단백질은 완충용액 B에서 5 mM NADH로 용출되었다. 환원효소 활성을 포함하는 분획들은 과잉의 성분 I 및 II의 존재에서 디카바 O-디메틸라제 활성에 대하여 분석함에 의하여 그리고 또한, NADH의 존재에서 DCIP를 환원하는 각 분획의 능력에 의하여 검출되었다. 양 분석들에서 강력한 환원효소 활성을 가지는 분획들은 풀화되었고, 100 mM KCl을 포함하는 완충용액 A에 대하여 투석되었으며, 0.2 ml로 농축되었고, FPLC 수퍼로스 12 컬럼에 적용되었다. 동일한 조건들이 성분 I에 대하여 서술된 바와 같은 수퍼로스 컬럼을 수행하는 데 사용되었다. DCIP 환원을 촉매하는 단백질들을 포함하는 분획들은 풀화되었고, 완충용액 A에 대하여 투석되

었으며, FPLC Mono Q 컬럼에 적용되었다. 단백질들은 성분 I에 대한 것과 같은 조건들을 사용하여 용출되었다. 부분적으로 정제된 성분 III는 IEF (pH 4-6) 겔 전기영동에 의하여 더 정제되었다. IEF 겔 내의 단백질들의 환원효소 활성은 상기에 서술된 바와 같이 아가로스 겔 오버레이(overlay)에서 DCIP 환원에 대한 분석에 의하여 검출되었다. 성분 III 활성을 보이는 그 겔 세그먼트는 앞으로의 분석을 위하여 12.5% (w/v) SDS-PAGE 상으로 적재되었다.

NH₂-말단 아미노산 서열들의 결정. 성분 I, 성분 II 또는 성분 III 활성들을 가지는, IEF 겔들 상에서 확인된 단백질 밴드들은 절제되고 12.5% (w/v) SDS 폴리아크릴아미드 겔의 웰들에 놓였다. 전기영동 후에, 정제된 단백질들을 가지는 겔 슬라이스들은 16 시간 동안 25 볼트에서 트랜스-블로트 세포 (Bio-Rad, Richmond, CA)에서의 PVDF (polyvinylidene difluoride) 막 상으로 트랜스블로트(trasblot)되었다. 그 블로팅 완충용액은 10 mM CAPS [3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid], pH 10.0을 가지는 20% (v/v) 메탄올 용액이었다. 서열화는 에드만 분해 (Edman and Henshen (1975) pages 232-279 in S.B. Needleman (ed.), Protein sequence determination, 2nd ed., Springer-Verlage, New York)에 의한 어플라이드 바이오시스템즈 회사 (Applied Biosystems Inc.) 420 H 기계를 사용하여 수행되었다.

단백질 농도의 결정. 단백질 농도들은 표준으로서 소 혈청 알부민을 사용하는 브래드포드(Bradford) (1976) Anal. Biochem. 72:248-254의 방법에 의하여 결정되었다.

SDS-PAGE. 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)은 변형된 라에믈리의 방법들 (Laemmli (1970) Nature, 227:680-685)에 따라 수행되었다. 85 x 65 x 0.75 mm의 12.5% (w/v) SDS 겔들은 다음과 같이 만들어졌다: 러닝 겔(running gel): 2.5 ml 40% (w/v) 아크릴아미드/비스 용액 (37:5:1), 1 ml 러닝 완충용액 [3M 트리스-HCl (pH 8.8), 0.8% (w/v) SDS], 4.5 ml H₂O, 5 μ l TEMED, 및 40 μ l 10% (w/v) APS; 스택킹 겔(stack gel): 0.5 ml 40% (w/v) 아크릴아미드/비스, 0.5 ml 스택킹 완충용액 [1 M 트리스-HCl (pH 6.8), 0.8% (w/v) SDS], 3 ml H₂O, 5 μ l TEMED, 및 12.5 μ l 10% (w/v) APS. 러닝 완충용액의 조성은 25 mM 트리스-HCl (pH 8.3), 0.2 M 글리신, 및 0.1% (w/v) SDS이었다. 시료 완충용액은 0.25 ml 스택킹 완충용액, 0.6 ml 20% (w/v) SDS, 0.2 ml β -머캅토에탄올, 및 50% (v/v) 글리세롤에서의 0.95 ml 0.1% 브롬페놀 블루 (w/v)를 포함한다. 전기영동은 트래킹 염료(traking dye)가 겔의 음극(anode) 말단으로부터 0.5 cm일 때까지 바이오-래드 미니 겔 장치에서 80 볼트로 수행되었다. 단백질들은 3:6:1 (v/v/v)의 비율인 이소프로판올, 물 및 아세트산의 혼합물에서 0.1% (w/v) 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 얼룩지게(stained) 되었다. 얼룩지기는 7:83:10 (v/v/v)의 비율인 메탄올, 물 및 아세트산의 혼합물에서 수행되었다. 표준 단백질들 (Gibco BRL)은 다음을 포함하였다: 미오신 (214.2 kDa), 포스포릴라제 B (111.4 kDa), 소 혈청 알부민 (74.25 kDa), 오발부민(ovalumin) (45.5 kDa), 탄소의 안하이드라제(carbonic anhydrase) (29.5 kDa), β -락토글로불린 (18.3 kDa), 및 라이소자임 (15.4 kDa).

분자량의 결정. 변성 조건들 하에서의 펩티드들의 분자량 (Mr)은 SDS-PAGE 분석을 사용하여 평가되었다. 태생의 (native) 성분들 I, II 및 III의 분자량들은 100 mM KCl을 포함하는 완충용액 A에서 0.2 ml/min의 유속으로 수퍼로스 12 HR 10/30 FPLC 컬럼 (Pharmacia)를 통한 겔 여과에 의하여 평가되었다. 보정(calibration) 단백질들은 바이오-래드 (Bio-Rad)로부터의 겔 여과 표준들이었다. 그것들은 다음과 같은 것이다: 소의 티로글로불린 (670 kDa), 소 감마 글로불린 (158 kDa), 닭 오발부민 (44 kDa), 말 미오글로빈 (17 kDa) 및 비타민 B-12 (1.35 kDa). 수퍼로스 12 컬럼의 공극 부피는 블루 텍스트란 (Blue Dextran) (M_r 2,000,000, Sigma)을 사용하여 계산되었다.

IEF. 이소일렉트릭 포커싱 (IEF) 겔 전기영동은 C.B.S. 사이언티픽 회사 (Del Mar, CA)로부터의 수직 미니-겔 장치 (모델 #MGV-100)에서 수행되었다. 6% (w/v) 폴리아크릴아미드를 가지는 IEF 겔들 (70 x 90 x 1 mm)는 다음의 것들을 혼합함으로써 제조되었다: 1.6 ml 30% (w/v) 아크릴아미드/비스 (37:5:1), 0.8g 글리세롤, 0.32 ml 암폴라이트 pH 4-6 (Serva), 0.08 ml 암폴라이트 pH 4-9 (Serva), 5.2 ml H₂O, 10 μ l TEMED, 및 80 μ l 10% (w/v) APS. 양극(cathode) 완충용액은 100 mM β -알라닌이었고 음극(anode) 완충용액은 100 mM 아세트산이었다. 대략 1에서 10 μ l의 1% (w/v) 글리신에서의 단백질 시료들은 동일한 부피의 시료 완충용액 [50% (v/v) 글리세롤, 1.6% (v/v) 암폴라이트 pH 4-9, 2.4% (v/v) 암폴라이트 pH 4-6]과 함께 혼합되었다. 시료들은 그 겔의 양극 말단에서 적재되었고 1.5 시간동안 200 볼트에서 그리고 다른 1.5 시간동안 400 볼트에서 이동되었다. 단백질들은 SDS 폴리아크릴아미드 겔들에 대하여 상기에서 서술된 과정을 사용하여 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 얼룩지게 되었다. IEF 마커들 (Sigma)는 다음과 같은 것이었다: 아밀로글루코소다제 (amylglucosodase), pI 3.6; 글루코스 옥시다제, pI 4.2; 트립신 억제자, pI 4.6; β -락토글로불린 A, pI 5.1; 탄소의 안하이드라제 II, pI 5.4; 탄소의 안하이드라제 II, pI 5.9; 및 탄소의 안하이드라제 I, pI 6.6

속도론 분석(Kinetic analysis). 디카바 O-디메틸라제에 의하여 촉매되는 디메틸화 반응의 속도론들(kinetics)은 효소의 일정한 농도의 존재에서 그 반응의 초기 속도들을 분석하고 기질, 디카바의 농도들을 증가시킴으로써 연구되었다. 반응 혼

합물들은 300 μl 의 전체 부피에서, 25 mM 칼륨 포스페이트 완충용액 (pH 7.0), 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM NADH, 0.5 mM FeSO_4 , 25 μg 의 부분적으로 정제된 O-메틸라제 효소 [맑은 세포 용해물로부터의 그 40%-70% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분획물], 다양한 농도 (0.5에서 50 μM)의 디캄바 및 다양한 농도 (0.025에서 2.5 μM)의 [^{14}C]디캄바 (U-페닐- ^{14}C , 42.4 mCi/mmol)를 포함한다. 0.5 μM 및 1 μM 의 디캄바 농도들로 하는 분석들에 대하여, 그 반응 부피는 충분한 양의 방사성 디캄바 및 그것의 대사물질들이 검출을 허용하는 정도로 존재하는가를 확인하기 위하여 900 μl 까지 증가되었다. 이러한 반응들에서, 반응에서의 모든 다른 성분들의 양들은 3배로 하였다. [^{14}C]3,6-DCSA로의 [^{14}C]디캄바의 변환은 24시간 동안 TLC 판들에 노출된 인광체 스크린들 상에서 방사능을 스캔하는 인광 이미지 생성기(PhosphorImager) SF를 사용하여 디캄바의 각 다른 농도에서 다른 시간 점들에 대하여 결정되었다. 활성의 한 단위는 30°C에서 분당 3,6-DCSA의 1 nmol을 형성하는 효소의 양으로서 정의되었다. 각 반응의 초기 속도들은 각 기질 농도에서 반응 속도를 시간에 대하여 플로팅함으로써 결정되었다. 데이터는 미카엘리스-멘텐 속도론(Michaelis-Menten kinetics)에 따라 모델화되었고, K_m 및 V_{\max} 의 값들은 시그마플롯(SigmaPlot[®]) (Jandel Scientific, Corte Madera, CA)를 사용하여 라인위버-버크 플롯즈(Lineweaver-Burk plots)에 맞추어 결정되었다.

산소 요구(Oxygen requirement). 클라크(Clark) 산소 전극을 사용하는 예비 실험들은 기질로서 디캄바를 사용하는 표준 디캄바 O-디메틸라제 분석 동안의 산소 소모량을 지시하였다. 디캄바 O-디메틸라제에 의하여 디캄바의 O-디메틸화에서 산소에 대한 요구를 확인하기 위하여, 반응들은 1 ppm 보다 작은 양의 산소를 포함하는 혐기성 챔버(anaerobic chamber)에서 수행되었다. 그 반응 혼합물로부터 산소의 배제를 위한 과정들은 4°C에서 수행되었다. 효소를 결여한 반응 혼합물들이 유리병(vial)에 놓여지고 고무 마개로 봉쇄되었다. 산소의 배제를 위하여, 유리병은 진공에 의하여 2회 비워졌고 그 때마다 질소를 불어넣었다. 세 번째 비움을 행한 후에, 유리병은 90% 질소와 10% 수소로 불어넣어졌다. 효소 용액들도 (효소 용액에 거품이 생기지 않도록 주의하면서) 마찬가지로 산소로 퍼지되었다. 그 반응 혼합물들 및 효소 용액들은 혐기성 챔버 (95% N_2 - 5% H_2 분위기) 내로 이동되었다. 240 마이크로리터의 맑은 세포 용해물은 미세주사기로 고무 마개를 통하여 주입되어 960 μl 의 산소-결여된 반응 혼합물과 얹전하게 혼합되었다. 반응들은 30°C에서 수행되었다.

TLC 판들 상에서의 반응 생성물들의 조사는 혐기성 조건들 하에서 [^{14}C]디캄바로부터 [^{14}C]3,6-DCSA가 생성되는 속도가 호기성 조건들 하에서 동일한 양의 효소에 의한 반응들의 속도보다 매우 낮다는 것을 보여주었다. 혐기성 조건들 하에서, 1 시간 이내에 3,6-DCSA로의 디캄바의 변환은 실질적으로 없었다. 그러나, 30분 후에 병행하는 반응혼합물이 혐기성 챔버로부터 취해지고 공기에서 배양되었을 때, 상당한 양을 가지는, 디캄바 O-디메틸라제 효소 복합체의 성분들중의 하나는 옥시게나제였다.

[^{14}C]3,6-DCSA로의 [^{14}C]디캄바의 시험관내 변환은 이전에 문헌화된 생체내 변환 경로 (Cork and Kreuger, Adv. Appl. Microbiol. 36:1-66 (1991); Yang et al., Anal. Biochem. 219:37-42 (1994))를 모방한다는 것을 나타내는지 모른다. 이러한 연구들에서, DCSA는 TLC 및 모세관 전기영동에 의하여 반응 생성물로서 확인되었다. 생체내 및 시험관 내 모두에서 DCSA로서 디캄바 분해의 가장 주요 생성물의 설득력있는 확인은 가스 크로마토그래피-질량 분광 분석들에 의하여 획득되었다.

성분 및 공동인자 요구들. 페닐-세파로스 컬럼 크로마토그래피에 의하여 디캄바 O-디메틸라제의 세 성분들의 초기 분리 후에, 그 부분적으로 정제된 제제들은 Q-세파로스 컬럼 (6 cm 당 2.5) 상에서의 하나의 추가적인 정제를 통하여 개별적으로 취해졌다. 시료들은 완충용액 A에서 Q-세파로스 (빠른 유속) 빠른 단백질 액체 크로마토그래피 컬럼 (Pharmacia)에 적용되었고 1.5 ml 분획들에서 0에서 0.6 M KCl (옥시게나제 성분에 대하여) 또는 0에서 1.0 M KCl (페레독신 및 환원효소 성분들에 대하여)의 100 ml 직선 기울기로 용출되었다. 옥시게나제 정제 (분획들 29에서 37)에 대한, 페레독신 정제(분획들 30에서 37)에 대한, 또는 환원효소 정제 (분획들 26에서 38)에 대한 개별적인 컬럼들로부터의 적절한 풀화된 분획들은 성분 및 공동인자 요구들의 결정을 위하여 사용되었다.

세 성분들은 성분 요구들을 결정하기 위하여 다양한 조합들에서 O-메틸라제 활성에 대하여 분석되었다.

공동인자 요구들을 결정하기 위하여, O-메틸라제 활성은 30°C에서 30분 동안 [^{14}C]디캄바와의 세 성분들의 혼합물을 사용하여 분석되었다. 그 반응 혼합물들에서 (최적화된 비율로 제공된) 부분적으로 정제된 단백질의 양들은 85 μg 의 옥시게나제, 55 μg 의 페레독신 및 50 μg 의 환원효소이었다. 반응 혼합물들에서 사용된 공동인자들의 농도는 0.5 mM NADH, 0.2 mM FAD, 0.5 mM FeSO_3 , 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM NADPH, 및 0.2 mM FMN이었다.

결과들

성분 I. 페닐-세파로스 컬럼에 가장 강하게 결합된 디카바 O-디메틸라제의 성분 (처음에 성분 I로서 지정되었고 다음에 옥시게나제로 확인됨)은 확연하게 적갈색이었다. 이것은 철-황 클러스터(들) 또는 헴 그룹(들)을 포함하는 단백질(들)의 잠재적 존재를 지시하였다. 페닐-세파로스 컬럼으로부터의 성분 I 활성을 가지는 분획들은 Q-세파로스 (빠른 유속) 및 Mono Q 크로마토그래피에 의한 추가의 정제의 대상이 되었고, 그런 후, 수퍼로스 12 사이즈 배제(exclusion) 컬럼 상의 분리의 대상이 되었다. 다음으로, 성분 I 단백질은 IEF 겔 상에서 더 정제되었다.

(대략 4.6의 겔보기 pI를 가지는) IEF 겔 상의 주요한 밴드로부터의 단백질은 절제되고 SDS-PAGE에 의하여 남아있는 소량의 오염물들로부터 분리되었다. IEF에 의한 정제 후에 획득된 주요한 성분 I 단백질은 쿠마시 블루로 얼룩진 이 SDS-폴리아크릴아미드 겔의 농도계 분석에 의하여 판단된 바와 같이 90% 순도 이상이었다.

대략 40,000 달톤의 겔보기 분자량을 가지는 주요한 단백질의 N-말단 아미노산 서열이 결정되었다. 아미노산 서열화의 결과는 N-말단 영역의 최초 29 아미노산들이 다음과 같은 서열로 존재한다는 것을 지시하였다 (괄호안의 잔기들은 최상의 추측이다):

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 데이터베이스들에서 아미노산 서열들의 비교는 다른 모노옥시게나제들 또는 디옥시게나제들에 대하여 보고된 NH_2 -말단 서열들과 상동성이 거의 또는 전혀 없음을 지시하였다.

성분 II. 페닐-세파로스 컬럼에 결합되지 않는 단백질 분획은 성분 II로 지정되었다. 이 노란색의 분획은, 분석들이 성분들 I 및 III과의 조합에서 수행될 때, 클로스트리디움 파스퇴리아눔(*Clostridium pasteurianum*)으로부터의 페레독신 (하지만 보다 낮은 반응 속도들을 가짐)에 의하여 대체될 수 있기 때문에, 그것은 페레독신-함유 분획으로서 임시적으로 지정되었다. 클로스트리디움 페레독신은 성분 II를 대신하여 명확하게 작용하였지만, 이 실험들에서 사용된 성분 II의 높은 불순물 성질로 인하여, 클로스트리디움 효소의 효율은 스트레인 DI-6의 추정적인 페레독신의 것보다 상당히 낮았다. 특히, 과량의 성분들 I 및 III과 혼합된 55 μg 의 부분적으로 정제된 성분 II는 대략 5 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 속도로 3,6-DCSA로의 디카바의 변환을 촉매하지만, 반면에 클로스트리디움 유래의 100 μg 의 높게 정제된 페레독신은 단지 0.6 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 활성을 낳았을 뿐이다.

Q-세파로스 (빠른 유속) 크로마토그래피, 수퍼로스 12 겔 여과 및 모노 Q 크로마토그래피를 포함하는 정제 단계들은 초기 25 그램의 세포 페이스트로부터 대략 1 밀리그램의 정제된 단백질을 산출하였다. 이 분획은 IEF 겔 상의 전기영동 및 이어지는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상의 활성 IEF 분획의 전기영동에 의한 옥시게나제 성분과 유사한 방식으로 정제되었다.

IEF 겔의 세그먼트들로부터 용출된 단백질들에서의 성분 II 활성의 분석은 대략 3.0의 pI를 가지는 분획이 성분 II에서 활성 단백질을 포함한다는 것을 지시하였다. 이 겔 슬라이스로부터의 단백질은 용출되고 SDS-PAGE의 대상이 되었다. 쿠마시 블루로 겔을 얼룩지게 함으로써 저분자량 단백질들의 오염을 가지는 하나의 현저한 단백질 밴드를 밝혔다. 대략 28,000 달톤의 겔보기 분자량을 가지는 그 현저한 단백질은 PVDF 막 상으로 블로팅되었다. 아미노산 서열화는 다음과 같은 20 아미노산들의 N-말단 서열을 밝혔다:

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys Tyr Met Asp Xaa Val Glu Val Xaa

[서열번호 2]

성분 III. 디카바 O-디메틸라제의 성분 III은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 높은 농도들에서 페닐-세파로스 컬럼 상에 존속하였고, 대략 4% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 용출되었다. 이 밝은 노란색 분획은 NADH의 존재에서 산화된 시토크롬 C 및 DCIP를 환원시키는 그것의 능력에 기초하여 그리고 성분들 I 및 II와의 분석들에서 돼지 심장 유래의 시토크롬 C 환원효소 (타입 1, Sigma)에 의하여 대체될 수 있었기 때문에 환원효소-함유 분획으로서 잠정적으로 확인되었다. 이 세트의 반응들에서, 50 μg 의 부

분적으로 정제된 성분 III의 사용은, 과잉의 성분들 I 및 II와 혼합될 때, 대략 $5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 의 반응 속도를 산출하였다. 높게 정제된 시토크롬 C 환원효소는, 이 분석들에서 사용된 조(crude) 성분 III의 불순물을 고려할 때 성분 III에 의하여 제공되는 것보다 꽤 낮은 활성인 대략 $2.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 의 특정 활성을 보였다. 게다가, 성분 III은 NADH의 존재에서 시토크롬 C 또는 2,6-디클로로페놀-인도페놀 (DCPIP)와 함께 배양될 때 환원 활성을 발휘하였다. 성분 I 과 성분 II 어느 것도 이 두 환원효소 분석들에서 활성을 보여주지 않았다.

Q-세파로스 (빠른 유속), 청색 염료 친화성 매트릭스, 수퍼로스 12 및 모노 Q 패킹들을 포함하는 컬럼들 상에서의 크로마토그래피에 의한 이 분획의 추가적 정제는 환원효소 활성을 가지는 분획들에서 단백질의 낮은 양들을 야기하였다. 성분 III 단백질은 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루로 얼룩지게 하는 것에 의한 분리 후에 활성 단백질 분획의 농도계 분석에 의하여 판단된 바와 같이 약 70% 순도를 가졌다.

성분 III의 정제를 더욱 심화시키기 위하여, 모노 Q 컬럼 단계로부터의 다른 두 단백질 분획들은, 페레독신 및 옥시게나제 성분들과 함께 분석될 때, 환원효소 활성을 포함한다는 것을 알게 되었다. IEF 겔 상의 전기영동에 의한 이 두 분획들의 추가적인 정제는 두 분획들의 환원효소 활성들이 명확하게 구별되는 다른 이소일렉트릭 포인트들을 가진다는 것을 밝혔다. 이것은 IEF 겔로부터 두 환원효소 분획들의 각각을 포함하는 레인들을 절단하고 그 슬라이스들을 DCIP 반응 혼합물을 포함하는 저용점 아가로스 패드 상에 놓음으로써 실시되었다. 양 겔 슬라이스들에서의 환원효소 활성은 DCIP의 무색, 환원 형태로 DCIP의 NADH-의존 환원에 의하여 확인되었다. 분획 35에서의 환원효소는 약 5.6의 겔보기 pI를 가지지만, 반면에 분획 27에서의 환원효소는 대략 4.8의 겔보기 pI를 소유하였다.

IEF 겔 슬라이스들로부터 분리된 양 환원효소 활성들은 불안정하고 낮은 농도에서 존재하였다. 실제로, 모노 Q 컬럼 분별로부터 분획 35의 환원효소만이 추가의 정제 및 특성화를 허용할 만큼 충분한 단백질 농도 및 활성을 보유하였다. 이 환원효소 활성을 포함하는 IEF 겔로부터의 슬라이스는 용출되고 SDS-PAGE에 의하여 오염시키는 단백질들로부터 분리되었다. 이 겔에서의 현저한 단백질은 대략 45,000 달톤의 질량을 가지는 것이었다. 사이즈 배제(exclusion) 크로마토그래피는 태생의 상태로 있는 성분 III에 대하여 대략 50,000 달톤의 분자량을 지시하였다.

디캄바 O-디메틸라제의 생화학적 특성들. 디캄바 O-디메틸라제 활성은 20°C에서 50°C까지 범위의 온도들에서 그리고 대략 6에서 9까지의 pH 값들에서 시험관내의 배양들 동안에 측정되었다. 활성은 30°C에서 날카로운 피크를 가지고 6.5와 7.5 사이의 pH 값들에서 넓은 피크를 가졌다. 효소 활성은 채용되는 pH 완충용액의 형태에 의존하였다. 예를 들어, pH 7에서, 활성은 포스페이트-함유 완충용액들에서보다 트리스-함유 완충용액들에서 대략 40% 더 낮았다.

디캄바 O-디메틸라제에 대한 K_m 및 V_{max} 에 대한 값들은 이중의 실험들로부터의 데이터의 미카엘리스-멘텐 및 라인위버-버크 플롯들로부터 가장 적합한 곡선들을 발생시키는 SigmaPlot®을 사용하여 평가되었다. 디캄바에 대한 K_m 은 대략 $9.9 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 로 평가되었으며 그 반응에 대한 V_{max} 는 대략 $108 \pm 12 \text{ nmol/min/mg}$ 로 평가되었다.

그 세 성분들은 다양한 조합들에서 디캄바 O-디메틸라제 활성에 대하여 분석되었다. 그 성분들 중 어느 것도 단독으로 분석되었을 때 효소 활성을 보이지 않았다. 실제로, 상당 양의 O-디메틸라제 활성은 세 성분들 모두가 조합되었을 때에만 검출될 수 있었다. 성분 I 및 II의 혼합물은 적은 양의 효소 활성을 발휘하였는 데, 아마도 이것은 성분 I 분획들을 오염시키는 미량의 성분 III에 기인하는 것이다.

NADH 및 NADPH 둘 모두는 효소 활성을 지지하였는 데, NADH가 NADPH보다 매우 효과적이었다. Mg^{2+} 는 효소 활성에 필수적이었다. Fe^{2+} , 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (FAD) 및 플라빈 모노뉴클레오티드 (FMN)는 이 실험들에서 부분적으로 정제된 단백질 제제들과 함께 효소 활성의 자극을 거의 또는 완전히 산출하지 않았다. 가장 높은 활성은 NADH, Fe^{2+} , Mg^{2+} 및 FAD의 조합을 사용하여 획득되었다.

논의

수도모나스 말토피리아, 스트레인 DI-6 유래의 디캄바 O-디메틸라제는 3,6-디클로로살리실산 (3,6-DCSA; 2-히드록시-3,6-디클로로벤조산)으로의 제조제, 디캄바(2-메톡시-3,6-디클로로벤조산)의 변환을 책임지고 있는 세 성분 옥시게나제 (Wang, X-Z (1996) Ph.D. thesis, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE)이다. 균질한 또는 거의 균질한 상태로 그 세 성분들 각각의 분리를 허용하는 정제 구도들이 고안되었다.

그 세 성분들의 초기 분리는 페닐-세파로스 컬럼 상의 크로마토그래피에 의하여 달성되었다. 그 부분적으로 정제된 성분들의 효소 활성 및 다른 특성들은 환원효소, 페레독신 및 옥시게나제 - 많은 다른 이전에 연구된 헴-함유 및 비헴-함유, 다성분 옥시게나제들 (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)에서 발견되는 것과 유사한 조성 -으로서 그 성분들을 잠정적으로 확인하게 하였다. 페닐-세파로스 컬럼으로부터 분리된 성분 III은 시토크롬 C 및 염료 DCIP 둘 모두의 NADH-의존 환원을 촉매하였다. 게다가, 성분들 I 및 II와 조합될 때 3,6-DCSA로의 디카바의 변환을 지지하는 그것의 능력은 시토크롬 C 환원효소에 의하여 부분적으로 대체될 수 있었다. 성분 II는 성분들 I 및 III을 포함하는 반응들에서 클로스트리움 파스토이리아눔 유래의 페레독신의 첨가에 의하여 대체될 수 있었다. O-디메틸화 반응을 지지하는 분자 산소에 대한 절대적 요구는 나머지 성분이 옥시게나제라는 것을 지시하였다.

옥시게나제_{DIC} . (옥시게나제_{DIC}로 지정된) 디카바 O-디메틸라제의 성분 I은 균질하게 정제되었고 N-말단 아미노산 서열화의 대상이 되었다. 결과적인 29 아미노산 잔기들의 서열은 다양한 데이터뱅크들에 있는 다른 단백질 서열들과 상당한 상동관계를 보여주지 않았다. 그러나, 이 아미노산 서열로부터 획득된 정보는 성분 I 유전자를 검출하고 클론하는 데 사용되는 퇴화된(degenerate) 올리고뉴클레오타이드 프로브들의 설계를 허용하였다 (실시예 2 참조). 더군다나, 그 데이터베이스에 있는 단백질 서열들의 것과 이 클론의 뉴클레오타이드 서열로부터 유래하는 아미노산 서열의 비교는 다른 옥시게나제들에 강력한 상동관계를 보여주었다 (실시예 2 참조).

옥시게나제_{DIC}의 겔보기 분자량은, SDS-폴리아크릴아미드 겔들에서 그것의 이동으로부터 평가되었는데, 대략 40,000 달톤이다. 옥시게나제의 정제된 제제들은 쿠마지 블루로 얼룩진 SDS-폴리아크릴아미드 겔들 상의 단지 한 주요한 밴드만을 보여주었으며 그 밴드에 포함된 단백질의 에드만 분해는 단지 하나의 N-말단 종의 존재를 지시하였다. 사이즈 배제 컬럼들 상에서의 태생의 옥시게나제_{DIC}의 행태로부터 유도되는 평가들은 대략 90,000 달톤의 분자 크기를 제안한다. 이러한 결과들 모두는 태생의 옥시게나제가 동종다이머(homodimer)로서 존재한다는 것을 제안한다.

많은 다성분 시스템들의 옥시게나제/히드록실라제 성분은 $(\alpha\beta)_n$ -형태 하부단위 배열로 구성되어 있고, 이 배열에서 보다 큰 α 하부단위는 대략 50,000 달톤의 크기이고 보다 작은 β 하부단위는 분자량이 대략 20,000 달톤이다 (Harayama, et al. (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46:565-601). 대조적으로, 디카바 O-디메틸라제의 옥시게나제 성분은 태생의 상태에서 다이머로 존재하는 분자량이 대략 40 kDa의 단일 하부단위를 소유하는 것 같다. 이 $(\alpha)_n$ -형태 하부단위 배열은 수도모나스 sp. 스트레인 CBS 유래의 4-클로로페닐아세테이트 3,4-디옥시게나제 (Markus, et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:12883-12888), 수도모나스 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), 수도모나스 푸티다 86 유래의 2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린 8-모노옥시게나제 (Rosche et al. (1995) Biochem. Biophys. Acta 1252:177-179), 수도모나스 수도알칼리케네스(pseudoalcaligenes) 유래의 4-카르복시디페닐 에테르 디옥시게나제 (Dehmel, et al. (1995) Arch. Microbiol. 163:35-41), 및 수도모나스 푸티다 유래의 3-클로로벤조에이트 3,4-디옥시게나제 (Nakatsu, et al. (1995) Microbiology (Reading) 141:485-495)와 같은 다른 잘 특성화된 옥시게나제들에서 발견되는 것과 유사하다.

페레독신_{DIC} . (페레독신_{DIC}로 지정된) 디카바 O-디메틸라제의 성분 II는 컬럼 크로마토그래피 및 IEF의 여러 단계들에 의하여 거의 균질하게 정제되었다. SDS-PAGE에 의한 최종 정제는 단백질 ($M_r \sim 28,000$)의 한 주요한 밴드 및 정제된 페레독신의 부분적 분해 생성물들을 나타낼지 모르는 보다 작은 단백질들의 오염을 생성하였다.

유전공학 컴퓨팅 그룹(Genetics Computing Group; GCG) 소프트웨어 패키지 (University of Wisconsin, Madison, WI) 을 사용하여 그 다양한 단백질 데이터뱅크들에 있는 다른 아미노산 서열들에 대하여 그 주요 단백질 밴드로부터 획득된 20 아미노산 잔기들의 N-말단 서열을 비교하면, 많은 디클러스터(dicluster) 박테리아 페레독신들에 강력한 상동관계가 있음을 밝혀주었다. 예를 들어, 수도모나스 스투체리(stutzeri), 수도모나스 푸티다(putida), 로도박터 캡슐라터스(Rhodobacter capsulatus) 및 아조토박터 비넬란디(Azotobacter vinelandii) 유래의 페레독신들의 최초 20 아미노산들의 정렬 및 비교는 이러한 각각의 페레독신들이 수도모나스 말토피리아, 스트레인 DI-6 유래의 그 단백질의 N-말단 서열에 대하여 65%, 65%, 65% 및 60% 동일성을 가지는 것을 보여주었다. 추정의 페레독신 서열에서 Xaa로 지정된 4개의 잔기들은 확인되지 않았다. 에드만 분해 생성물들의 크로마토그래프 상의 여분의 피크들의 위치에 기초하여, 이 Xaa 잔기들은

실질적으로 SDS-PAGE 동안에 아크릴아미드와의 시스테인 잔기들의 알킬화에 의하여 형성된 프로피오닐-시스테인 잔기들인 것 같다 (Brune (1992) Anal. Biochem. 207:285-290). 4개의 Xaa 잔기들이 모두 시스테인 잔기들이라면, 수도모나스 말토피리아 유래의 페레독신에 대한 박테리아 페레독신 서열들의 동일성들은 각각 85%, 85%, 85% 및 80%가 된다.

페레독신_{DIC}에 강력한 상동관계를 보이는 4개의 디클러스터(dicluster) 페레독신들은 그 단백질의 N-말단에서 [3Fe-4S] 클러스터와 이것을 뒤따르는 [4Fe-4S] 클러스터를 가진다. 이것은 비-헴 다성분 옥시게나제들과 보통 연관된 [2Fe-2S] 클러스터들을 가지는 페레독신 성분들 (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)과는 확연히 다른 것이라고 제시한다. 사실, EPR (electron paramagnetic resonance) 스펙트라의 분석 [다른 곳에서 상세하게 보고되어 있음, Qiao, F., X-Z. Wang, P.L. Herman, D.P. Weeks, and J.H. Golbek (출판을 위해 제출됨)]은 페레독신_{DIC}의 N-말단에서의 [3Fe-4S] 클러스터는 전자 수송에서 활성을 가지는 산화환원 중심(redox center)이라는 것을 제안한다.

페레독신_{DIC}는 낮은 이소일렉트릭 포인트 (즉, 3 또는 그보다 약간 위의 pI)를 가지고 있는 다른 박테리아 페레독신들의 전형이다. 낮은 pI는 종종 SDS-폴리아크릴아미드 겔들 상의 그리고 사이즈 배제 크로마토그래피 동안의 이 단백질들의 이상한 이동을 낳는다 (O'Keefe, et al. (1991) Biochemistry 30:447-455). 페레독신_{DIC}의 경우에, SDS-PAGE 동안에 그 단백질의 이동에 기초한 분자량의 평가들은 대략 28,000 달톤이었다. 마찬가지로, 사이즈 배제 크로마토그래피는 태생의 페레독신_{DIC}에 대한 겔보기 분자량이 대략 28,000 달톤이라는 것을 지시하였다. 이 분자량은 박테리아 유래의 다성분 옥시게나제들에서 발견되는 다른 페레독신들의 것 [즉, 8-13 kDa] (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)보다 상당히 높은 것이다.

환원효소_{DIC}. (환원효소_{DIC}로 지정된) 디캄바 O-디메틸라제의 성분 III은 세 성분들 중에서 정제하기에 가장 어려운 것이었다. 이것은 스트레인 DI-6의 용해물들에서 그것의 겔보기 불안정성 및 낮은 함량에 부분적으로 기인한다. 그럼에도 불구하고, 충분한 단백질이 정제되어 45,000 달톤의 잠정적인 분자량을 할당하였다. 이것은 사이즈 배제 크로마토그래피로부터 획득된 대략 50,000 달톤의 분자량과 유사하며 환원효소_{DIC}가 모노머로서 그것의 태생의 형태로 존재하고 있음을 제시한다. 환원효소 성분의 정제는 모노 Q 컬럼 및 IEF 상의 크로마토그래피가 정제된 환원효소 제제들이 겔보기에 구별되는 pI 값들을 가지는 두 개의 활성들로 분해된다는 사실에 의하여 보다 복잡해졌다. 모노 Q 컬럼으로부터의 양 분획들은 디캄바 O-메틸라제 활성을 생성하기 위하여 정제된 페레독신_{DIC} 및 옥시게나제_{DIC}와 조합하여 작용하였다. 삼 성분 디벤조퓨란 4,4a-디옥시게나제에서 환원효소 성분들로서 동일하게 잘 작용하는 두 개의 유사한 플라보단백질들의 스피노모나스 sp. (Sphingomonas sp.)에서의 존재가 빈즈 및 쿡에 의하여 최근에 보고되었다 (Bunz and Cook (1993) J. Bacteriol. 175:6467-6475). 흥미롭게도, 양 환원효소들은 분자량이 44,000 달톤으로서, 45,000 달톤 환원효소_{DIC}의 그것과 매우 유사하였다. 레그헤모글로빈(leghemoglobin) 환원효소의 다중 성분들은 이소일렉트릭 포커싱 기술들을 사용하여 루핑 뿌리 마디들(lupin root nodules)에서 역시 관찰되었다 (Topunov, et al. (1982) Biokhimiya (English edition) 162:378-379). 이 경우에, IEF는 NADH-의존 환원효소 활성을 가지는 4개의 별개의 성분들을 밝혔다. 스트레인 DI-6에서 단지 하나의 환원효소_{DIC}가 두 개의 형태로 존재하는지 아니면 두 개의 구별되는 환원효소들로 존재하는지에 대한 물음의 해답은 보다 많은 양의 그 단백질들을 분리하고/하거나 관여하는 그 유전자(들)을 클로닝하고 서열화하는 개선된 과정들의 개발에 의존할 것이다.

디캄바 O-디메틸라제 특성들. 상기에서 언급한 각 성분들의 물리적 및 생화학적 성질들에 더하여, 효소 활성의 분석들은 그 O-디메틸라제 시스템이 그것의 기질에 대한 강력한 친화성 ($K_m \approx 10\mu M$) 및 대략 100-110 nmol/min/mg의 V_{max} 를 가진다는 것을 보여주었다. 온화한 기후 지역에서 수집된 토양 박테리아에 대하여 예상되는 바와 같이, 최대 효소 활성은 30°C 부근의 온도에서 관찰되었다. 그 효소 시스템에 대한 pH 최적은 pH 6.5에서 pH 7.5까지의 범위 내였고, 효소의 주어진 제제로 측정된 활성은 채용되는 pH 완충 시스템의 형태에 의하여 크게 영향을 받았다. 트리스 완충용액들의 존재에서의 활성은 동일한 pH에서 포스페이트 완충용액에 대해서보다도 최소한 40% 더 낮았다.

디캄바 O-디메틸라제의 삼 성분들에 의해 촉매되는 반응에 대한 반응 구도는 도 1에 제시되어 있다. NADH로부터의 전자들은 환원효소 및 페레독신으로 구성되는 짧은 전자 사슬을 통하여 디캄바의 산화를 촉매하는 말단 옥시게나제로 왕복되었다. 디캄바 O-디메틸라제 및 여러 가지 다성분 디옥시게나제들 사이의 유사성들은 디캄바 O-디메틸라제가 신비한 디옥시게나제 활성을 잠재적으로 가질 수 있다는 것을 제안한다. 그러나, 이 효소는 O₂를 분리시키고 산소의 한 원자를 주요한

기질에 병합시키고 다른 것을 α -케토글루타레이트와 같은 작은 유기 기질에 병합시키는 옥시게나제들 (Fukumori and Hausinger (1993) J. Biol. Chem. 268:24311-24317)의 부류에 속하지는 않는다는 것은 명확하다. 실제로, 매우 정제된 환원효소_{DIC}, 페레독신_{DIC} 및 옥시게나제_{DIC}의 조합들은 활성을 위하여 단지 O_2 , NADH, Mg^{2+} , Fe^{2+} 및 디캄바만을 요구한다.

실시예 2: 수도모나스 말토피리아 DI-6의 디캄바 O-디메틸라제의 옥시게나제를 코딩하는 클론의 확인 및 서열화

실시예 1에서 언급한 바와 같이, 옥시게나제_{DIC}의 N-말단 아미노산 서열의 최초 29 아미노산들은 다음과 같은 것으로 결정되었다 (괄호안의 잔기들은 최상의 추측임):

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]

이 서열은 캐나다, 알라메다 주재의 오페론 (Operon, Alameda, CA)에 의하여 합성된 퇴화된(degenerate) 올리고뉴클레오타이드 프로브들의 설계를 허용하였다. 특히, 32 프로브들의 혼합물이 사용되었고, 이것의 각각은 길이가 17 뉴클레오타이드이고 상기에서 굵은체로 강조된 아미노산 서열을 엔코딩할 수 있는 가능한 뉴클레오타이드 서열들 모두를 포함하였다. 그 뉴클레오타이드 프로브들은 인디애나주의 인디애나폴리스 주재의 베링거 만하임 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)에 의하여 제공된 지침들에 따라 디곡시게닌(digoxigenin; DIG)으로 3'-말단-표지된 것이다.

그 DIG-표지된 프로브들은 먼저 다양한 제한 효소들의 조합들로 소화된 P. 말토피리아 DI-6 게놈 DNA에 병합되었고, 1% 아가로스 겔 상에 용해되고 나일론 필터로 블로트되었다. 이러한 결과들에 기초하여, 크기-분별된 게놈 라이브러리는 pBluescript II KS+ 벡터에 구축되었고 대장균(Escherichia coli) DH5 α 적합한 세포들 내로 형질전환되었다. 그 게놈 라이브러리는 1-2 kb Xho I/Hind III 단편들을 포함하였다. 그 DIG-표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브들은 나일론 필터들 상에 줄지어있는 박테리아 콜로니들의 정렬에 병합되었다. 플라스미드 DNA는 포지티브 콜로니들 및 하부클론들로부터 분리되었다. 각 하부클론의 양 스트랜드들은 네브라스카-링컨 대학(University of Nebraska-Lincoln)에서 DNA 서열화 장비에 의하여 서열화되었다. DIG-표지된 프로브들의 병합 및 검출은 베링거 만하임에 의하여 제공된 프로토콜에 따라 수행되었다.

옥시게나제_{DIC}를 코딩하는 게놈 DNA 클론이 확인되었다. 그 뉴클레오타이드 서열 및 완전한 옥시게나제_{DIC}의 유도된 아미노산 서열은 서열 목록에서 각각 하기의 서열번호 3 및 서열번호 4와 같이 주어졌다.

스위스 단백질 데이터베이스에 있는 단백질 서열들의 것과 비교하여 이 클론의 뉴클레오타이드 서열로부터 유도되는 아미노산 서열의 비교는 다른 옥시게나제들에 대한 상동관계를 보였다. 상동관계는 GCG 소프트웨어 패키지의 FASTA 프로그램을 사용하여 결정되었다. 가장 강력한 상동관계는 (수도모나스 sp. ATCC 스트레인 19151 유래의) 베닐레이트 디메틸라제(vanillate demethylase)의 옥시게나제 성분에 대해서였고, 이것은 33.8% 동일성을 보였다.

실시예 3: 수도모나스 말토피리아 DI-6의 디캄바 O-디메틸라제의 페레독신을 코딩하는 클론의 확인 및 서열화

실시예 1에서 언급한 바와 같이, 페레독신_{DIC}의 N-말단 아미노산 서열의 최초 20 아미노산들은 다음과 같이 결정되었다:

Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa **Lys Tyr Met Asp Xaa Val** Glu Val Xaa

[서열번호 2]

이 서열은 퇴화된(degenerate) 올리고뉴클레오타이드 프로브들의 설계를 허용하였다. 특히, 16 프로브들의 혼합물이 사용되었으며, 이것의 각각은 길이가 17 뉴클레오타이드이고 상기 굵은체로 강조된 아미노산 서열을 엔코딩할 수 있는 가능한 뉴클레오타이드 서열들을 모두 포함하였다 (Xaa는 Cys인 것으로 추측됨).

DIG-표지된 프로브들은 2-3 kb Xho I/Eco RI 단편들을 포함하는 게놈 라이브러리를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 2에 서술한 바와 같이 게놈 라이브러리를 스크린하는데 사용되었다. 페레독신_{DIC} 클론의 뉴클레오티드 서열 및 완전한 페레독신_{DIC}의 유도된 아미노산 서열은 아래의 서열 목록에서 각각 서열번호 5 및 서열번호 6으로 주어졌다.

스위스 단백질 데이터베이스에 있는 단백질 서열들의 것과 이 클론의 뉴클레오티드 서열로부터 유도되는 아미노산 서열의 비교는 GCG 소프트웨어 패키지의 FASTA 프로그램을 사용하여 만들어졌다. 이 비교는 수도모나스 스투체리(stutzeri), 수도모나스 푸티다, 리도박터 캡슐라터스, 아조토박터 비넬란디 및 로도스피릴럼 루브룸(Rhodospirillum rubrum) 유래의 페레독신들을 포함하여, 다른 페레독신들에 강력한 상동관계를 보였다 (상기 실시예 1의 논의 참조).

(57) 청구의 범위

청구항 1.

디캄바-분해 옥시게나제를 암호화하는 DNA 서열로 이루어지며,

상기 디캄바-분해 옥시게나제는,

- 1) 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 옥시게나제; 및
- 2) 디캄바를 3,6-디클로로살리실산으로 산화하는 것을 촉매하고 철-황 클러스터를 포함하는 서열번호 4의 단편

으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는

분리된 DNA 분자.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.
삭제

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.
삭제

청구항 15.
삭제

청구항 16.
삭제

청구항 17.
삭제

청구항 18.
삭제

청구항 19.
삭제

청구항 20.
삭제

청구항 21.
삭제

청구항 22.
삭제

청구항 23.
삭제

청구항 24.
삭제

청구항 25.
삭제

청구항 26.
삭제

청구항 27.
삭제

청구항 28.
삭제

청구항 29.
삭제

청구항 30.
삭제

청구항 31.
삭제

청구항 32.
삭제

청구항 33.
삭제

청구항 34.
삭제

청구항 35.
삭제

청구항 36.
삭제

청구항 37.
삭제

청구항 38.
삭제

청구항 39.
삭제

청구항 40.
삭제

청구항 41.
삭제

청구항 42.
삭제

청구항 43.
삭제

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

청구항 51.

삭제

청구항 52.

제 1항에 있어서,

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 디캄바-분해 옥시게나제를 암호화하는 DNA 서열로 이루어진 DNA 분자.

청구항 53.

제 1항에 있어서,

서열번호 3의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 DNA 분자.

청구항 54.

발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된, 제 1항, 제 52항 또는 제 53항에 따른 DNA 분자를 포함하는 DNA 구조체.

청구항 55.

제 54항에 있어서,

상기 DNA 구조체가 벡터인 DNA 구조체.

청구항 56.

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는, 분리되고 최소한 부분적으로 정제된 디캄바-분해 옥시게나제.

청구항 57.

발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된, 제 1항, 제 52항 또는 제 53항에 따른 디캄바-분해 옥시게나제를 코딩하는 DNA 분자를 포함하며, 원핵 미생물, 진핵 미생물, 식물 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포로 이루어진 군에서 선택되는 유전자 이식 숙주 세포.

청구항 58.

제 57항에 있어서,

상기 숙주 세포가 식물 세포인 유전자이식 숙주 세포.

청구항 59.

제 57항에 있어서,

상기 숙주 세포가 미생물인 유전자이식 숙주 세포.

청구항 60.

발현 제어 서열들에 작용적으로 연결된 제 1항, 제 52항 또는 제 53항에 따른 디캄바-분해 옥시게나제를 암호화하는 DNA를 포함하는, 하나 또는 그 이상의 세포들을 포함하는 유전자이식 식물.

청구항 61.

제 60항에 있어서,

상기 식물은 디캄바-분해 옥시게나제의 발현의 결과로서 디캄바에 내성을 가지는 넓은 잎 식물인 것을 특징으로 하는 유전자이식 식물.

청구항 62.

제 60항에 따른 유전자이식 식물을 포함하는 서식지에서 잡초들을 통제하는 방법에 있어서,

상기 서식지에 있는 상기 잡초들을 통제하는데 유효한 양의 디캄바를 상기 서식지에 적용하는 단계를 포함하는 잡초의 통제방법.

청구항 63.

디캄바를 포함하는 물질을 정화시키는 방법에 있어서,

제 59항에 따른 유전자이식 미생물을, 상기 물질에 있는 최소한 디캄바의 일부를 분해하는 데 유효한 양으로 상기 물질에 적용하는 단계를 포함하는 디캄바를 포함하는 물질의 정화방법.

청구항 64.

디캄바를 포함하는 물질을 정화시키는 방법에 있어서,

제 1항, 제 52항 또는 제 53항에 따른 DNA 분자에 의해 암호화되는 디캄바-분해 옥시게나제를, 상기 물질에 있는 최소한 디캄바의 일부를 분해하는 데 유효한 양으로 상기 물질에 적용하는 단계를 포함하는 디캄바를 포함하는 물질의 정화방법.

청구항 65.

형질전환된 식물 세포들을 선택하는 방법에 있어서,

식물 세포들의 군집을 제공하는 단계;

제 54항에 따른 DNA 구조체로 상기 식물 세포들의 군집에 있는 상기 식물 세포들의 최소한 일부를 형질전환시키는 단계; 및

형질전환된 식물 세포들은 성장하고 형질전환되지 않은 식물 세포들은 성장하지 않도록 선택된 농도에서 디캄바를 함유하는 배양 배지에서 상기의 식물 세포들의 군집을 성장시키는 단계

를 포함하는 형질전환된 식물 세포들의 선택방법.

청구항 66.

형질전환된 식물들을 선택하는 방법에 있어서,

제 54항에 따른 DNA 구조체를 포함하는 것으로 짐작되는 식물들의 군집을 제공하는 단계; 및

형질전환된 식물들은 성장하고 형질전환되지 않은 식물들의 성장은 억제되도록 선택된 양의 디캄바를 상기 식물들에 적용하는 단계

를 포함하는 형질전환된 식물들의 선택방법.

청구항 67.

형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들 및 유기체들의 부분들을 선택하거나 스크리닝하는 방법에 있어서,

제 54항에 따른 DNA 구조체를 포함하는 것으로 짐작되는 숙주 세포들, 완전한 유기체들, 또는 유기체들의 부분들을 준비하는 단계;

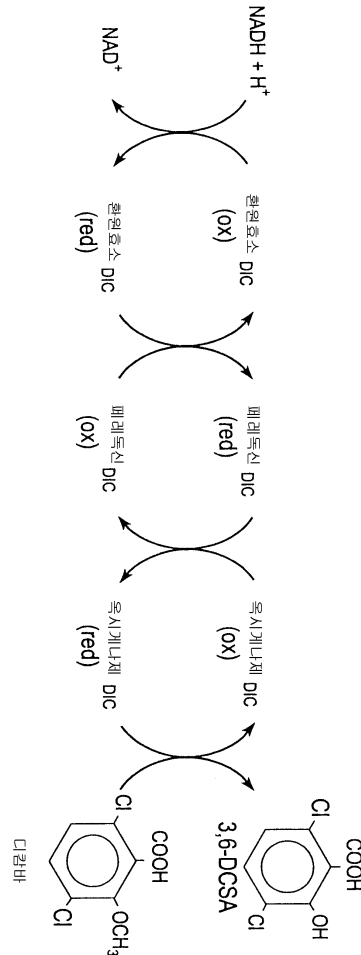
상기 숙주 세포들, 완전한 유기체들, 또는 유기체들의 부분들을 디캄바에 접촉시키는 단계; 및

디캄바의 분해의 결과로서 형질전환된 숙주 세포들, 완전한 유기체들, 또는 유기체들의 부분들에서 생성되는 3,6-디클로로살리실산에 기인하는 형광의 존재 또는 정도를 확인하는 단계

를 포함하는 선택 또는 스크리닝 방법.

도면

도면1



서열목록

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Weeks, Donald P.

Wang, Xiao-Zhuo

Herman, Patricia L.

(ii) TITLE OF INVENTION: "METHODS AND MATERIALS FOR MAKING AND USING TRANSGENIC DICAMBA-DEGRADING ORGANISMS"

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 6

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Sheridan Ross P.C.

(B) STREET: 1560 Broadway, Suite 1200

(C) CITY: Denver

(D) STATE: Colorado

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 80202

(v) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: PCT/US98/06589
- (B) FILING DATE: 03-APR-1998
- (C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: US 60/042,666
- (B) FILING DATE: 04-APR-1997

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: US 60/042,941
- (B) FILING DATE: 04-APR-1997

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: Crook, Wannell M.
- (B) REGISTRATION NUMBER: 31,071
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 3553-18-PCT

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: (303) 863-9700
- (B) TELEFAX: (303) 863-0223

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Region
- (B) LOCATION: 28
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Asp or Thr"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Region
- (B) LOCATION: 29
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Pro"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Thr	Phe	Val	Arg	Asn	Ala	Trp	Tyr	Val	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						

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(ix) FEATURE:

```

(A) NAME/KEY: Region
(B) LOCATION: 8
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: Region
(B) LOCATION: 11
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: Region
(B) LOCATION: 16
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: Region
(B) LOCATION: 20
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Best guess for Xaa = Cys"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:
Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Xaa Ile Lys Xaa Lys Tyr Met Asp Xaa
1          5          10          15
Val Glu Val Xaa
          20
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1020 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..1020
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:
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 *	
340	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 340 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

```

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 *
          340

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 339 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..339

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

ATG ACC TAT GTC GTC ACC GAC GCC TGC ATC AAG TGC AAG TAC ATG GAC	48
Met Thr Tyr Val Val Thr Asp Ala Cys Ile Lys Cys Lys Tyr Met Asp	
1 5 10 15	
TGC GTG GAA GTC TGC CCT GTG GAC TGC TTC TAC GAA GGC GAG AAC ATG	96
Cys Val Glu Val Cys Pro Val Asp Cys Phe Tyr Glu Gly Glu Asn Met	
20 25 30	
CTC GTC ATC AAT CCC AGT GAA TGC ATC GAC TGC GGC GTC TGC GAA CCG	144
Leu Val Ile Asn Pro Ser Glu Cys Ile Asp Cys Gly Val Cys Glu Pro	
35 40 45	
GAA TGC CCA GCC GAA GCC ATC CTT CCC GAC ACC GAA AGC GGT CTC GAG	192
Glu Cys Pro Ala Glu Ala Ile Leu Pro Asp Thr Glu Ser Gly Leu Glu	
50 55 60	
CAG TGG ATG GAA CTG AAC ACG AAG TAC TCG GCC GAG TGG CCG AAT CTC	240
Gln Trp Met Glu Leu Asn Thr Lys Tyr Ser Ala Glu Trp Pro Asn Leu	
65 70 75 80	
ACG TCC AAG AAA GAT TCG CCG GAA GAT GCC GAC GAG TAC AAG GGC GTG	288
Thr Ser Lys Lys Asp Ser Pro Glu Asp Ala Asp Glu Tyr Lys Gly Val	
85 90 95	
GAA GGC AAG TTC GAG AAG TTC TTC TCG CCC GAG CCC GGC GAG GGC GAC	336
Glu Gly Lys Phe Glu Lys Phe Phe Ser Pro Glu Pro Gly Glu Gly Asp	
100 105 110	
TGA	339
*	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 113 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

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