



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0036102  
(43) 공개일자 2017년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 9/02* (2006.01) *C07K 14/37* (2006.01)

(71) 출원인

다니스코 유에스 인크.

*C12N 9/30* (2006.01)미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토  
페이지 밀 로드 925

(52) CPC특허분류

*C12N 9/0061* (2013.01)

(72) 발명자

*C07K 14/37* (2013.01)

마드리드 수잔 엠

(21) 출원번호 10-2017-7006654

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로  
드 925

(22) 출원일자(국제) 2015년08월14일

(74) 대리인

특허법인코리아나

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년03월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/045260

(87) 국제공개번호 WO 2016/025825

국제공개일자 2016년02월18일

(30) 우선권주장

62/038,095 2014년08월15일 미국(US)

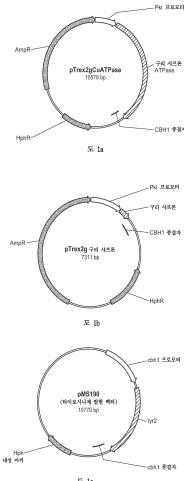
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 개선된 단백질 생성을 위한 조성물 및 방법

### (57) 요 약

본 발명의 측면은 숙주 세포에서 구리 수송에 관여하는 하나 이상의 단백질, 예를 들어, 막 결합 구리 수송 ATPase 및 가용성 구리 운반체의 발현 수준을 조작하여 숙주 세포로부터 분비되는 구리효소의 발현을 개선하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 하나 이상의 목적 구리효소를 함유하는, 개선된 숙주 세포 유래의 생성물 뿐만 아니라 이러한 개선된 숙주 세포를 함유하는 조성물을 제공한다.

### 대 표 도



(52) CPC특허분류  
**C12N 9/242** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

숙주 세포로부터 구리효소(cuproenzyme)를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은, 구리효소를 발현하는 숙주 세포에서 구리 금속샤프론(metallochaperone)을 과발현시키는 단계 및 구리효소를 생성하기 충분한 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서, 숙주 세포는 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 배양될 때 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포와 비교하여 증가된 양의 구리효소를 생성하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 구리효소가 숙주 세포로부터 분비되는, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 구리효소가 용해성 다당류 모노-옥시게나제(lytic polysaccharide monooxygenase; LPMO), 라카제, 타이로시나제, 아민 산화효소, 빌리루빈 산화효소, 카테콜 산화효소, 도파민 베타-모노옥시게나제, 갈락토스 산화효소, 헥소스 산화효소, L-아스코르브산 산화효소, 펩타이딜글리신 모노옥시게나제, 폴리페놀 산화효소, 퀘르세틴(quercetin) 2,3-다이옥시게나제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 구리효소가 숙주 세포에 내인성인, 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 구리효소가 숙주 세포에 이종성인, 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 구리효소 및/또는 구리 금속샤프론의 발현이 숙주 세포로부터 유래된 프로모터에 의해 제어되는, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 숙주 세포가 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*) (T. 레세이) 세포이고, 프로모터가 T. 레세이로부터 유래된 피루브산 키나제 (pki) 또는 셀로비오하이드롤라제(cellobiohydrolase) I (cbh1) 프로모터인, 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 적어도 하나의 추가의 구리효소를 발현하고, 적어도 하나의 추가의 구리효소의 생성 수준이 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포의 것과 비교하여 증가되는, 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 구리 금속샤프론이 막결합 구리 수송 ATPase(membrane-bound copper transporting ATPase)인, 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 막결합 구리 수송 ATPase가 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는,

방법.

### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 막결합 구리 수송 ATPase가 표 2에 열거된 것들로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 구리 금속샤프론이 가용성 구리 운반체인, 방법.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 가용성 구리 운반체가 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 가용성 구리 운반체가 표 1에 열거된 것들로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포에서 제2 구리 금속샤프론을 과발현시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 제1 구리 금속샤프론이 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막결합 구리 수송 ATPase이고, 제2 구리 금속샤프론이 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 구리 운반체인, 방법.

### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 사상 진균 숙주 세포인, 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 사상 진균 숙주가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: 아스페르길루스 (*Aspergillus*), 아크레모니움(*Acremonium*), 아우레오바시디움(*Aureobasidium*), 브베리아(*Beauveria*), 세팔로스포리움(*Cephalosporium*), 세리포리옵시스(*Ceriporiopsis*), 캐토미움 패실로마이세스(*Chaetomium paecilomyces*), 크리소스포리움(*Chrysosporium*), 클라비셉스(*Claviceps*), 코치오볼루스(*Cochiobolus*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 시아투스(*Cyathus*), 엔도티아(*Endothia*), 엔도티아 뮤코(*mucor*), 푸사리움(*Fusarium*), 글리오클라디움(*Gliocladium*), 후미콜라(*Humicola*), 마그나포르테(*Magnaporthe*), 미셀리오프토라(*Myceliophthora*), 미로테시움(*Myrothecium*), 뮤코, 뉴로스포라(*Neurospora*), 파네로케이트(*Phanerochaete*), 포도스포라(*Podospora*), 패실로마이세스(*Paecilomyces*), 페니실리움(*Penicillium*), 피리콜라리아(*Pyricularia*), 리조뮤코(*Rhizomucor*), 리조푸스(*Rhizopus*), 스키조필룸(*Schizophyllum*), 스타고노스포라(*Stagonospora*), 탈라로마이세스(*Talaromyces*), 트리코더마, 서모마이세스(*Thermomyces*), 서모아스쿠스(*Thermoascus*), 티엘라비아(*Thielavia*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 트리코파이톤(*Trichophyton*), 트라메테스(*Trametes*) 및 플레우로토스(*Pleurotus*).

### 청구항 19

제17항에 있어서, 사상 진균 숙주 세포가 *T. 레세이*, 아스페르길루스 니게르(*niger*), 아스페르길루스 오리자에(*oryzae*) 또는 탈라로마이세스 에메르소니(*emersonii*) 숙주 세포인, 방법.

### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 과발현시키는 단계가 숙주 세포에서 전사 인자 Mac1의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 21

제20항에 있어서, Mac1의 발현을 증가시키는 단계가 Mac1 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 22

숙주 세포의 구리 독성을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

숙주 세포에서 구리 금속샤프론을 과발현시키는 단계를 포함하며, 여기서 숙주 세포의 구리 독성은 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포와 비교하여 감소되는, 방법.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 숙주 세포가 구리효소를 과발현하는, 방법.

### 청구항 24

세포 배양 브로쓰에서 구리 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

구리를 포함하는 세포 배양 배지에서 구리 금속샤프론을 과발현하는 숙주 세포를 배양하여 세포 배양 브로쓰를 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 생성된 세포 배양 브로쓰 중의 구리의 수준은 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 실질적으로 동일한 세포 배양 배지에서 배양하는 경우, 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포로부터 얻어진 세포 배양 브로쓰의 것과 비교하여 감소되는, 방법.

### 청구항 25

구리효소를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드 및

구리 금속샤프론을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 숙주 세포로서,

여기서, 구리효소는 숙주 세포에서 발현되고, 구리 금속샤프론은 숙주 세포에서 과발현되며, 숙주 세포에서 구리효소의 발현 수준은 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포와 비교하여 증가되는, 재조합 숙주 세포.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 구리효소가 숙주 세포로부터 분비되는, 재조합 숙주 세포.

### 청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 구리효소가 용해성 다당류 모노-옥시케나제 (LPMO), 라카제, 타이로시나제, 아민산화효소, 빌리루빈 산화효소, 카테콜 산화효소, 도파민 베타-모노옥시케나제, 갈락토스 산화효소, 헥소스 산화효소, L-아스코르브산 산화효소, 웨타이딜글리신 모노옥시케나제, 폴리페놀 산화효소, 케르세틴 2,3-다이옥시케나제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 숙주 세포.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 구리효소가 표 3에 열거된 것들로부터 선택되는, 재조합 숙주 세포.

### 청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 구리효소가 숙주 세포에 이종성인, 재조합 숙주 세포.

### 청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 구리효소 및/또는 구리 금속샤프론의 발현이 숙주 세포의 프로모터에 의해 제어되는, 재조합 숙주 세포.

### 청구항 31

제30항에 있어서, 숙주 세포가 T. 래세이이고, 프로모터가 T. 래세이로부터 유래된 pki 또는 cbh1 프로모터인, 재조합 숙주 세포.

**청구항 32**

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드가 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막결합 구리 수송 ATPase를 암호화하는, 재조합 숙주 세포.

**청구항 33**

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드가 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 구리 운반체를 암호화하는, 재조합 숙주 세포.

**청구항 34**

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 제2 구리 금속샤프론을 암호화하는 제3 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는, 재조합 숙주 세포.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 제1 구리 금속샤프론이 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막결합 구리 수송 ATPase이고, 제2 구리 금속샤프론이 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 구리 운반체인, 재조합 숙주 세포.

**청구항 36**

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 숙주 세포가 사상 진균 숙주 세포인, 재조합 숙주 세포.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 사상 진균 숙주가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 숙주 세포: 아스페르길루스, 아크레모니움, 아우레오바시디움, 브베리아, 세팔로스포리움, 세리포리옴시스, 캐토미움 패실로마이세스, 크리소스포리움, 클라비셉스, 코치오볼루스, 크립토코커스, 시아투스, 엔도티아, 엔도티아 뮤코, 푸사리움, 글리오클라디움, 후미콜라, 마그나포르테, 미셀리오프토라, 미로테시움, 뮤코, 뉴로스포라, 파네로케이트, 포도스포라, 페실로마이세스, 페니실리움, 피리콜라리아, 리조뮤코, 리조푸스, 스키조필룸, 스타고노스포라, 탈라로마이세스, 트리코더마, 서모마이세스, 서모아스쿠스, 티엘라비아, 톨리포클라디움, 트리코파이톤, 트라메테스 및 플레우로투스.

**청구항 38**

제36항에 있어서, 사상 진균 숙주 세포가 T. 레세이, 아스페르길루스 니게르, 아스페르길루스 오리자에 또는 탈라로마이세스 에메르소니 숙주 세포인, 재조합 숙주 세포.

**청구항 39**

제25항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 숙주 세포가 Mac1을 과발현하며, Mac1의 과발현은 숙주 세포에서 구리 금속샤프론의 과발현을 유도하는, 재조합 숙주 세포.

**청구항 40**

제25항 내지 제39항 중 어느 한 항의 재조합 숙주 세포의 배양물로부터 얻은 상청액.

**청구항 41**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 얻은 상청액.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 관련 출원과의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2014년 8월 15일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/038,095호의 우선권을 주장하며, 이는 전체적으

로 본 명세서에 참고로 포함된다.

#### [0003] 서열 목록

37 C.F.R. § 1.52(e)에 따라 EFS를 통해 제출된 서열 목록이 본 명세서에 참고로 포함된다. EFS를 통해 제출된 서열 목록 텍스트 파일은 크기가 44 Kb이고 2015년 7월 10일자로 생성된 파일 "40456-WO-PCT\_ST25.txt"를 포함한다.

#### [0005] 기술분야

본 발명의 측면은 하나 이상의 구리 금속샤프론(metallochaperone), 예를 들어, 막 결합 구리 수송 ATPase 및 가용성 구리 운반체의 발현 수준을 조작하여 숙주 세포로부터 분비되는 구리효소(cuproenzyme)의 발현을 개선하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 하나 이상의 목적 구리효소(들)을 함유하는, 개선된 숙주 세포로부터 제조된 생성물뿐만 아니라 이러한 개선된 숙주 세포를 함유하는 조성물을 제공한다.

#### [0007] 서론

구리는 많은 효소 (본 명세서에서 구리효소로 지칭됨)에 필수적인 보조인자인 산화환원 활성 전이 금속이다. 그러나, 세포에서 유리 구리의 수준은 이의 독성으로 인해 낮은 수준으로 유지되어야 한다. 이와 같이, 총 세포의 구리의 0.01% 미만이 세포질에서 유리 상태이며; 대부분의 구리는 이의 세포-독성 효과를 방지하기 위해 메탈로티오네인에 의해 결합되고 퀼레이트된다. 또한, 세포 내의 상이한 구획은 상이한 수준의 구리를 가지는데, 미토콘드리아는 세포질보다 많은 수준의 구리를 가지며, 결과적으로 골지체보다 많은 수준의 구리를 갖는다.

세포에서의 유리 구리의 이용가능성의 제한은 이러한 효소를 과발현하도록 유전자 조작된(engineered) 재조합 숙주 세포에서 하나 이상의 기능적 구리효소를 생성하기 위한 산업 환경에서 문제가 된다. 상기 언급된 세포의 구리 구배(gradient)로 인해, 이러한 문제는 분비되는 구리효소를 생성하는 경우에 특히 두드러진다. 그러나, 숙주 세포의 배양 동안 숙주 세포에 독성이지 않으면서 기능적이고 분비되는 구리효소의 생성을 촉진하는 적절한 균형을 이루는 양으로 추가의 구리를 제공하는 것은 상당한 기술적 도전이다.

숙주 세포로부터의 구리효소의 생성과 관련된 문제 외에도, 산업 공장에서 배출되는 폐수에서 허용되는 구리 수준이 규제된다. 이와 같이, 얼마 만큼의 구리가 구리효소 발효 공정에 첨가될 수 있는지에 대한 상한이 또한 존재한다.

따라서, 재조합 숙주 세포 및 이러한 숙주 세포를 사용하여 발효 공정에서 구리효소의 생성을 개선하는 방법을 개발할 필요가 있다.

### 발명의 내용

#### 요약

본 발명의 측면은 원하는 재조합 숙주 세포, 예를 들어, 사상 진균 숙주 세포에서 하나 이상의 구리 금속샤프론의 발현 증가가 숙주 세포에서 분비되는 구리효소 생성을 개선할 수 있다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다. 따라서, 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 하나 이상의 구리 금속샤프론의 발현이 증가하지 않은 부모 숙주 세포와 비교하여 개선된 구리효소 생성/분비를 나타내는 하나 이상의 구리 금속샤프론의 발현이 증가된 재조합 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다. 이러한 숙주 세포로부터 구리효소를 생성하는 방법 및 이러한 숙주 세포로부터 생성된 구리효소를 함유하는 조성물이 또한 제공된다. 대상 조성을 및 방법에서 사용되는 분비되는 구리효소의 예에는 제한없이 용해성 다당류 모노-옥시게나제 (lytic polysaccharide mono-oxygenase; LPMO), 라카제, 타이로시나제, 아민 산화효소, 빌리루빈 산화효소, 카테콜 산화효소, 도파민 베타-모노옥시게나제, 갈락토스 산화효소, 헥소스 산화효소, L-아스코르브산 산화효소, 웨타이딜글리신 모노옥시게나제, 폴리페놀 산화효소, 퀘르세틴(quercetin) 2,3-다이옥시게나제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)가 포함된다.

본 발명의 측면은 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다:

1. 숙주 세포로부터 구리효소를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은 구리효소를 발현하는 숙주 세포에서 구리 금속샤프론을 과발현시키는 단계 및 구리효소를 생성하기 충분한 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서, 숙주 세포는 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 배양될 때 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는

상응하는 숙주 세포와 비교하여 증가된 양의 구리효소를 생성하는, 방법.

- [0016] 2. 구리효소가 숙주 세포로부터 분비되는, 1의 방법.
- [0017] 3. 구리효소가 용해성 다당류 모노-옥시게나제, 라카제, 타이로시나제, 아민 산화효소, 빌리루빈 산화효소, 카테콜 산화효소, 도파민 베타-모노옥시게나제, 갈락토스 산화효소, 헥소스 산화효소, L-아스코르브산 산화효소, 웨타이딜글리신 모노옥시게나제, 폴리페놀 산화효소, 퀘르세틴 2,3-다이옥시게나제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 1 또는 2의 방법.
- [0018] 4. 구리효소가 숙주 세포에 내인성인, 상기 어느 하나의 방법.
- [0019] 5. 구리효소가 숙주 세포에 이종성인, 상기 어느 하나의 방법.
- [0020] 6. 구리효소 및/또는 구리 금속샤프론의 발현이 숙주 세포로부터 유래된 프로모터에 의해 제어되는, 상기 어느 하나의 방법.
- [0021] 7. 숙주 세포가 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*) (T. 레세이) 세포이고, 프로모터가 T. 레세이로부터 유래된 퍼루브산 키나제(pki) 또는 셀로비오하이드롤라제(cellobiohydrolase) I (cbh1) 프로모터인, 6의 방법.
- [0022] 8. 숙주 세포가 적어도 하나의 추가의 구리효소를 발현하고, 적어도 하나의 추가의 구리효소의 생성 수준이 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포의 것과 비교하여 증가되는, 상기 어느 하나의 방법.
- [0023] 9. 구리 금속샤프론이 막 결합 구리 수송 ATPase인, 상기 어느 하나의 방법.
- [0024] 10. 막 결합 구리 수송 ATPase가 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 9의 방법.
- [0025] 11. 막 결합 구리 수송 ATPase가 표 2에 열거된 것들로부터 선택되는, 9 또는 10의 방법.
- [0026] 12. 구리 금속샤프론이 가용성 구리 운반체인, 1 내지 8 중 어느 하나의 방법.
- [0027] 13. 가용성 구리 운반체가 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 12의 방법.
- [0028] 14. 가용성 구리 운반체가 표 1에 열거된 것들로부터 선택되는, 12 또는 13의 방법.
- [0029] 15. 숙주 세포에서 제2 구리 금속샤프론을 과발현시키는 단계를 추가로 포함하는, 상기 어느 하나의 방법.
- [0030] 16. 제1 구리 금속샤프론이 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막 결합 구리 수송 ATPase이고, 제2 구리 금속샤프론이 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 구리 운반체인, 15의 방법.
- [0031] 17. 숙주 세포가 사상 진균 숙주인, 상기 어느 하나의 방법.
- [0032] 18. 사상 진균 숙주가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 17의 방법: 아스페르길루스(*Aspergillus*), 아크레모니움(*Acremonium*), 아우레오바시디움(*Aureobasidium*), 브베리아(*Beauveria*), 세팔로스포리움(*Cephalosporium*), 세리포리옴시스(*Ceriporiopsis*), 캐토미움 패실로마이세스(*Chaetomium paecilomyces*), 크리소스포리움(*Chrysosporium*), 클라비셉스(*Claviceps*), 코치오볼루스(*Cochiobolus*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 시아투스(*Cyathus*), 엔도티아(*Endothia*), 엔도티아 뮤코(*mucor*), 푸사리움(*Fusarium*), 글리오클라디움(*Gliocladium*), 후미콜라(*Humicola*), 마그나포르테(*Magnaporthe*), 미셀리오프토라(*Myceliophthora*), 미로테시움(*Myrothecium*), 뮤코, 뉴로스포라(*Neurospora*), 파네로케이트(*Phanerochaete*), 포도스포라(*Podospora*), 페실로마이세스(*Paecilomyces*), 페니실리움(*Penicillium*), 피리큘라리아(*Pyricularia*), 리조뮤코(*Rhizomucor*), 리조푸스(*Rhizophorus*), 스키조필룸(*Schizophyllum*), 스타고노스포라(*Stagonospora*), 탈라로마이세스(*Talaromyces*), 트리코더마, 서모마이세스(*Thermomyces*), 서모아스쿠스(*Thermoascus*), 티엘라비아(*Thielavia*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 트리코파이톤(*Trichophyton*), 트라메테스(*Trametes*) 및 플레우로투스(*Pleurotus*).
- [0033] 19. 사상 진균 숙주 세포가 트리코데르마 레세이, 아스페르길루스 니제르(*niger*), 아스페르길루스 오리자에(*oryzae*) 또는 탈라로마이세스 에메르소니(*emersonii*) 숙주 세포인, 17의 방법.
- [0034] 20. 과발현시키는 단계가 숙주 세포에서 전사 인자 Mac1의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 상기 어느 하나의 방법.

- [0035] 21. Mac1의 발현을 증가시키는 단계가 Mac1 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하는 단계를 포함하는, 20의 방법.
- [0036] 22. 숙주 세포의 구리 독성을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은, 숙주 세포에서 구리 금속샤프론을 과발현시키는 단계를 포함하며, 여기서 숙주 세포의 구리 독성은 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포와 비교하여 감소되는, 방법.
- [0037] 23. 숙주 세포가 구리효소를 과발현하는, 22의 방법.
- [0038] 24. 세포 배양 브로쓰에서 구리 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은, 구리를 포함하는 세포 배양 배지에서 구리 금속샤프론을 과발현하는 숙주 세포를 배양하여 세포 배양 브로쓰를 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 생성된 세포 배양 브로쓰 중의 구리의 수준은 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 실질적으로 동일한 세포 배양 배지에서 배양하는 경우, 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포로부터 얻어진 세포 배양 브로쓰의 것과 비교하여 감소되는, 방법.
- [0039] 25. 구리효소를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 구리 금속샤프론을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 숙주 세포로서, 여기서, 구리효소는 숙주 세포에서 발현되고, 구리 금속샤프론은 숙주 세포에서 과발현되며, 숙주 세포에서 구리효소의 발현 수준은 실질적으로 동일한 배양 조건 하에서 구리 금속샤프론을 과발현하지 않는 상응하는 숙주 세포와 비교하여 증가되는, 재조합 숙주 세포.
- [0040] 26. 구리효소가 숙주 세포로부터 분비되는, 25의 재조합 숙주 세포.
- [0041] 27. 구리효소가 용해성 다당류 모노-옥시게나제 (LPMO), 라카제, 타이로시나제, 아민 산화효소, 빌리루빈 산화효소, 카테콜 산화효소, 도파민 베타-모노옥시제나제, 갈락토스 산화효소, 헥소스 산화효소, L-아스코르브산 산화효소, 펩타이딜글리신 모노옥시제나제, 폴리페놀 산화효소, 퀘르세틴 2,3-다이옥시제나제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 25의 재조합 숙주 세포.
- [0042] 28. 구리효소가 표 3에 열거된 것들로부터 선택되는, 27의 재조합 숙주 세포.
- [0043] 29. 구리효소가 숙주 세포에 이종성인, 25 내지 28 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.
- [0044] 30. 구리효소 및/또는 구리 금속샤프론의 발현이 숙주 세포의 프로모터에 의해 제어되는, 25 내지 29 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.
- [0045] 31. 숙주 세포가 T. 레세이이고, 프로모터가 T. 레세이로부터 유래된 pki 또는 cbh1 프로모터인, 30의 재조합 숙주 세포.
- [0046] 32. 제2 폴리뉴클레오티드가 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막 결합 구리 수송 ATPase를 암호화하는, 25 내지 31 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.
- [0047] 33. 제2 폴리뉴클레오티드가 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 구리 운반체를 암호화하는, 25 내지 32 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.
- [0048] 34. 숙주 세포가 제2 구리 금속샤프론을 암호화하는 제3 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는, 25 내지 33 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.
- [0049] 35. 제1 구리 금속샤프론이 서열 번호:6과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막 결합 구리 수송 ATPase이고, 제2 구리 금속샤프론이 서열 번호:3과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 구리 운반체인, 34의 재조합 숙주 세포.
- [0050] 36. 재조합 숙주 세포가 사상 진균 숙주 세포인, 25 내지 35 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.
- [0051] 37. 사상 진균 숙주가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 36의 재조합 숙주 세포 아스페르길루스, 아크레모니움, 아우레오바시디움, 브베리아, 세팔로스포리움, 세리포리옵시스, 캐토미움 페실로마이세스, 크리소스포리움, 클라비셉스, 코치오볼루스, 크립토코커스, 시아투스, 엔도티아, 엔도티아 뮤코, 푸사리움, 글리오클라디움, 후미콜라, 마그나포르테, 미셀리오프토라, 미로테시움, 뮤코, 뉴로스포라, 파네로케이트, 포도스포라, 페실로마이세스, 페니실리움, 피리클라리아, 리조뮤코, 리조푸스, 스키조필룸, 스타고노스포라, 탈라로마이세스, 트리코더마, 서모마이세스, 서모아스쿠스, 티엘라비아, 톨리포클라디움, 트리코파이톤, 트라메테스 및 플레우로투스.
- [0052] 38. 사상 진균 숙주 세포가 T. 레세이, A. 니게르, A. 오리자에 또는 T. 에메르소니 숙주 세포인, 36의 재조합

숙주 세포.

[0053] 39. 재조합 숙주 세포가 Mac1을 과발현하며, Mac1의 과발현은 숙주 세포에서 구리 금속샤프론의 과발현을 유도하는, 25 내지 38 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포.

[0054] 40. 25 내지 39 중 어느 하나의 재조합 숙주 세포의 배양물로부터 얻은 상청액.

[0055] 41. 1 내지 21 중 어느 하나의 방법을 사용하여 얻은 상청액.

### 도면의 간단한 설명

[0056] 숙련자는 도면이 단지 설명을 목적으로 하는 것임을 이해할 것이다. 도면은 어떤 식으로든 본 발명의 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다.

도 1a 내지 도 1c. T. 레세이로부터 유래된 구리 금속샤프론의 발현 구조물의 개략도이다. (도 1a) 막 결합 구리 운반체 ATPase의 발현 구조물. (도 1b) 세포질 (가용성) 구리 운반체의 발현 구조물. 이러한 구리 금속샤프론 유전자는 항시성(constitutive) 피루브산 키나제 (PKI) 프로모터를 사용하여 발현되었고, CBH1 유전자로부터 유래된 종결자를 포함한다. 하이그로마이신 내성 유전자 선별 마커 (hphR)는 상기 플라스미드를 보유하는 형질전환체의 선별에 사용되었다. AmpR은 박테리아 세포에서 플라스미드의 증식에 사용되는 앰피실린 내성 유전자이다. (도 1c) T. 레세이 타이로시나제 (아미노산 서열: 서열 번호:9)를 과발현시키기 위한 발현 벡터. 타이로시나제는 cbh1 프로모터로부터 전사되었고, cbh1 전사 종결자를 뒤따랐다.

도 2. SDS-PAGE에 의한 14 리터 규모의 발효에서의 타이로시나제-과다생성 균주의 세포외 단백질 발현의 분석. 배양 시간이 시간 단위로 하단에 도시되어 있고, 구리 공급(feed)의 시작은 상향 화살표로 나타나 있다. 타이로시나제 및 엔도글루카나제 6 단백질 밴드가 왼쪽에 나타나 있다 (각각 Tyr 및 EG6). 구리-함유 타이로시나제 효소는 69시간 내에 최고 생성을 나타내었고, 남은 시간 경과 동안 축적은 감소되었다. 대조적으로, 구리를 함유하지 않는 효소인 엔도글루카나제 6 (EG6)은 전체 시간 경과에 걸쳐 축적이 증가함을 보여주었다.

도 3. 타이로시나제 발현에 대한 구리 수준 증가의 영향. 증가하는 양의 구리 (각 레인의 하단에 나타냄)의 존재 하에 타이로시나제 (Tyr)의 발현을 나타내는 SDS-PAGE. 이러한 도면에서 나타낸 바와 같이, 성장 배지에 황산구리의 양을 증가하면 타이로시나제의 합성이 감소하였다.

도 4. 0 내지 1000 μM 범위의 상이한 구리 농도에서 배양된 타이로시나제를 과다생성하는 2개의 상이한 균주 (균주 A 및 균주 C, 각각 상부 패널 및 하부 패널)의 분석. 단백질 생성에 악영향을 주지 않는 구리의 최고 농도는 약 15 μM이었다. 15 μM 초과의 구리 수준은 타이로시나제 생성 수준을 감소시킨다. 기질로 타이로신을 사용하고 286 nm (열린 막대) 및 470 nm (채워진 막대)에서 생성물의 형성을 검출하여 배양 상청액에 존재하는 타이로시나제 활성을 측정하였다.

도 5. 타이로시나제 활성에 대한 스폷 분석(spot assay)을 사용하여 검출가능한 타이로시나제가 생성되지 않는 높은 수준의 구리 (6mM)의 존재 하에 배양된 이들 균주에 존재하는 타이로시나제 활성을 검출하였다. 타이로시나제 활성은 점선으로 그려진 균주 A (레인 8의 웰) 및 균주 C (레인 1의 웰)의 대조군 웰에서 검출되지 않을 수 있다. 균주 A 및 균주 C의 타이로시나제를 생성하는 능력은 이들 균주가 막 결합 구리 수송 ATPase 발현 플라스미드 (레인 2 내지 7의 웰) 또는 세포질 (가용성) 구리 운반체 발현 플라스미드 (레인 9 내지 12의 웰)로 재형질전환(retransform)되는 경우 회복되었다. 따라서, 이들 구리 금속샤프론 중 어느 하나의 발현은 구리 독성을 감소시킬 수 있어, 결과적으로 타이로시나제 구리효소의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 분석에서 10 μL의 배양 상청액과 200 μL의 10% 탈지유 (35°C로 예열됨)를 미량정량판(microtiter plate)에서 조합하고, 혼합물을 35°C에서 적어도 10분 동안 인큐베이션하여 타이로시나제 활성이 검출되었다. 타이로시나제가 존재하고 활성인 경우 우유가 흰색에서 적색으로 변하였다. 플러스 부호는 검출가능한 적색의 웰을 나타낸다.

도 6. CBH1 신호 서열 및 cbh1 전사 종결자를 갖는 cbh1 프로모터로부터 전사된 라카제 D 유전자를 나타내는 세레나 유니컬러(*Cerrena unicolor*) 유래의 구리 금속단백질 라카제 D에 대한 발현 벡터 구조물. 성숙(mature) 라카제 D 서열은 서열 번호: 10이다.

도 7a 내지 도 7c. 구리 금속샤프론의 과발현 유무에 관계없이 라카제 D를 과발현하는 균주 (균주 32A)에서 라카제 D 생성의 분석. 도 7a는 균주 32A (최좌측 막대; 100%로 설정됨) 및 이로부터 유래된, 세포질 운반체 및 막결합 구리 수송 ATPase를 모두 과발현하는 (도 1a 및 도 1b에 도시된 발현 벡터로 형질전환됨) 균주 (#46, #47 및 #48)에서의 라카제 D의 상대적인 발현 수준을 나타낸다. 도 7b는 균주 32A (최좌측 막대; 100%로 설정

됨) 및 이로부터 유래된, 막결합 구리 수송 ATPase를 과발현하는 (도 1a에 도시된 발현 벡터로 형질전환된) 균주 (#2, #16, #29, #30 및 #31)에서의 라카제 D의 상대적인 발현 수준을 나타낸다. 도 7c는 균주 32A (최좌측 막대; 100%로 설정됨) 및 이로부터 유래된, 세포질 구리 운반체를 과발현하는 (도 1b에 도시된 발현 벡터로 형질전환된) 균주 (#5, #22, #27 및 #35)에서의 라카제 D의 상대적인 발현 수준을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057]

세포질 (가용성) 구리 금속샤프론과 막 결합성 구리 금속샤프론 모두는 구리에 결합하여 이를 구리 금속-단백질 (예를 들어, 구리효소)로 흡입될 수 있는 세포내 위치로 수송하는 역할을 한다 (예를 들어, 문헌 [O'Halloran et al., Metallochaperones, an intracellular shuttle service, for metal ions. 2000 JBC: 275 (33):25057-25060]; 및 문헌 [Robinson et al., Copper Metallochaperones 2010 Annu. Rev. Biochem. 79:537-62] 참조). 분비되는 구리효소의 경우, 다수의 구리 금속샤프론의 작용으로 구리를 세포질 구리 운반체 (예를 들어, 효모 Atx1 폴리펩티드 및 이의 상동체) 및 골지 막 결합 구리 투과효소 (예를 들어, 효모 Ccc2 폴리펩티드 및 이의 상동체)를 포함하는 골지 복합체의 내강으로 수송한다. 골지에서, 구리는 발현/접힘/분비 공정 동안 구리효소로 흡입될 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Huffman et al. Energetics of Copper Trafficking between Atx1 metallochaperone & the intracellular Copper transporter, Ccc2. 2000 JBC 275(25). 18611-18614] 참조) 구리 금속샤프론은 분석된 모든 진핵 생물 사이에 고도로 보존되어 있다.

[0058]

본 발명의 교시는 숙주 세포에서의 구리효소 분비가 하나 이상의 구리 금속샤프론을 과발현함으로써 개선될 수 있다는 발견에 기초한다. 따라서, 본 발명의 교시는 숙주 세포, 예를 들어, 사상 진균에서 가용성 구리 운반체, 막 결합 구리 운반체 또는 둘 다와 같은 하나 이상의 구리 금속샤프론을 과발현함으로써 단백질 분비를 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 교시는 또한 분비 증가를 위한 특정 구리 금속샤프론(들) 및 목적 구리효소를 함유하는 발현 숙주, 예를 들어, 사상 진균을 제공한다.

[0059]

본 발명의 조성을 및 방법을 보다 상세하게 설명하기 전에, 본 발명의 조성을 및 방법이 기재된 특정 실시 형태에 제한되지 않으며, 따라서 당연히 변할 수 있음을 이해하여야 한다. 본 발명의 조성을 및 방법의 범주는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이므로, 본 명세서에 사용되는 용어는 단지 특정 실시 형태를 설명할 목적을 위한 것이며 제한하고자 하는 것이 아님을 또한 이해하여야 한다.

[0060]

값의 범위가 제공되는 경우에, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 그 범위의 상한과 하한 사이의 하한의 단위의 1/10까지의 각각의 개재된 값, 및 언급된 범위의 임의의 다른 언급되거나 개재된 값이 본 발명의 조성을 및 방법 내에 포함된다는 것을 이해하여야 한다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위 내에 포함될 수 있고, 언급된 범위 내의 임의의 구체적으로 배제된 한도를 조건으로 본 발명의 조성을 및 방법 내에 또한 포함된다. 언급된 범위가 한도 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우에, 이러한 포함된 한도 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제하는 범위가 또한 본 발명의 조성을 및 방법에 포함된다.

[0061]

본 명세서에서 소정 범위는 용어 "약"이 선행되는 수치 값으로 제시된다. 본 명세서에서 용어 "약"은 이것이 선행하는 정확한 수뿐만 아니라 용어가 선행하는 수에 근사하거나 대략적인 수에 대한 문자적 지원(literal support)을 제공하기 위해 사용된다. 수가 구체적으로 명시된 수에 근사하거나 대략적인지를 결정하는데 있어서, 근사하거나 대략적인 명시되지 않은 수는 그것이 제시되는 문맥에서 구체적으로 명시된 수의 실질적 등가물을 제공하는 수일 수 있다. 예를 들어, 수치 값과 관련하여, 용어 "약"은 그 용어가 문맥에서 달리 구체적으로 정의되지 않는다면, 수치 값의 -10% 내지 +10%의 범위를 지칭한다. 다른 예에서, 문구 "약 6의 pH 값"은 pH 값이 달리 구체적으로 정의되지 않는다면, 5.4 내지 6.6의 pH 값을 지칭한다.

[0062]

본 명세서에 제공된 표제는 본 명세서 전체를 참조하여 가질 수 있는 본 발명의 조성을 및 방법의 다양한 측면 또는 실시 형태의 제한이 아니다. 따라서, 바로 아래 정의된 용어는 명세서 전체를 참조하여 더욱 완전하게 정의된다.

[0063]

본 발명의 공보는 읽기 쉽도록 여러 섹션으로 구성되어 있지만, 독자는 한 섹션의 서술이 다른 섹션에도 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 방식으로, 본 명세서의 상이한 섹션에 사용된 표제가 제한적인 것으로 해석되어서는 안된다.

[0064]

달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명의 조성을 및 방법이 속하는 기술 분야의 통상의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기술되는 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 조성을 및 방법의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 대표

적인 예시적인 방법 및 재료가 이제 기술된다.

[0065] 본 명세서에서 언급된 모든 공보 및 특허는 각각의 개별 공보 또는 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 지시되는 것처럼 본 명세서에 참고로 포함되며, 공보와 관련하여 인용되는 방법 및/또는 재료를 개시하고 기술하기 위해 본 명세서에 참고로 포함된다. 임의의 공보의 인용은 출원일 전의 이의 개시내용을 위한 것이고, 본 발명의 조성물 및 방법이 선행 발명에 의해 이러한 공보에 선행하도록 권한 부여되지 않는다는 인정으로서 해석되지 않아야 한다. 또한, 제공된 공개 일자는 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개 일자와 상이할 수 있다.

[0066] 이러한 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 따라, 하기 약어 및 정의가 적용된다. 단수형 ("a", "an" 및 "the")은 그 문맥에서 명확하게 달리 기술되지 않으면 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 효소"에 대한 언급은 복수의 이러한 효소를 포함하고, "투여량"에 대한 언급은 하나 이상의 투여량 및 당업자에게 알려진 이들의 등가물에 대한 언급 등을 포함한다.

[0067] 청구항이 임의의 선택적 요소를 배제하도록 기안될 수 있음에 또한 유의한다. 이와 같이, 이러한 서술은 청구항 요소의 설명과 관련하여 "다만", "단지" 등과 같은 이러한 배제적인 용어의 사용이나, "부정적" 제한의 사용에 대한 선행 근거(antecedent basis)의 역할을 하도록 의도된다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "로 본질적으로 이루어진"은 용어 앞의 성분(들)이 총 조성물의 30 wt% 미만의 총량으로, 성분(들)의 활동 또는 활동들에 기여하거나 이를 방해하지 않는 다른 알려진 성분(들)의 존재하에 있는 조성물을 지칭함에 또한 유의한다.

[0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "포함하는"은 용어 "포함하는" 앞의 성분(들)을 포함하지만, 이에 한정되지 않음을 의미함에 또한 유의한다. 용어 "포함하는" 앞의 성분(들)은 요구되거나 필수적이지만, 성분(들)을 포함하는 조성물은 다른 필수적이지 않거나 선택적인 성분(들)을 추가로 포함할 수 있다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "로 이루어진"은 용어 "로 이루어진" 앞의 성분(들)을 포함하고 이에 한정됨을 의미함에 유의한다. 따라서, 용어 "로 이루어진" 앞의 성분(들)은 요구되거나 필수적이며, 조성물에 다른 성분(들)이 존재하지 않는다.

[0071] 본 명세서를 읽을 시에 당업자에게 명백할 바와 같이, 본 명세서에 기술되고 예시된 각각의 개별적인 실시 형태는 본 명세서에 기재된 본 발명의 조성물 및 방법의 범주 또는 사상에 벗어남이 없이 다른 여러 실시 형태 중 어느 하나의 특징과 용이하게 분리되거나 병용될 수 있는 별개의 성분 및 특징을 갖는다. 임의의 명시된 방법은 명시된 이벤트의 순서로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

## 정의

[0073] 본 명세서에서 용어 "암호화 서열"은 프로모터를 포함하는 적절한 조절 서열의 제어 하에 놓인 경우 폴리펩티드로 번역될 수 있는 mRNA로 전사되는 핵산 서열로 정의된다. 암호화 서열은, 예를 들어, 단일 오픈 리딩 프레임 또는 인트론으로 분리된 여러 오픈 리딩 프레임을 함유할 수 있다. 암호화 서열은, 예를 들어, cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA 또는 재조합 DNA일 수 있다. 암호화 DNA 서열은 일반적으로 시작 코돈 (예를 들어, ATG)에서 시작하여 종결 코돈 (예를 들어, TAA, TAG 및 TGA)에서 종료된다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "구리 금속샤프론" 또는 "구리 샤프론"은 세포에서 구리의 수송 및/또는 구리의 구리-요구 금속-효소 (구리효소로도 불림)로의 혼입을 촉진시키는 단백질이다. 구리 금속샤프론은 세포질 (또는 가용성) 구리 운반체 (예를 들어, 서열 번호:3 및 표 1), 막 결합 구리 운반체 (예를 들어, 서열 번호: 12, 13, 14 및 15; 이들의 상동체; 및 구리 수송 활성을 보유하는 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열) 및 막 결합 수송 ATPase (예를 들어, 서열 번호:6 및 표 2)를 포함한다. 후자는 골지 막에 존재하는 구리 금속샤프론을 포함하며, 이는 구리를 속주 세포로부터 분비될 단백질 (및 "구리 투과효소", "구리 운반체 ATPase" 등으로도 지칭됨)로 수송한다.

[0075] "구리효소"는 하나 이상의 구리 원자를 함유하는 임의의 금속효소이다. 예에는 용해성 다당류 모노-옥시게나제 (LPMO), 라카제, 타이로시나제, 아민 산화효소, 빌리루빈 산화효소, 카테콜 산화효소, 도파민 베타-모노옥시제나제, 갈락토스 산화효소, 핵소스 산화효소, L-아스코르브산 산화효소, 펩타이딜글리신 모노옥시제나제, 폴리페놀 산화효소, 퀘르세틴 2,3-다이옥시제나제 및 수퍼옥사이드 디스뮤타제가 포함되나, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 용어 "로부터 유래된"은 용어 "로부터 기원한," "로부터 얻은," "로부터 얻을 수 있는," "로부터 단리된" 및 "

로부터 생성된"을 포함하며, 일반적으로 다른 특정 재료에서 이의 기원을 찾거나 다른 특정 재료와 관련하여 기술될 수 있는 특징을 갖는 하나의 특정 재료를 나타낸다.

[0077] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "DNA 구조물"은 적어도 2개의 인접 DNA 폴리뉴클레오티드 단편을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0078] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 관련 용어 "내인성"은 숙주 세포에서 자연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0079] 용어 "발현"은 핵산 서열에 기초하여 폴리펩티드가 생성되는 공정을 지칭한다. 공정은 전사와 번역을 포함한다.

[0080] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "발현 벡터"는 적합한 숙주에서 하나 이상의 폴리펩티드의 발현에 영향을 줄 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 특정 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조물을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사에 영향을 주는 프로모터, 전사를 조절하는 임의의 오퍼레이터 서열, mRNA 상에 적합한 리보솜-결합 부위를 암호화하는 서열 및 전사와 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함할 수 있다. 상이한 세포 유형이 상이한 발현 벡터와 사용될 수 있다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에 사용되는 벡터에 대한 예시적인 프로모터는 AprE 프로모터이고; 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*)에 사용되는 예시적인 프로모터는 A4 프로모터 (아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 유래)이며; 대장균(*E. coli*)에서 사용되는 예시적인 프로모터는 Lac 프로모터이고, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 사용되는 예시적인 프로모터는 PGK1이며, 아스페르길루스 니게르에서 사용되는 예시적인 프로모터는 glaA이고, T. 레세이에 대한 예시적인 프로모터에는 pki 및 cbhI이 포함된다. 벡터는 플라스미드, 과자 입자 또는 단순히 잠재적인 게놈 삽입물일 수 있다. 일단 적합한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과는 독립적으로 복제하고 기능할 수 있거나, 적합한 조건 하에 게놈 자체로 통합될 수 있다. 본 명세서에서, 플라스미드 및 벡터는 종종 상호교환 가능하게 사용된다. 그러나, 본 발명의 조성을 및 방법은 동등한 기능을 수행하며, 본 기술 분야에 알려지거나 앞으로 알려질 다른 형태의 발현 벡터를 포함하고자 한다. 따라서, 광범위한 숙주/발현 벡터 조합이 본 명세서에 기재된 DNA 서열을 발현하는 데 사용될 수 있다.

[0081] 유용한 발현 벡터는, 예를 들어, SV40의 다양한 알려진 유도체 및 알려진 박테리아 플라스미드, 예를 들어, col E1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC 19 및 이들의 유도체를 포함하는 대장균 유래의 플라스미드, 보다 넓은 숙주 범위의 플라스미드, 예를 들어, RP4, 과자 DNA, 예를 들어, 과자 λ의 많은 유도체, 예를 들어, NM989, 및 다른 DNA 과자, 예를 들어, M13 및 사상성 단일 가닥 DNA 과자, 효모 플라스미드, 예컨대 2 μ 플라스미드 또는 이의 유도체, 진핵 세포에서 유용한 벡터, 예컨대 동물 세포에서 유용한 벡터 및 플라스미드와 과자 DNA의 조합으로부터 유래된 벡터, 예컨대 과자 DNA 또는 다른 발현 조절 서열을 사용하도록 변형된 플라스미드와 같은 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열의 세그먼트로 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성을 및 방법의 발현 벡터를 사용하는 발현 기술이 본 기술 분야에 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press (1989)]에 일반적으로 기재되어 있다. 종종, 본 명세서에 기재된 DNA 서열을 포함하는 이러한 발현 벡터는 통합 이벤트를 통한 특정 종의 게놈으로의 직접 삽입에 의해 단세포 숙주로 형질전환된다 (예를 들어, 문헌[Bennett & Lasure, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego, pp. 70-76 (1991)] 및 진균 숙주에서의 표적화된 게놈 삽입을 기술하는 그 안에 인용된 논문 참조).

[0082] 용어 "사상 진균"은 유마이코티나(Eumycotina) 아문의 모든 사상 형태를 지칭한다 (문헌[Alexopoulos, C. J. (1962), INTRODUCTORY MYCOLOGY, Wiley, New York] 참조). 이를 진균은 키틴, 글루칸 및 기타 복합 다당류로 이루어진 세포벽을 지닌 영양 균사체(vegetative mycelium)를 특징으로 한다. 본 발명의 교시의 사상 진균은 형태학적으로, 생리학적으로, 그리고 유전학적으로 효모와 상이하다. 사상 진균에 의한 영양 성장은 균사 연장에 의해 이루어지며, 탄소 이화작용은 필수적으로 호기성이다. 사상 진균은 유마이코티나 아문, 특히 주발버섯 아문(*Pezizomycotina*) 종의 모든 사상 형태를 포함한다. 사상 진균 부모 세포는 트리코더마, 예를 들어, 트리코더마 롱지브라치아툼(*longibrachiatum*), 트리코더마 비리데(*viride*), 트리코더마 코닝기이(*koningii*), 트리코더마 하르지아눔(*harzianum*); 페니실리움 종; 후미콜라 인솔렌스(*insolens*) 및 후미콜라 그리세아(*grisea*)를 포함하는 후미콜라 종; C. 루크노웬세(*lucknowense*)를 포함하는 크리소스포리움 종; 미셀리오프토라 종; 글리오클라디움 종; 아스페르길루스 종; 푸사리움 종, 뉴로스포라 종, 하이포크레아(*Hypocreale*) 종, 예를 들어, 하이포크레아 제코리나(*jecorina*) 및 에머리셀라(*Emericella*) 종의 세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "트리코더마" 또는 "트리코더마 종"은 이미 트리코더마로 분류되었거나 현재 트

리코더마로 분류되는 임의의 진균 균주를 지칭한다. 소정 실시 형태에서, GH61 효소는 비사상균성 진균 세포 유래일 수 있다. GH61A 효소의 예에는 하이포크레아 제코리나 (트리코더마 래세이), 하이포크레아 루파(*rufa*), 하이포크레아 오리엔탈리스(*orientalis*), 하이포크레아 아트로비리디스(*atroviridis*), 하이포크레아 비렌스 (*virens*), 에미리셀라 니둘란스(*nidulans*), 아스페르길루스 테레우스(*terreus*), 아스페르길루스 오리자에, 아스페르길루스 니케르, 아스페르길루스 카와치(*kawachii*), 아스페르길루스 플라부스(*flavus*), 아스페르길루스 클라바투스(*clavatus*), 가에우만노마이세스 그라미니스(*Gaeumannomyces graminis*), 트리코더마 사투르니스포룸 (*saturnisporum*), 뉴로스포라 테트라스퍼마(*tetrasperma*), 뉴로스포라 크라사(*crassa*), 네오사르토르야 푸미가테(*Neosartorya fumigata*), 네오사르토르야 푸미가테, 네오사르토르야 피세리(*fischeri*), 티엘라비아 테레스트리스(*Thielavia terrestris*) 및 티엘라비아 혜테로탈리카(*heterothallica*)에서 발견되는 것들이 포함된다.

[0083] 용어 "이종성"은 보통 서로 관련되지 않는 요소를 지칭한다. 예를 들어, 재조합 숙주 세포가 이종성 단백질을 생성하는 경우, 그 단백질은 동일한 유형의 야생형 숙주 세포에서 생성되지 않고, 이종성 프로모터는 야생형 숙주 세포에 내인성인 핵산에 존재하지 않는 프로모터이며, 이종성 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터는 야생형 숙주 세포에서 보통 작동가능하게 연결되지 않는 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터이다.

[0084] "이종성" 핵산 구조물 또는 서열은 이것이 발현되는 세포에 고유하지 않은 서열의 일부를 갖는다. 조절 서열과 관련하여 이종성은 현재 조절하고 있는 유전자의 발현과 동일한 유전자를 조절하는 기능을 본질적으로(in nature) 하지 않는 조절 서열(즉, 프로모터 또는 인핸서)을 지칭한다. 일반적으로, 이종성 핵산 서열은 그들이 존재하는 세포 또는 계놈의 일부에 내인성이 아니며, 감염, 형질주입, 형질전환, 미세주입, 전기천공 등에 의해세포에 첨가되었다. "이종성" 핵산 구조물은 고유 세포에서 발견되는 조절 서열/DNA 암호화 서열 조합과 동일하거나 상이한 조절 서열/DNA 암호화 서열 조합을 함유할 수 있다.

[0085] "상동체" 또는 "상동성"은 생체분자가 나타낸 대상 아미노산 서열(들) 또는 대상 뉴클레오티드 서열(들)과 특정 동일성의 정도를 가짐을 의미한다. 상동성 서열은 통상적인 서열 정렬 도구(예를 들어, 클러스탈(Clustal), BLAST 등)를 사용하여 대상 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 심지어 99% 동일한 아미노산 또는 핵산 서열을 포함하도록 취해진다. 전형적으로, 대상 효소의 상동체는 달리 명시되지 않는다면, 대상 효소와 동일한/유사한 활성 부위 잔기를 포함하고/하거나 유사한 효소 활성을 나타낼 것이다.

[0086] 서열 정렬을 수행하고 서열 동일성을 측정하는 방법은 숙련자에게 알려져 있고, 과도한 실험없이 수행될 수 있으며, 동일성 값의 계산은 한정적으로 얻어질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)]; 및 문헌[the ALIGN program (Dayhoff (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.)을 참조하라. 서열을 정렬하고 서열 동일성을 측정하기 위한 다수의 알고리즘이 이용가능하며, 예를 들어, 문헌[Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘; 문헌[Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482]의 국소 상동성 알고리즘; 문헌[Pearson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444]의 유사성 검색 방법; 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 알고리즘 (문헌[Meth. Mol. Biol. 70:173-187 (1997)]; 및 BLASTP, BLASTN 및 BLASTX 알고리즘 (문헌[Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410] 참조)을 포함한다.

[0087] 이를 알고리즘을 사용한 컴퓨터화된 프로그램이 또한 이용가능하며, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어 또는 WU-BLAST-2 (문헌[Altschul et al., *Meth. Enzym.*, 266:460-480 (1996)]); 또는 미국 위스콘신 주 매디슨 소재의 제네티스 컴퓨팅 그룹(Genetics Computing Group; GCG) 패키지, 버전 8에서 이용가능한 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 및 TFASTA; 및 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 인텔리제네틱스(Intellicogenetics)에 의한 클러스탈 PC/GENE 프로그램을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 당업자는 비교되는 서열의 길이에 대하여 최대 정렬을 달성하는데 필요한 알고리즘을 포함하는 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 바람직하게는, 서열 동일성을 프로그램에 의해 결정된 디폴트(default) 파라미터를 사용하여 측정된다. 구체적으로, 서열 동일성을 하기와 같은 디폴트 파라미터를 갖는 클러스탈 W (문헌[Thompson J.D. et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680])을 사용하여 측정될 수 있다:

캡 개방 폐널티(Gap opening penalty):	10.0
캡 연장 폐널티(GAP extension penalty):	0.05
단백질 가중 매트릭스(Protein weight matrix):	BLOSUM 시리즈
DNA 가중 매트릭스:	IUB
지연 분기 서열(Delay divergent sequences) %:	40
캡 분리 거리(Gap separation distance):	8
DNA 전이 가중치:	0.50
친수성 잔기 리스트:	GPSNDQEKR
네거티브 매트릭스 사용:	OFF
잔기 특이적 폐널티 토글(Toggle):	ON
친수성 폐널티 토글:	ON
엔드 캡 분리 폐널티(end gap separation penalty) 토글	OFF

[0088]

본 명세서에 사용되는 바와 같은 "숙주 세포" 또는 "숙주 균주"는, 예를 들어, 특정 유전자를 발현시키고, 벡터를 증식시키는 등의 특정 목적에 적합한 세포를 의미한다. 소정 실시 형태에서, 숙주 세포는 본 발명의 조성물 및 방법에 따라 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다 (예를 들어, 구리효소 및/또는 하나 이상의 구리 금속사프론을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열). 숙주 세포는 원하는 폴리펩티드/효소 (또는 다수의 폴리펩티드/효소)를 발현시키고/시키거나 벡터의 증식을 위해 사용되는 임의의 형질전환가능한 미생물을 포함하는 원핵 및 진핵 유기체를 모두 포함한다. 숙주 세포의 예에는 바실루스, 스트렙토마이세스, 에스케리키아(*Escherichia*), 트리코더마, 아스페르길루스, 사카로마이세스 등의 종이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 소정 측면에서, 숙주 세포는 재조합 숙주 세포, 즉, 자연에서 발견되지 않는 세포이다 (하기 "재조합"의 정의를 참조하라).

[0090]

핵산 서열을 세포로 삽입하는 것과 관련하여 용어 "도입된"은 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 "형질주입", "형질전환" 또는 "형질도입"을 의미한다.

[0091]

본 명세서에 사용되는 바와 같은 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 서열 동일성"은 필요한 경우 최대 정렬 (퍼센트 서열 동일성)을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 캡을 도입한 후에 목적 서열 (예를 들어, 금속사프론 단백질 서열) 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로 정의되며, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 고려하지 않는다.

[0092]

"정제된" 또는 "단리된" 또는 "농축된"은 생체분자 (예를 들어, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드)가 분자가 본질적으로 결합되어 있는 자연 발생 성분의 일부 또는 전부로부터 분리됨으로써 이의 자연 상태로부터 변형된 것을 의미한다. 이러한 단리 또는 정제는 최종 조성물에서 바람직하지 않은 전체 세포, 세포 잔해, 불순물, 외부 단백질 또는 효소를 제거하기 위한 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 분리, 투석, 프로테아제 처리, 황산암모늄 침전 또는 다른 단백질 염 침전, 원심분리, 크기 배제 크로마토그래피, 여과, 미세여과, 겔 전기연동 또는 구배에 대한 분리와 같은 기술 분야에서 인정한 분리 기술에 의해 달성될 수 있다. 이어서, 정제된 또는 단리된 생체분자 조성물 (예를 들어, 정제된 폴리펩티드)에 추가의 이점을 제공하는 성분, 예를 들어, 활성화제, 항-억제제, 바람직한 이온, pH를 조절하는 화합물 또는 다른 효소 또는 화학물질을 추가

하는 것이 또한 가능하다.

[0093] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "미생물"은 박테리아, 진균, 바이러스, 원생동물 및 다른 미생물 또는 미세한 (microscopic) 유기체를 지칭한다.

[0094] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호교환가능하게 사용되며, DNA, RNA, cDNA, 단일 가닥 또는 이중 가닥 및 이들의 화학적 변형을 포함한다. 유전자 코돈이 축퇴(degenerate)적이기 때문에, 하나 초과의 암호가 사용되어 특정 아미노산을 암호화할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 암호화하는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0095] 용어 "작동가능하게 연결된"은 기능적으로 관련된 요소의 배열을 지칭한다. 예를 들어, 프로모터가 서열의 전사를 제어하는 경우 암호화 서열에 작동가능하게 연결되고, 신호 서열이 숙주 세포의 분비 시스템을 통해 단백질을 유도하는 경우, 신호 서열은 단백질에 작동가능하게 연결된다.

[0096] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "폴리펩티드" 및 "효소"는 펩티드 결합으로 연결된 아미노산 잔기를 포함하는 임의의 길이의 중합체를 지칭하는 데 상호교환가능하게 사용된다. 아미노산 잔기에 대한 통상적인 1-문자 또는 3-문자 암호가 본 명세서에서 사용된다. 중합체는 선형이거나 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 용어는 또한 자연적으로 또는 개입에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함하며; 예를 들어, 이황화물 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지화 성분과의 결합을 포함한다. 예를 들어, 본 기술 분야에 알려진 다른 변형뿐만 아니라 아미노산의 하나 이상의 유사체를 함유하는 (예를 들어, 비고유 아미노산 등을 포함하는) 폴리펩티드가 또한 정의 내에 포함된다.

[0097] 용어 "프로모터"는 본 명세서에서 세포 내 하류 폴리뉴클레오티드의 전사를 유도하는 핵산으로 정의된다. 소정 경우에, 폴리뉴클레오티드는 암호화 서열을 함유할 수 있고, 프로모터는 암호화 서열의 전사를 번역가능한 RNA로 유도할 수 있다.

[0098] 생물학적 성분 또는 조성물 (예를 들어, 세포, 핵산, 폴리펩티드/효소, 벡터 등)과 관련하여 사용되는 경우 용어 "재조합"은 자연에서 발견되지 않는 상태의 생물학적 성분 또는 조성물을 나타낸다. 다시 말하면, 생물학적 성분 또는 조성물은 사람의 개입에 의해 이의 자연 상태로부터 변형되어 왔다. 예를 들어, 재조합 세포 (또는 숙주 세포)는 이의 고유 부모 (즉, 비-재조합) 세포에서 발견되지 않는 하나 이상의 유전자를 발현하는 세포, 이의 고유 부모 세포와 상이한 양으로 하나 이상의 고유 유전자를 발현하는 세포 및/또는 이의 고유 부모 세포와 상이한 조건 하에서 하나 이상의 고유 유전자를 발현하는 세포를 포함한다. 재조합 핵산은 하나 이상의 뉴클레오티드에 의해 고유 서열과 상이할 수 있고/있거나, 이종성 서열 (예를 들어, 이종성 프로모터, 비고유 또는 변이 신호 서열을 암호화하는 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있고/있거나, 인트론 서열이 결핍되고/되거나 단리된 형태일 수 있다. 재조합 폴리펩티드/효소는 하나 이상의 아미노산에 의해 고유 서열과 상이할 수 있고/있거나, 이종성 서열과 융합될 수 있고/있거나, 절단되거나 아미노산의 내부 결실을 가질 수 있고/있거나, 고유 세포에서 발견되지 않는 방식으로 발현될 수 있고/있거나 (예를 들어, 폴리펩티드를 암호화하는 발현 벡터의 세포 내 존재로 인해 폴리펩티드를 과발현하는 재조합 세포로부터), 단리된 형태로 존재할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드/효소는 이의 야생형 대응물과 동일하지만, 비고유 형태 (예를 들어, 단리되거나 농축된 형태)인 서열을 갖는다는 것이 강조된다.

[0099] 용어 "신호 서열"은 성숙한 형태의 단백질의 세포의 분비를 용이하게 하는 단백질의 N-말단부에 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 세포외 단백질 성숙한 형태는 분비 과정 동안 절단되는 신호 서열이 결여되어 있다.

[0100] 용어 "벡터"는 본 명세서에서 하나 이상의 세포 유형으로 도입될 핵산 서열을 갖도록 설계된 폴리뉴클레오티드로 정의된다. 벡터는 클로닝 벡터, 발현 벡터, 셜틀(shuttle) 벡터, 플라스미드, 과자 또는 바이러스 입자, DNA 구조물, 발현 카세트 등을 포함한다. 발현 벡터와 카세트는 프로모터, 신호 서열, 암호화 서열 및 전사 종결자와 같은 조절 서열을 포함할 수 있다.

[0101] "실질적으로 동일한 배양 조건" 등과 같은 문구는 제1 숙주 세포와 제2 숙주 세포의 성능 또는 특성의 의미있는 비교가 이루어질 수 있도록 제1 숙주 세포가 배양되는 조건이 제2 숙주 세포에 사용된 조건과 동일하거나 거의 동일한 것을 의미한다. 실질적으로 동일하게 되는 파라미터에는 온도, pH, 구리 농도, 시간, 교반, 배양 배지 등이 포함된다. "실질적으로 동일한 배양 조건" 하에서 수행되는 비교용 숙주 세포 배양을 설정하는 것이 당연히 당업자의 능력 내에 있다.

[0102] 세포와 관련하여 사용되는 용어 "형질전환된", "안정적으로 형질전환된" 및 "유전자 이식(transgenic)"은 세포

가 이의 계놈에 통합되거나 여러 세대를 거쳐 유지되는 예피솜으로 운반되는 비고유 (예를 들어, 이종성) 핵산 서열을 함유함을 의미한다.

[0103] 라카제 (IUBMB 효소 명명법: EC 1.10.3.2)는 많은 식물, 진균류 및 미생물에서 발견되는 구리 함유 산화효소 효소이다. 라카제는 1-전자 산화를 수행하는 폐놀 및 유사 분자에 작용한다. 라카제는 자연적으로 발생하는 폐놀의 패밀리인 모노리그놀(monolignol)의 산화 결합을 촉진하여 리그닌 형성에 중요한 역할을 할 수 있다. 라카제는 우리시올(urishiol) 산화효소; 우루시올 산화효소; 및 p-다이페놀 산화효소로도 지칭된다.

[0104] 타이로시나제 (IUBMB 효소 명명법: EC 1.14.18.1)는 매우 다양한 박테리아, 진균류, 식물, 곤충, 갑각류 및 포유류에서 발견되는 타입 III 구리 단백질이며, 다수의 안료 분자, 예를 들어, 베타레인 및 멜라닌의 합성이 관여한다. 타이로시나제는 모노페놀 모노옥시게나제; 폐놀라제; 모노페놀 산화효소; 크레솔라제; 모노페놀라제; 타이로신-도파 산화효소; 모노페놀 모노산화효소; 모노페놀 다이하이드록시페닐알라닌:산소 산화환원 효소; N-아세틸-6-하이드록시트립토판 산화효소; 모노페놀, 다이하이드록시-L-페닐알라닌 산소 산화환원 효소; o-다이페놀: O<sub>2</sub> 산화환원 효소; 및 폐놀 산화효소로도 지칭된다.

[0105] "GH61" 또는 "GH61 효소" 또는 "AA9" 또는 "AA9 효소" 등은 최근 AA9로 재분류된 글리코시드 가수분해 효소 61 패밀리 (GH61)에 속하는 효소를 의미한다. AA9 (이전에는 GH61) 단백질은 구리-의존성 용해성 다당류 모노옥시게나제 (LPMO)이다. AA9 효소의 목록뿐만 아니라 AA9 패밀리에 대한 설명은 www.cazy.org의 탄수화물-활성 효소 데이터베이스 (CAZy)에서 찾을 수 있다 (또한 문헌 [Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Res 42:D490-D495. [PMID: 24270786]]) 참조). 소정 측면에서, AA9 효소는 트리코더마 래세이로부터 유래되고, 서열 번호: 11에 나타낸 아미노산 서열, 이와 적어도 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 이의 대립유전자 변이체 또는 LPMO 활성을 보유하는 이의 단편을 포함한다. 상이한 종으로부터의 GH61/AA9 패밀리 구성원에 대한 등록 번호 목록 (진뱅크 및 유니프로트(Uniprot))이 표 3에 제공된다.

#### 조성물 및 방법

[0106] 본 발명의 교시는 숙주 세포에서의 구리효소 분비가 하나 이상의 구리 금속샤프론을 과발현함으로써 개선될 수 있다는 발견에 기초한다. 따라서, 본 발명의 교시는 숙주 세포, 예를 들어, 사상 진균에서 가용성 구리 운반체, 막 결합 구리 운반체 또는 둘 다와 같은 하나 이상의 구리 금속샤프론을 과발현함으로써 단백질 분비를 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 교시는 또한 분비 증가를 위한 특정 구리 금속샤프론(들) 및 목적 구리효소를 함유하는 발현 숙주, 예를 들어, 사상 진균을 제공한다.

[0107] 본 발명의 교시의 하나의 측면에 따르면, 숙주 세포에서 원하는 구리효소와 함께 구리 금속샤프론을 과발현하여 숙주에서 목적 구리효소의 분비/생성을 증가시키는 방법이 제공된다. 본 발명의 교시의 구리 금속샤프론은 구리 수송과 관련된 임의의 적합한 단백질일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 구리 금속샤프론은 전장 구리 금속샤프론과 실질적으로 동일하거나 개선된 구리 수송 기능을 하는 구리 금속샤프론의 단편일 수 있다.

[0108] 다양한 실시 형태에서, 본 발명의 교시의 측면에서 사용되는 구리 금속샤프론은 임의의 세포질/가용성 또는 막 결합 구리 운반체를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 구리 금속샤프론은 표 1 및 표 2에 나타낸 구리 운반체 및, 예를 들어, 당업자에 의해 통상적으로 인정되는 기능 또는 구조 유사성에 기초한 이의 유도체 또는 상동체로부터 선택된다. 예를 들어, 본 발명의 소정 측면은 서열 번호:3과 동일하거나 실질적으로 동일한, 예를 들어, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 % 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 가용성 구리 운반체의 사용을 포함한다. 또한, 본 발명의 소정 측면은 서열 번호:6, 12, 13, 14 또는 15와 동일하거나 실질적으로 동일한, 예를 들어, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 % 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 막 결합 구리 운반체의 사용을 포함한다. 본 명세서에서 상세히 기술된 바와 같이, 개선된 구리효소 분비를 나타내는 숙주 세포는 하나 이상의 막 결합 구리 운반체, 하나 이상의 가용성 구리 운반체 또는 막 결합 구리 운반체 및 가용성 구리 운반체의 조합을 발현할 수 있다.

[0109] 일반적으로, 하나 이상의 구리 금속샤프론은 숙주 세포에서 하나 이상의 원하는 구리효소와 함께 숙주 세포에서 과발현되며, 여기서 구리 금속샤프론 및 구리효소의 발현은 이들 각자의 작동 가능하게 연결된 프로모터의 제어 하에 놓인다. 일부 실시 형태에서, 구리 금속샤프론 및/또는 구리효소는 원하는 숙주 세포에 고유한 프로모터 하에서 발현되거나, 대안적으로 구리 금속샤프론 및/또는 구리효소는 원하는 숙주 세포에 이종성인 프로모터 하

에서 발현된다. 일부 실시 형태에서, 구리 금속샤프론 및/또는 구리효소는 항시성 프로모터 하에서 발현되는 반면에, 다른 실시 형태에서, 구리 금속샤프론 및/또는 구리효소는 유도성 프로모터 하에서 발현된다. 숙주 세포에서, 프로모터의 임의의 조합이 사용되어 구리 금속샤프론 (즉, 하나 이상의 구리 금속샤프론) 및 구리효소 (즉, 하나 이상의 구리효소)를 발현할 수 있음에 유의한다. 예를 들어, 하나 이상의 구리 금속샤프론은 이종성 항시성 프로모터 하에서 발현되는 반면에, 하나 이상의 구리효소는 고유 유도성 프로모터 (또는 그 반대) 하에서 발현된다. 일부 실시 형태에서, 작동가능하게 연결된 프로모터는 변형된 고유 프로모터, 예를 들어, 프로모터의 개선된 전사 활성을 갖는 돌연변이된 고유 프로모터일 수 있다.

[0111] 소정 실시 형태에서, 하나 이상의 구리 금속샤프론의 과발현은 숙주 세포에서 하나 이상의 구리 금속샤프론의 고유 프로모터의 전사 억제 인자 또는 유도 인자의 발현을 변경하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 구리 금속샤프론의 전사 억제 인자의 발현은 숙주 세포에서 감소될 수 있거나, 반대로, 숙주 세포에서 구리 금속샤프론의 전사 유도 인자 (또는 활성 인자)의 발현은 증가될 수 있다. 하나의 예에서, 구리 금속샤프론 전사 활성 인자 Mac1 (금속-결합 활성 인자 1; 효모의 구리 결핍-유도성 전사 인자)의 발현은 숙주 세포에서 증가되어 구리 금속샤프론의 과발현을 유도할 수 있다. 전사 활성 인자 (예를 들어, Mac1)의 발현의 증가는 전사 인자에 대한 발현 카세트 또는 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하여 달성될 수 있다.

[0112] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "프로모터"는 작동가능하게 연결된 암호화 서열 (예를 들어, 유전자, cDNA, 또는 합성 암호화 서열)의 전사를 유도하는 기능을 하는 핵산 서열을 지칭한다. 프로모터는 전사의 개시 위치 근처에 필요한 핵산 서열, 예를 들면, 종합 효소 II 유형 프로모터의 경우, TATA 요소를 포함할 수 있다. 프로모터는 조절 서열로 통칭되는 다른 전사 및 번역 조절 핵산 서열과 함께 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 발현을 조절한다. 일반적으로, 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종결 서열, 번역 개시 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성 인자 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 조절 서열은 일반적으로 암호화 서열이 발현되는 숙주 세포에 적절하며, 이에 의해 인식될 것이다.

[0113] 항시성 프로모터는 대부분의 환경 및 발달 조건 하에서 활성인 프로모터이다. 유도성 또는 억제성 프로모터는 환경적 또는 발달적 조절 하에 활성인 프로모터이다. 프로모터는 당업계에 알려진 바와 같이, 탄소, 질소 또는 다른 영양소 이용 가능성, 온도, pH, 삼투압, 중금속의 존재, 억제제의 농도, 스트레스 또는 전술한 것의 조합과 같지만 이에 한정되지 않는 환경 요인의 변화에 의해 유도성 또는 억제성일 수 있다. 프로모터는 본 기술 분야에 알려진 바와 같이 특정 탄소원의 수준, 특정 에너지원의 수준, 특정 이화물의 수준 또는 이들의 조합과 같은 대사 인자에 의해 유도성 또는 억제성일 수 있다.

[0114] 적합한 비제한적인 프로모터의 예에는 cbh1, cbh2, egl1, egl2, egl3, egl4, egl5, xyn1 및 xyn2, P. 크리소게눔의 억제성 산 포스파타아제 유전자 (phoA) 프로모터 (문헌[Gsee Graessle et al., Applied and Environmental Microbiology (1997), 63(2), 753-756] 참조), 글루코스-억제성 PCK1 프로모터 (문헌[Leuker et al. Gene (1997), 192(2), 235-240] 참조), 말토스-유도성, 글루코스-억제성 MRP1 프로모터 (문헌[Munro et al. Molecular Microbiology (2001), 39(5), 1414-1426] 참조), 메티오닌-억제성 MET3 프로모터 (문헌[Liu et al. Eukaryotic Cell (2006), 5(4), 638-649] 참조)가 포함된다.

[0115] 본 발명의 교시에 유용한 유도성 프로모터의 일례는 트리코더마 레세이의 cbh1 프로모터이며, 이의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크에 등록 번호 D86235 하에 기탁된다. 다른 예시적인 프로모터는 cbh2, egl1, egl2, egl3, egl5, xyn1 및 xyn2와 같지만, 이에 한정되지 않는 셀룰라아제 효소를 암호화하는 유전자의 조절에 관여하는 프로모터이다.

[0116] 본 발명의 교시에 따르면, 구리 금속샤프론은 숙주에서 임의의 적합한 구리효소의 분비/생성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 분비가능한 구리효소는 일반적으로 숙주 세포에서 처음 발현될 때 신호 서열, 예를 들어 세포의 분비 경로를 통해 단백질 또는 폴리펩티드를 유도하는 아미노산 서열 태그와 작동가능하게 연결된다. 신호 서열은 구리효소에 대한 고유 신호 서열 (즉, 야생형 효소에서 발견되는 신호 서열) 또는 이종성 신호 서열 (즉, 목적 성숙 구리효소에 재조합 방법에 의해 작동가능하게 연결된 상이한 분비되는 단백질로부터 유래된 신호 서열)일 수 있다. 알려지거나 후에 발견된 임의의 적합한 신호 서열이 사용될 수 있으며, 예를 들어, A. 니케르글루코아밀라아제 또는 아스파르틱 프로테아제 유래의 신호 서열 또는 리조무코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래의 신호 서열 또는 트리코더마 레세이 아스파르틱 프로테아제 또는 셀룰라아제, 예를 들어, 트리코더마 레세이 셀로비오하이드롤라제 I, 셀로비오하이드롤라제 II, 엔도글루카나제 I, 엔도글루카나제 II 또는 엔도글루카나제 III이다.

[0117] 본 발명의 교시에 따르면, 구리 금속샤프론은 숙주에서 원하는 구리효소의 분비를 증가시키기 위해 임의의 숙주

에서 사용될 수 있다. 다음 실시 형태에서, 발현 숙주는 사상 진균이다. 일반적으로, "사상 진균"은 유마이코티나(Eumycotina) 아문의 사상 형태인 진핵 미생물이다. 이를 진균은 키틴, 베타-글루칸 및 기타 복합 다당류로 이루어진 세포벽을 지닌 영양 균사체(vegetative mycelium)를 특징으로 한다. 다양한 실시 형태에서, 본 발명의 교시의 사상 진균은 형태학적으로, 생리학적으로, 그리고 유전학적으로 효모와 상이하다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 교시의 사상 진균은 하기 종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 아스페르길루스, 아크레모니움, 아우레오바시디움, 브베리아, 세팔로스포리움, 세리포리옵시스, 캐토미움 패실로마이세스, 크리소스포리움, 클라비셉스, 코치오볼루스, 크립토코커스, 시아투스, 엔도티아, 엔도티아 뮤코, 푸사리움, 글리오클라디움, 후미콜라, 마그나포르테, 미셀리오프토라, 미로데시움, 뮤코, 뉴로스포라, 파네로케이트, 포도스포라, 페실로마이세스, 페니실리움, 퍼리콜라리아, 리조뮤코, 리조푸스, 스키조필룸, 스타고노스포라, 탈라로마이세스, 트리코더마, 서모마이세스, 서모아스쿠스, 티엘라비아, 톨리포클라디움, 트리코파이톤, 트라메테스 및 플레우로투스. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 교시의 사상 진균은 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다: A. 니둘란스, A. 니게르, A. 아와모리(awamori), A. 오리자에, 하이포크레아 제코리나, N. 크라사, 트리코더마 레세이 및 트리코더마 비리데.

[0118] 본 발명의 교시의 또 다른 측면은 구리 금속샤프론 및 원하는 목적 구리효소를 발현하는 발현 숙주를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 교시의 발현 숙주는 구리효소를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드 및 구리 금속샤프론을 암호화하는 제2 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 실시 형태에서, 발현 숙주는, 예를 들어, 제2 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 것과 상이한 제2 구리 금속샤프론을 암호화하는 제3 폴리뉴클레오티드를 추가로 함유한다. 또한, 숙주 세포는, 예를 들어, 제1 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 것과 상이한 목적 제2 구리효소를 암호화하는 제4 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 구리효소(들) 및 구리 금속샤프론(들)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 형질 전환에 의해 숙주 세포 내로 도입된 재조합 발현 카세트이고, 하기에서 더 상세히 기술된다.

[0119] 일부 실시 형태에서, 원하는 구리효소는 융합 폴리펩티드로서 생성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원하는 구리효소는 사상 진균에 의해 효율적으로 분비되는 폴리펩티드에 융합되어 분비를 개선하고, 이어지는 정제/동정을 촉진하거나 안정성을 개선할 수 있다.

[0120] 일반적으로, 본 발명의 교시의 발현 숙주에서 하나 이상의 구리 금속샤프론 및/또는 하나 이상의 구리효소를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 유전적으로 삽입되거나 발현 숙주의 계놈 메이크업(makeup)으로 통합되거나 (예를 들어, 발현 숙주의 염색체로 통합되거나), 염색체외적으로 (예를 들어, 백터에 의해 운반되는 선택 마커에 대한 선별 조건 하에 발현 숙주 내에서 복제 백터로서 존재) 존재할 수 있다.

[0121] 분비가능한 구리효소의 생성/분비는 예를 들어, 효소 활성 또는 존재하는 효소의 양을 검출하는 분석법에 의해 샘플(예를 들어, 배양 브로蹙)에서 직접 측정될 수 있다. 면역학적 방법, 예컨대 웨스턴 블롯(Western blot) 또는 ELISA를 사용하여 분비가능한 구리효소의 발현을 정성적 및 정량적으로 평가할 수 있다. 이러한 방법의 세부 사항이 당업자에게 알려져 있고, 이러한 방법을 수행하기 위한 많은 시약이 시판된다.

[0122]

[표 1]

가용성 (세포질) T. 래세이 구리 운반체 (서열 번호: 3)와 상동성인 단백질의 목록. 표 1은 등록 번호 (유니프로트), 유기체 및 서열 번호:3 과의 서열 동일성을 나타낸다. 단백질 서열 데이터베이스 유니프로트를 아미노산 서열의 공급원으로 사용하였다. NCBI/BLAST 웹사이트의 유니프로트 데이터베이스에 대한 표준 단백질-단백질 BLAST (blastp)를 사용하여 서열 동일성을 측정하였다.

등록 번호 (유니프로트)	유기체/균주	T. 래세이 가용성 구리 운반체 와의 % 동일성
G0RSG6	하이포크레아 제코리나 (균주 QM6a) (트리코더마 래세이)	100.00%
G9MGG2	하이포크레아 비렌스 (균주 Gv29-8 / FGSC 10586) (글리오클라디움 비렌스) (트리코더마 비렌스)	88.00%
C7Z0W4	넥트리아 하에마토코카(Nectria haematococca) (균주 77-13-4 / ATCC MYA-4622 / FGSC 9596 / MPVI) (푸사리움 솔라니(solani) 아종 페시(pisi))	88.00%
W9HYZ7	푸사리움 옥시스포룸(oxysporum) FOSC 3-a	83.00%
N4UNQ9	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 큐벤스(Fusarium oxysporum f. sp. cubense) (균주 품종(race) 1) (파나마병 진균)	83.00%
N1S578	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 큐벤스 (균주 품종(race) 4) (파나마병 진균)	83.00%
J9NC66	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 리코페르시키(lycopersici) (균주 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) (토마토의 푸사리움 수목시들음병(vascular wilt))	83.00%
G3J9Z1	코르디셉스 밀리타리스(Cordyceps militari)s (균주 CM01) (캐터필러(Caterpillar) 진균)	90.00%
E9ERN2	메타르히지움 애니소플리아애(Metarrhizium anisopliae) (균주 ARSEF 23 / ATCC MYA-3075)	84.00%
S0EGT1	자베렐라 후지쿠로이(Gibberella fujikuroi) (균주 CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) (벼 키다리병 및 그루마름병 진균) (푸사리움 후지쿠로이)	81.00%
F9G5W7	푸사리움 옥시스포룸 (균주 Fo5176) (푸사리움 수목시들음병)	81.00%
J4UKW3	브베리아 바시아나(bassiana) (균주 ARSEF 2860) (백강병 진균) (트리티라치움 시오타애(Tritirachium shiotae))	87.00%
G9NWT7	하이포크레아 아트로비리디스 (균주 ATCC 20476 / IMI 206040) (트리코더마 아트로비리데)	81.00%
F9XNY2	마이코스파에렐라 그라미 니콜라(Mycosphaerella graminicola) (균주 CBS 115943 / IPO323) (잎 얼룩무늬병(Speckled leaf blotch) 진균) (셉토리아 트리티시(Septoria tritici))	83.00%
E9E111	메타르히지움 아크리둠(Metarrhizium acridum) (균주 CQMа 102)	84.00%
K3VY44	푸사리움 슈도그라미네아룸(pseudograminearum) (균주	75.00%

[0123]

	CS3096) (밀 및 보리 관부썩음병(crown-rot) 진균)	
I1S268	자베렐라 제아에(Gibberella zaeae) (균주 PH-1 / ATCC MYA-4620 / FGSC 9075 / NRRL 31084) (밀 이삭마름병(head blight) 진균) (후사리움 그라미네아룸)	74.00%
M1W946	클라비셉스 푸르푸레아(Claviceps purpurea) (균주 20.1) (백각병 진균) (스파셀리아 세게툼(Sphaelcia segetum))	81.00%
T4ZYJ9	오피오코르디셉스 시넨시스(Ophiocordyceps sinensis) (균주 Co18 / CGMCC 3.14243) (야로사굼바 카테필라(Yarsagumba caterpillar) 진균) (히로수텔라(Hirsutella) 시넨시스)	80.00%
T0KGZ7	콜레토트리콤 글로에오스포리오이데스(gloeosporioides) (균주 Cg-14) (탄저병 진균) (글로메렐라 신글라타(Glomerella cingulata))	75.00%
L2G003	콜레토트리콤 글로에오스포리오이데스 (균주 Nara gc5) (탄저병 진균) (글로메렐라 신글라타)	75.00%
E3QL83	콜레토트리콤 그라미니콜라 (균주 M1.001 / M2 / FGSC 10212) (옥수수 탄저병 진균) (글로메렐라 그라미니콜라)	74.00%
H1UVP4	콜레토트리콤 히긴시아눔(higginsianum) (균주 IMI 349063) (십자화과 탄저병 진균)	73.00%
N4VDA2	콜레토트리콤 오르비콜라레 (균주 104-T / ATCC 96160 / CBS 514.97 / LARS 414 / MAFF 240422) (오이 탄저병 진균) (콜레토트리콤 라게나리움(lagenarium))	72.00%
G2RH83	티엘라비아 테레스트리스(균주 ATCC 38088 / NRRL 8126) (아크레모니움 얼리버멘스(Acremonium alabamense))	70.00%
G2QPF6	티엘라비아 헤테로탈리카 (균주 ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799) (미셀리오프토라 씨모필라)	71.00%
M3B392	마이코스파에렐라 피젠시스(fijiensis) (균주 CIRAD86) (흑색잎 줄무늬 썩음병(Black leaf streak disease) 진균) (슈도세르코스포라(Pseudocercospora) 피젠시스)	71.00%
J3PBB2	가에우만노마이 세스 그라미니스 바르(var.) 트리티시 (균주 R3-111a-1) (밀 및 보리 입고병 균부병 진균)	67.00%
G2XBJ6	베르티실리움 달리아에 (균주 VdLs.17 / ATCC MYA-4575 / FGSC 10137) (청고병(Verticillium wilt))	68.00%
C9SLB0	베르티실리움 알팔파에 (균주 VaMs.102 / ATCC MYA-4576 / FGSC 10136) (알팔파의 청고병) (베르티실리움 알보-아트룸(albo-atrum))	68.00%
L7JDG8	마그나포르테 오리자에 (균주 P131) (도열병 진균) (파리콜라리아 오리자에)	67.00%
L7HXX7	마그나포르테 오리자에 (균주 Y34) (도열병 진균) (파리콜라리아 오리자에)	67.00%
G4MRF2	마그나포르테 오리자에 (균주 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) (도열병 진균) (파리콜라리아 오리자에)	67.00%
F0X7H1	그로스만니아 클라비제라(Grosmannia clavigera) (균주 kw1407 / UAMH 11150) (청변병 진균) (그라피오클라디엘라(Graphiocladiella) 클라비제라)	70.00%
E5R4F7	렙토스파에리아 마쿨란스(Leptosphaeria maculans) (균주 JN3 / 단리물 v23.1.3 / 품종 Avl-4-5-6-7-8)	69.00%

	(흑반병(Blackleg) 진균) (포마 린감(Phoma lingam))	
M2NDS8	바우도이니아 콤포니아센시스(Baudoinia compniacensis) (군주 UAMH 10762) (엔젤스쉐어(Angels' share) 진균)	71.00%
R8BW20	토그니니아 미니마(Togninia minima) (군주 UCR-PA7) (에스카 병(Esca disease) 진균) (파에오아크레모니움 알레오펠룸(Phaeoacremonium aleophilum))	66.00%
U7PM18	스포로트릭스 스켄크키아(Sporothrix schenckii) (군주 ATCC 58251 / de Perez 2211183) (로스-피커스 병(Rose-picker's disease) 진균)	69.00%
M3CXY4	스파에룰리나 무시바(Sphaerulina musiva) (군주 SO2202) (포플러 줄기 궤양병(Poplar stem canker) 진균) (셉토리아(Septoria) 무시바)	64.00%
M4FJF4	마그나포르테 포아에(poae) (군주 ATCC 64411 / 73-15) (켄터키 블루그래스(Kentucky bluegrass) 진균)	65.00%
Q2GVA6	캐토미움 글로보솜(군주 ATCC 6205 / CBS 148.51 / DSM 1962 / NBRC 6347 / NRRL 1970) (토양 진균)	69.00%
W3WZP2	페스탈로티옵시스 피시(Pestalotiopsis fici) W106-1	62.00%
A7EZX1	스클레오티니아 스클레오티오룸(Sclerotinia sclerotiorum) (군주 ATCC 18683 / 1980 / Ss-1) (흰곰팡이병) (웨젤리니아 스클레오티오룸(Whetzelinia sclerotiorum))	69.00%
R0K8K2	세토스파에리아 투르키카(Setosphaeria turcica) (군주 28A) (노던 업고병 진균) (액세로힐룸 투르키쿰(Exserohilum turcicum))	68.00%
S3C0P8	오퍼오스토마 피케아에(Ophiostoma piceae) (군주 UAMH 11346) (변재변색 진균)	66.00%
G0RZ60	캐토미움 씨모필룸(thermophilum) (군주 DSM 1495 / CBS 144.50 / IMI 039719)	72.00%
W9XAR0	카프로니아 데피마이세스(Capronia epimyces) CBS 606.96	66.00%
H6BU98	엑소피알라 데로마티티디스(Exophiala dermatitidis) (군주 ATCC 34100 / CBS 525.76 / NIH/UT8656) (흑색 효모(Black yeast)) (완기엘라(Wangiella) 데로마티티디스)	68.00%
N1PEF2	마이코스파에렐라 피니(pini) (군주 NZE10 / CBS 128990) (붉은잎마름병(Red band needle blight) 진균) (도티스트로마 세토스포룸(Dothistroma septosporum))	67.00%
W9XE16	클라도피알로포라 삼모필라(Cladophialophora psammophila) CBS 110553	68.00%

[0125]

[0126]

[표 2]

막 결합 T. 래세이 구리 수송 ATPase (또는 구리 투파효소) (서열 번호:6)와의 상동성 서열. 표 2는 등록 번호 (유니프로트), 유기체 및 서열 번호:6과의 서열 동일성을 나타낸다. 단백질 서열 데이터베이스 유니프로트를 아미노산 서열의 공급원으로 사용하였다. NCBI/BLAST 웹사이트의 유니프로트 데이터베이스에 대한 표준 단백질-단백질 BLAST (blastp)를 사용하여 서열 동일성을 측정하였다.

등록 번호 (유니프로트)	유기체/균주	T. 래세이 구리 수송(exporting) ATPase 와의 % 동일성
G0RK31	하이포크레아 제코리나 (균주 QM6a) (트리코더마 래세이)	100.00%
G9N254	하이포크레아 비렌스 (균주 Gv29-8 / FGSC 10586) (글리오클라디움 비렌스) (트리코더마 비렌스)	84.00%
G9PAF2	하이포크레아 아트로비리디스 (균주 ATCC 20476 / IMI 206040) (트리코더마 아트로비리데)	75.00%
E9ECM0	메타르히지음 아코리둠 (균주 CQMa 102)	74.00%
E9EKQ2	메타르히지음 앤소플리아에 (균주 ARSEF 23 / ATCC MYA-3075)	73.00%
G3JK92	코르디셉스 밀리타리스 (균주 CM01) (캐터필러 진균)	71.00%
J4WLH8	브베리아 바시아나 (균주 ARSEF 2860) (백강병 진균) (트리티라치움 시오타에)	71.00%
X0F516	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 라디시스-리코페르시키(radicis-lycopersici) 26381	71.00%
W9L8T5	푸사리움 옥시스포룸 Fo47	71.00%
X0IUR8	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 콘글루티난스(conglutinans) 품종 2 54008	71.00%
F9F4A0	푸사리움 옥시스포룸 (균주 Fo5176) (푸사리움 수목시들음병)	71.00%
S0DI52	지베렐라 후지쿠로이 (균주 CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) (벼기다리병 및 그루마름병 진균) (푸사리움 후지쿠로이)	71.00%
X0ARP5	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 멜로니스(melonis) 26406	71.00%
W9Q9P3	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 페시 HDV247	71.00%
N4UMC8	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 큐벤스 (균주 품종 1) (파나마병 진균)	71.00%
X0CHX5	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 라파니(raphani) 54005	71.00%
W9M4Y1	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 리코페르시키 MN25	71.00%
W9HH20	푸사리움 옥시스포룸 FOSC 3-a	71.00%
X0K9C1	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 큐벤스 트로피칼(tropical) 품종 4 54006	71.00%
J9N7Q4	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 리코페르시키 (균주 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) (토마토의	71.00%

[0127]

X0N9B8	푸사리움 수목시들음병) 푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 바신페크툼(vasinfectum) 25433	71.00%
N1RJG7	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 큐멘스 (균주 품종 4) (파나마병 진균)	71.00%
W7MRF0	지베렐라 모닐리포르미스(moniliformis) (균주 M3125 / FGSC 7600) (옥수수 이삭 및 줄기마름병 진균) (푸사리움 베티실리오이데스)	70.00%
C7YWD7	넥트리아 하에마토코카 (균주 77-13-4 / ATCC MYA-4622 / FGSC 9596 / MPVI) (푸사리움 솔라니 아종 피시)	71.00%
K3W0V9	푸사리움 슈도그라미네아룸 (균주 CS3096) (밀 및 보리 관부썩음병 진균)	70.00%
M1WIK4	클라비 셀스 푸르프레아 (균주 20.1) (백각병 진균) (스파셀리아 세게툼)	70.00%
T0KKX9	콜레토트리콤 글로에오스포리오이데스 (균주 Cg-14) (탄저병 진균) (글로메렐라 신글라타)	70.00%
Q0WXV8	글로메렐라 라게나리움 (탄저병 진균) (콜레토트리콤 라게나리움)	70.00%
N4UX28	콜레토트리콤 오르비콜라레 (균주 104-T / ATCC 96160 / CBS 514.97 / LARS 414 / MAFF 240422) (오이 탄저병 진균) (콜레토트리콤 라게나리움)	70.00%
G2WT58	베르티실리움 달리아에 (균주 VdLs.17 / ATCC MYA-4575 / FGSC 10137) (청고병)	69.00%
Q8J286	콜레토트리콤 린데무티아눔(lindemuthianum) (콩 탄저병 진균) (글로메렐라 린데무티아나(lindemuthiana))	69.00%
H1UZ58	콜레토트리콤 히긴시아눔 (균주 IMI 349063) (십자화과 탄저병 진균)	70.00%
E3QAD8	콜레토트리콤 그라미니콜라 (균주 M1.001 / M2 / FGSC 10212) (옥수수 탄저병 진균) (글로메렐라 그라미니콜라)	70.00%
X0G9A8	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 라디시스-리코페로시키 26381	71.00%
W9L5N1	푸사리움 옥시스포룸 Fo47	71.00%
G4N6G7	마그나포르테 오리자에 (균주 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) (도열병 진균) (파리콜라리아 오리자에)	69.00%
X0IFU3	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 콘글루티난스 품종 2 54008	72.00%
X0ASZ2	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 멜로니스 26406	71.00%
W9QGK7	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 피시 HDV247	71.00%
X0DH57	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 라파니 54005	71.00%
W9MAB3	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 리코페로시키 MN25	71.00%
W9HH28	푸사리움 옥시스포룸 FOSC 3-a	71.00%
X0M7A2	푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 바신페크툼 25433	71.00%
L7JFD3	마그나포르테 오리자에 (균주 P131) (도열병 진균) (파리콜라리아 오리자에)	69.00%
L7I603	마그나포르테 오리자에 (균주 Y34) (도열병 진균)	69.00%

[0128]

G2REL9	(파리콜라리아 오리자에) 티엘라비아 테레스트리스(균주 ATCC 38088 / NRRL 8126) (아크레모니움 얼리버멘스)	69.00%
W3WMU8	페스탈로티옹시스 피시 W106-1	68.00%
B2AAH3	포도스포라 안세리나(anserina) (균주 S / ATCC MYA-4624 / DSM 980 / FGSC 10383) (플레우라게(Pleurage) 안세리나)	69.00%
C9SH44	베르티실리움 알팔파에 (균주 VaMs.102 / ATCC MYA-4576 / FGSC 10136) (알팔파의 청고병) (베르티실리움 알보-아트룸)	68.00%
M4G378	마그나포르테 포아에 (균주 ATCC 64411 / 73-15) (켄터키 블루그래스 진균)	68.00%
R8BNC2	토그니니아 미니마 (균주 UCR-PA7) (에스카 병 진균) (파에오아크레모니움 알레오플룸)	69.00%

[0129]

[0130]

[표 3]

원래 글리코시드 가수분해효소 61 (GH61) 패밀리로 분류되고 이제 AA9 (구리-의존성 용해성  
다당류 모노옥시게나제 (LPMO))로 분류되는 구리효소의 예.

유기체	진뱅크 등록 번호	유니프로트 번호
아가리쿠스 비스포루스 ( <i>Agaricus bisporus</i> )	AAA53434.1	Q00023
아스페르길루스 푸미가투스	CAF31975.1, AFJ54163.1	Q6MYM8,
아스페르길루스 카와치	BAB62318.1	Q96WQ9
아스페르길루스 니둘란스	EAA65609.1, EAA59072.1, EAA66740.1, CBF83171.1, EAA59545.1, EAA58450.1, EAA63617.1, EAA59125.1, EAA64722.1, ABF50850.1, EAA64499.1	C8VTW9, Q5BEI9, Q5B7G9, C8VI93, Q5AQA6, Q5AUY9, C8V0F9, Q5AZ52, C8VIS7, Q5B8T4, C8V6H2, Q5B6H0, Q5BCX8, C8VNP4, Q5BAP2
아스페르길루스 니게로	CAK38942.1, CAK45495.1, CAK41095.1, CAK97151.1, CAK46515.1, CAK97324.1, CAK42466.1	A2QJX0, A2QR94, A2QYU6, A2QZE1, A2R313, A2R5J9, A2R5N0
아스페르길루스 오리자에	BAE55582.1, BAE56764.1, BAE58643.1, BAE58735.1, BAE59290.1, BAE60320.1, BAE64395.1, BAE65561.1	Q2US83, Q2UNV1, Q2UIH2, Q2UI80, Q2UGM5, Q2UDP5, Q2U220, Q2TYW2
바이폴라리스 마이디스 ( <i>Bipolaris maydis</i> )	AAM76663.1	Q8J0H7
보트라이오티니아 푸켈리아나 ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	CCD34368.1, CCD47228.1, CCD48549.1, CCD50139.1, CCD50144.1, CCD51504.1, CCD49290.1, CCD52645.1, CCD50451.2, CCD50451.1	
캐토미움 씨모필룸	AGY80102.1, AGY80103.1, AGY80104.1, AGY80105.1, AGY80103.1, AGY80104.1, AGY80105.1	
콜레토트리콤 그라미니콜라	CAQ16278.1, CAQ16206.1, CAQ16208.1, CAQ16217.1	B5WYD8, B5WY66, B5WY68, B5WY77
코프리놉시스 시네레아 ( <i>Coprinopsis cinerea</i> )	CAG27578.1	
크립토코커스 바실리스포루스 ( <i>bacillisporus</i> )	ADV19810.1	
크립토코커스 네오포르만스 ( <i>neoformans</i> )	AFR92731.1, AFR92731.2, AAC39449.1, AAW41121.1	O59899, F5HH24
플라뮬리나 벨루티페스 ( <i>Flammulina velutipes</i> )	ADX07320.1	
푸사리움 후지쿠로이	CCT72465.1, CCT67119.1, CCT69268.1, CCT72729.1, CCT72942.1, CCT73805.1,	

[0131]

	CCT74544.1, CCT74587.1, CCT67584.1, CCT75380.1, CCT67584.1, CCT75380.1, CCT64153.1, CCT64954.1, CCT63889.1	
푸사리움 그라미네아룸 글로에오필룸 트라베움 ( <i>Gloeophyllum trabeum</i> )	ABT35335.1, XP_383871.1 AEJ35168.1	
헤테로바시디온 파르비포룸 ( <i>Heterobasidion parviporum</i> )	AF072234.1, AF072233.1, AF072232.1, AF072235.1, AF072236.1, AF072237.1, AF072238.1, AF072239.1	
후미콜라 인솔렌스	CAG27577.1	
하이포크레아 오리엔탈리스	AFD50197.1	
라시오디플로디아 테오브로마에 ( <i>Lasiodiplodia theobromae</i> )	CAJ81215.1, CAJ81216.1, CAJ81217.1, CAJ81218.1	
렙토스파에리아 마콜란스	CBX91313.1, CBX93546.1, CBX94224.1, CBX94532.1, CBX94572.1, CBX95655.1, CBX96476.1, CBX96550.1, CBX96949.1, CBX97718.1, CBX98126.1, CBY01974.1, CBY02242.1, CBX91667.1, CBX93965.1, CBX98254.1, CBY00196.1, CBY01204.1, CBY01256.1, CBY01257.1	E4ZJM8, E4ZQ11, E4ZS44, E4ZSU4, E4ZSY4, E4ZVM9, E4ZZ41, E4ZYM4, E5A089, E5A201, E5A3B3, E5AFI5, E5ACP0, E4ZK72, E4ZQA3, E5A3P1, E5A955, E5AC13, E5ADG7, E5ADG8
레우코아가리쿠스 곤길로포루스 ( <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> )	CDJ79823.1	
마그나포르테 그리세아(grisea)	EAA54572.1, XP_359989.1, EAA53409.1, XP_367775.1, EAA56945.1, XP_367375.1, EAA53298.1, XP_367664.1, EAA57051.1, XP_362437.1, EAA54517.1, XP_365800.1, EAA57285.1, XP_362794.1, EAA57097.1, XP_362483.1, EAA50788.1, XP_362102.1, EAA57439.1, XP_362640.1, EAA49718.1, XP_364864.1, EAA50298.1, XP_361583.1, EAA52941.1, XP_369395.1, EAA51422.1, EAA56258.1, XP_369714.1, EAA53354.1, XP_367720.1, XP_370106.1	G4N3E5, G4MUY8, G4MXC7, G4MXS5, G4MS66, G4MVX4, G4NAI5, G4N560, G4NHT8, G4N2Z0,
말크란체아 신나모메아 ( <i>Malbranchea cinnamomea</i> )	CCP37674.1	
멜라노카르푸스 알보마이세스 ( <i>Melanocarpus albomyces</i> )	CCP37668.1	
미셀리오프토라 페르구시이(fergusii)	CCP37667.1	

[0132]

미셀리오프토라 씨모필라	AEO61257.1, AEO56016.1, AEO54509.1, AEO55082.1, AEO55652.1, AEO55776.1, AEO56416.1, AEO56542.1, AEO56547.1, AEO56642.1, AEO56665.1, AEO58412.1, AEO58921.1, AEO59482.1, AEO59823.1, AEO59836.1, AEO59955.1, AEO60271.1, AEO61304.1, AEO61305.1, AEO56498.1, AEO58169.1	
뉴로스포라 크라사	CAD21296.1, XP_326543.1, EAA32426.1, CAD70347.1, EAA26656.1, XP_322586.1, CAE81966.1, EAA36262.1, XP_329057.1, CAF05857.1, EAA30230.1, XP_331120.1, EAA33178.1, XP_328604.1, EAA29347.1, XP_325824.1, EAA36362.1, XP_330104.1, EAA29018.1, XP_328466.1, EAA29132.1, XP_327806.1, EAA30263.1, XP_331016.1, EAA34466.1, XP_325016.1, EAA26873.1, XP_330877.1, EAA33408.1, XP_328680.1, EAA36150.1, CAB97283.2, XP_330187.1	Q1K8B6, Q8WZQ2, Q1K4Q1, Q873G1, Q7SHD9, Q7S411, Q7SA19, Q7S1V2, Q7SHI8, Q7S111, Q7S1A0, Q7S439, Q7SCJ5, Q7RWN7, Q7SAR4, Q7RV41, Q9P3R7
페니실리움 크리소케눔	CAP80988.1, CAP91809.1, CAP92380.1, CAP86439.1	B6H016, B6H3U0, B6H3A3, B6HG02
파데로케이트 크리소스포리움	AAM22493.1, BAL43430.1	Q8NJI9
파리포르모스포라 인디카 (Piriformospora indica)	CCA67659.1, CCA68244.1, CCA70035.1, CCA70418.1, CCA70703.1, CCA72182.1, CCA72183.1, CCA72192.1, CCA72220.1, CCA73144.1, CCA73151.1, CCA74246.1, CCA74814.1, CCA75037.1, CCA66803.1, CCA67656.1, CCA67657.1, CCA67658.1, CCA70417.1, CCA71764.1, CCA72221.1, CCA74449.1, CCA76320.1, CCA76671.1, CCA77877.1	
포도스포라 안세리나	CAP59702.1, CAP61395.1, CAP61476.1, CAP61650.1, CAP64619.1, CAP64732.1, CAP64865.1, CAP65111.1, CAP65855.1, CAP65866.1, CAP65971.1, CAP66744.1, CAP67176.1, CAP67190.1, CAP67201.1, CAP67466.1, CAP67481.1, CAP67493.1, CAP67740.1, CAP68173.1, CAP68309.1, CAP68352.1, CAP68375.1, CAP71532.1, CAP71839.1, CAP72740.1, CAP73072.1, CAP73254.1, CAP73311.1, CAP73320.1, CAP61048.1, CAP70156.1, CAP70248.1	B2A9F5, B2AD80, B2ADG1, B2ADY5, B2AKU6, B2AL94, B2ALM7, B2AMI8, B2APD8, B2APE9, B2API9, B2ARG6, B2AS05, B2AS19, B2AS30, B2ASU3, B2ASV8, B2ASX0, B2ATL7, B2AUV0, B2AV86, B2AVC8, B2AVF1, B2B346, B2B403, B2B4L5, B2B5J7, B2B629, B2B686, B2B695, B2AC83, B2AZV6, B2AZD4
피레노차에타(Pyrenopeziza) a) 리코페로시키	AEV53599.1	
라삼소니아	CCP37669.1	

[0133]

비소클라미도이데스 (Rasamsonia byssochlamydoides)		
레메르소니아(Remersonia) 씨모필라	CCP37675.1	
신탈리디움 인도네시아룸 (indonesiacum)	CCP37676.1	
소로다리알 마크로스포라 k-헬 (Sordaria macrospora k- hell)	CAQ58424.1	C1KU36
서모아스쿠스 아우란티아쿠스 (aurantiacus)	ABW56451.1, ACS05720.1, CCP37673.1, AGO68294.1	
서모마이세스 두폰티이(dupontii)	CCP37672.1	
서모마이세스 라누기노셔스 (lanuginosus)	CCP37678.1	
티엘라비아 테 레스트리스	CAG27576.1, AEO62422.1, AEO67662.1, AEO64605.1, AEO69044.1, AEO64177.1, AEO64593.1, AEO65532.1, AEO65580.1, AEO66274.1, AEO67396.1, AEO68023.1, AEO68157.1, AEO68577.1, AEO68763.1, AEO71031.1, AEO67395.1, AEO69043.1, ACE10231.1, ACE10232.1, ACE10232.1, ACE10233.1, ACE10233.1, AEO71030.1, ACE10234.1, ACE10235.1, ACE10235.1	
트리코더마 래세이	AAP57753.1, ABH82048.1, ACK19226.1, ACR92640.1, CAA71999.1	Q7Z9M7, O14405
트리코더마 사투르니스포룸	ADB89217.1	D3JTC4
트리코더마 종	ACH92573.1	B5TYI4
트리코더마 비리대	ACD36971.1, ADJ57703.1, ACD36973.1	B4YEW1, B4YEW3, D9IXC6
배양되지 않은 진핵생물	CCA94933.1, CCA94930.1, CCA94931.1, CCA94932.1, CCA94934.1	
볼바리엘라 볼바세아 (Volvariella volvacea)	AFP23133.1, AAT64005.1	Q6E5B4
제아 마이스(Zea mays)	ACF86151.1, ACF78974.1, ACR36748.1	B4FA31

[0134]

### 유용성

[0135]

본 명세서에서 상세히 기술된 조성물 및 방법은 구리효소의 생성에 대한 많은 이점을 제공한다. 예를 들어, 본 개시 내용은 상업적으로 관련된 상품, 예를 들어 셀룰로오스 에탄올의 제조를 위해 셀룰로오스 바이오매스 가공에 사용되는 구리효소를 포함하는 산업적 환경에서 사용되는 구리 효소의 개선된 생성을 가능하게 한다. 다른 구리효소, 예를 들어, 라카제 및 타이로시나제의 생성에서의 개선은 또한 확실한 상업적인 가치가 있다 (예를 들어, 세제, 바이오 연료 및 식품 응용에 사용).

[0136]

추가로, 본 발명의 조성물 및 방법은 구리효소 생성에서 사용되는 구리의 총량의 감소를 허용하며, 이는 발효 공정에서 폐수 내의 구리 수준을 감소시키므로 이 금속에 대한 산업적인 공장 배출에서 규제 요건을 충족시키는데 도움이 된다.

[0137]

본 발명의 조성물 및 방법의 다른 형태 및 실시 형태는 상기 설명 및 하기 실시예로부터 명백해질 것이다.

[0138]

### 실시예

[0139]

본 발명의 교시의 측면은 임의의 방식으로 본 발명의 교시를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 이는 실시 예에 비추어 더욱 이해될 수 있다.

[0140]

#### 실시예 1: 타이로시나제를 발현하는 세포에 대한 구리의 영향

[0141]

T. 레세이 타이로시나제 (서열 번호:9)를 과발현하기 위한 발현 벡터를 생성하고 (도 1c), T. 레세이 숙주 세포로 형질전환하였다. T. 레세이 타이로시나제를 암호화하는 DNA 서열의 발현을 유도하는 프로모터는 cbh1 프로모터이었다. 이러한 형질전환 숙주 세포로부터 분비되는 단백질의 발현 수준을 14-L 발효 배양액에서 측정하였다. 세포를 플라스크에서 진탕하면서 34°C 및 pH 3.5에서 글루코스가 고갈될 때까지 예비-성장시켰다. 글루코스/소포로스 공급을 시작하고, 온도를 34°C에서 28°C로 바꾸며, pH를 3.5에서 4로 바꾸었다. (글루코스/소포로스는 cbh1 프로모터의 유도 인자이다). 용해된 산소 %는 교반, 압력 및 기류를 조절함으로써 일정하게 유지되

었다. 발효를 약 200시간 동안 지속하였다 (효소 생성 속도에 따라 다름). 도 2에서, 상기 타이로시나제-발현 숙주 세포의 14-L 규모의 발효로부터의 세포외 단백질 발현을 SDS-PAGE로 분석하였다. 배양 시간이 시간 단위로 하단에 도시되어 있고, 발효 동안 구리 공급(feed)의 시작은 상향 화살표로 나타나있다. 분비되는 효소 타이로시나제와 엔도글루카나제 6에 대한 겔 상의 밴드는 왼쪽에 표시되어 있다 (각각 Tyr과 EG6). 구리-함유 타이로시나제 효소는 69 시간 내에 최고 생성을 나타내었고, 남은 시간 경과 동안 축적은 감소를 나타내었다. 대조적으로, 구리를 함유하지 않는 효소인 엔도글루카나제 6 (EG6)은 전체 시간 경과에 걸쳐 축적이 증가함을 보여주었다. 이것은 구리 함유 효소가 비-구리 함유 효소보다 시간이 경과함에 따라 덜 효과적으로 발현되었음을 입증한다.

[0143] 타이로시나제 발현을 향상시키기 위해, 타이로시나제를 과발현하는 숙주 세포를 상이한 양의 구리로 배양하였다. 도 3은 증가하는 양의 구리 (각 레인의 하단에 나타냄)의 존재 하에 타이로시나제 (Tyr)의 발현의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 이 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 성장 배지에 존재하는 황화구리의 양을 증가시키면 숙주 세포로부터의 생성 증가보다는 타이로시나제 생성이 감소되었다. 이러한 패턴은 타이로시나제를 과발현하는 숙주 세포의 두 개의 독립 균주로부터의 타이로시나제 활성의 검정으로 확인되었다 (도 4). 도 4에서, 타이로시나제 과발현 균주 A 및 균주 C (각각 상부 패널 및 하부 패널)를 0 내지 1000  $\mu$ M 범위의 상이한 구리 농도에서 배양하였고, 타이로시나제 활성을 배양 상청액에서 타이로신을 기질로 사용하고 286 nm (열린 막대) 및 470 nm (채워진 막대)에서의 생성물의 형성을 검출하여 측정하였다. 단백질 생성에 약영향을 주지 않는 구리의 최고 농도는 약 15  $\mu$ M이었다. 추가의 구리가 분비 경로로 적절하게 트래픽킹(trafficked)되지 않아서 낮은 타이로시나제 분비 및/또는 세포 독성을 유도한다는 가설이 세워졌다.

#### 실시예 2: 구리 금속샤프론의 과발현은 타이로시나제 발현을 증가시킴

[0145] T. 레세이 유래의 가용성 구리 운반체 및 막 결합 구리 수송 ATPase를 위한 합성 유전자를 알려진 서열과의 상동성으로 동정한 후, 합성하였다 (진아트(GeneArt)®, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)). 이러한 2개의 T. 레세이 구리 금속샤프론을 위한 발현 벡터를 구축하고 사용하여 그들의 과발현이 실시예 1의 숙주 세포에서 타이로시나제 발현을 개선할 수 있는지를 결정하였다. 도 1a 내지 도 1b는 (1a) 막 결합 구리 수송 ATPase을 위한 발현 구조물 및 (1b) 세포질 (가용성) 구리 운반체를 위한 발현 구조물의 개략도를 보여준다. 이러한 구리 샤프론 유전자는 항시성 피루브산 키나제 (pki) 프로모터를 사용하여 발현되었고, CBH1 유전자로부터 유래된 종결자를 포함한다.

[0146] 도 5는 감소된/검출되지 않는 타이로시나제 발현 (6mM)을 유도하는 구리 수준의 존재 하에 배양된 타이로시나제 과발현 세포로부터 유래된 타이로시나제 활성에 대한 스팟 분석의 결과를 나타낸다. 타이로시나제 활성이 이러한 분석에서 10  $\mu$ L의 배양 상청액과 200  $\mu$ L의 10% 탈지유 (35°C로 예열됨)를 미량정량판에서 조합하고, 혼합물을 35°C에서 10분 (또는 그 이상) 동안 인큐베이션하여 검출되었다. 타이로시나제가 존재하고 활성인 경우 우유가 흰색에서 적색으로 변하였다. 플러스 부호는 유의미한 적색의 웨일을 나타낸다.

[0147] 예상한 바와 같이, 대조 균주 A (레인 8의 웨일) 및 균주 C (레인 1의 웨일)에서 점선으로 도시된 타이로시나제 활성을 검출할 수 없었다. 그러나, 균주 A 및 균주 C의 타이로시나제를 생성하는 능력은 이들 균주가 막 결합 구리 수송 ATPase (레인 2 내지 7의 웨일) 또는 세포질 (가용성) 구리 운반체 플라스미드 (레인 9 내지 12의 웨일)로 재형질전환되는 경우 회복되었다. 따라서, 이러한 구리 샤프론 중 어느 하나의 발현은 타이로시나제 구리효소의 유의미한 발현 증가로 이어졌다.

#### 실시예 3: 구리 금속샤프론의 과발현은 라카제 발현을 증가시킴

[0149] 도 6은 (CBH1 신호 서열 및 cbh1 전사 종결자를 포함하는 cbh1 프로모터로부터 전사된) 세레나 유니컬러 유래의 구리 금속단백질 라카제 D를 위한 발현 벡터 구조물을 나타낸다. 성숙 라카제 D 서열은 서열 번호: 10이다.

[0150] 도 7a 내지 도 7c는 상기 기재된 구리 금속샤프론 중 하나 또는 둘 모두의 과발현 유무에 관계없이 라카제 D를 과발현하는 균주 D (균주 32A)에서의 라카제 D 생성의 분석을 도시한다 (도 1에 도시된 벡터로부터 발현된 서열 번호: 3 및 6). 도 7a는 균주 32A (최좌측 막대; 100%로 설정됨) 및 이로부터 유래된, (도 1a 및 도 1b에 도시된 발현 벡터로 형질전환된) 세포질 운반체 및 막 결합 구리 수송 ATPase를 모두 과발현하는 균주 (#46, #47 및 #48)에서의 라카제 D의 상대적인 발현 수준을 나타낸다. 도 7b는 균주 32A (최좌측 막대; 100%로 설정됨) 및 이로부터 유래된, (도 1a에 도시된 발현 벡터로 형질전환된) 막 결합 구리 수송 ATPase만을 과발현하는 균주 (#2, #16, #29, #30 및 #31)에서의 라카제 D의 상대적인 발현 수준을 나타낸다. 도 7c는 균주 32A (최좌측 막대; 100%로 설정됨) 및 이로부터 유래된, (도 1b에 도시된 발현 벡터로 형질전환된) 세포질 구리 운반체만을 과

발현하는 균주 (#5, #22, #27 및 #35)에서의 라카제 D의 상대적인 발현 수준을 나타낸다. 형질전환체를 미량정량판에서 5일 동안 배양하고, ABTS 분석 (ABTS = 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린)-6-설폰산))을 사용하여 라카제 발현을 측정하였다. ABTS 분석을 위해, 10  $\mu\text{L}$ 의 5-일간의 액체 배양액을 새로운 플레이트로 옮기고, 150  $\mu\text{L}$  100 mM NaOAc, pH 5 및 20  $\mu\text{L}$  4.5 mM ABTS를 첨가하였다. OD<sub>420</sub>을 5분 동안 20-초 간격으로 스펙트로 맥스(Spectra Max) 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 이 데이터는 막-결합 구리 수송 ATPase의 발현이 단독으로 또는 세포질 (가용성) 구리 운반체와 조합하여 라카제 D 생성을 유의미하게 개선함을 보여준다.

[0151] 전술한 조성물 및 방법이 이해의 명료성을 위해 예시 및 예로서 일부 상세히 기술되었지만, 첨부된 청구범위의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 특정 변경 및 수정이 이루어질 수 있음을 본 명세서의 교시에 비추어 당업자는 용이하게 이해할 것이다.

[0152] 따라서, 선행 기술은 단지 본 발명의 조성물 및 방법의 원리를 설명한다. 당업자는 본 명세서에 명시적으로 기재되거나 도시되지는 않았지만, 본 조성물 및 방법의 원리를 구현하고 그 사상 및 범위 내에 포함되는 다양한 배열이 고안될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 본 명세서에 인용된 모든 예 및 조건부 언어(conditional language)는 주로 본 발명의 조성물 및 방법의 원리 및 본 발명을 진보시키는 데에 발명자가 기여한 개념을 이해하는 것을 돋는 것을 목적으로하며, 특이적으로 열거된 예와 조건으로 제한되지 않는 것으로 해석되어야 한다. 또한, 본 조성물 및 방법의 원리, 측면 및 실시 형태뿐만 아니라 이의 특정 예를 기재한 본 명세서의 모든 서술은 이의 구조적 및 기능적 등가물을 포함하도록 의도된다. 또한, 그러한 등가물은 현재 알려진 등가물 및 미래에 개발되는 등가물, 즉 구조와 관계없이 동일한 기능을 수행하도록 개발된 임의의 요소를 모두 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법의 범주는 본 명세서에서 도시되고 설명된 예시적인 실시예에 한정되는 것으로 의도되지 않는다.

[0153]

## 서열 목록

서열 번호	설명	서열
1	T. 래세이 세포질 (가용성) 구리 운반체의 유전자 서열	ATGTCTGAGACGCACACCTACGAGTTAACGTCACCAT GACCTGCGCGGCTGCTCCGGCGCCATCGACCGAGTCC TCAAGAAGCTCGAGGGTACGTTCTGAACAATCATTCTC CCCTCTCCTCTCCTCTCCCTCTCTCTCTCCCTCTC CTCCTCCGTATGCCGTAGGAGCACTGTCGCGCCCCTC CCCCTCAAAGAAAAACACAGCACTGACTCGGTTGGTT TTCTTTCTTCTCGCAGGCCTGAAAGCTACGAAGTCTC CCTCGACAACCAGACCGCAAAGGTCGTACCGCGCTGC CCTACGAGACGGTCTGACCAAGATTGCCAAGACGGGC AAGAAGATCAACTCGGCGACGGCCGACGGCGTGCCGCA GTCTGTCGAGGTATCTGTGAG
2	T. 래세이 세포질 (가용성) 구리 운반체 (종결 코돈을 포함하는)의 암호화 서열	ATGTCTGAGACGCACACCTACGAGTTAACGTCACCAT GACCTGCGCGGCTGCTCCGGCGCCATCGACCGAGTCC TCAAGAAGCTCGAGGGGGCGTCGAAAGCTACGAAGTCT CCCTCGACAACCAGACCGCAAAGGTCGTACCGCGCTG CCCTACGAGACGGTCTGACCAAGATTGCCAAGACGGG CAAGAAGATCAACTCGGCGACGGCCGACGGCGTGCCGC AGTCTGTCGAGGTATCTGTGAG
3	T. 래세이 세포질 (가용성) 구리 운반체의 아미노산 서열	MSETHTYEFNVTMTCGGCSGAIDRVLKKLEGVESYEVSL DNQTAKVVTALPYETVLTIAKTKINSATADGVPQSVE VSV
4	T. 래세이 막 결합 구리 수송 ATPase 의 유전자 서열	ATGGCCCCAACATACATCAAAGTCCCCGGCGGGACAA TGATGAGCATGCGAGTGCACCCCTACGCCAAAGAGCG CGCACATGGCCACAACCAACTCTGCGCGTTGGTGGCATG ACGTAGGTTCGTCCGTTCCGGCTGTGCTTCCGCCAA GGTCTGCAGCACAAGCATGGCTGGTCATTCTTCTAAC CTTCTTCTTGCAGATGTGGTCGTGCACAGCAGCCGTG AGGGCGGCTTCAAGGGCGTCAAGGGCGTTGGTACCGTC TCCGTCAGCCTGTTATGGAGAGGGCTGTCGTAATGCAC GACCCCCGGATCATCAGCGCTGAACAGGTTGAGAGAT TATCGAAGATTGGGATTCGACGCTGAGCTGTCGAC GGACCTCTTGAGCCCACTCGTCCTCGATTCTCGGATGC CAAGGGGGATGAGGACATCGATAGCGGCCTTGTGACGA

[0154]

	CCACGGTAGCCATCGAAGGCATGACGTGTGGCGCCTGT ACATCTGCTGTCGAGGGTGGATTCAAGGATATCCCAGG TGTCAAGAGCTTCAGCATCTCGCTTCTTGAGCGAGC CGTCATCGAACACGATCCAGAACCTTGCCCACCGACA AGATTACCGAAATCATCGAAGACCGGGGCTTGGTGC GAAATCGTCGATTCCGTGAAGGCGAACCTGGCAGCAG TACCGAGGCTGAGAACCCAGCAAGTCATGTCGTGACTA CGACGGTAGCCATCGAAGGAATGACTTGCCTGCGCTGT ACGTCTGCTGTTGAGGGAGGCTTCAGGGAGTTGACGG CATCCTGAAATTCAACATCAGTCTTCTGGCCGAAAGGGC AGTCATTACTCACGATGTCACCAAGATCTCCGCCAACA GATTTCCGAAATCGTTGAAGACCGGGGATTGGTGC GGTTTGTCACCCTCCGGAGGCAAACGATCTCAGCA GTACGACCTCGCAGTTAAAATCTATGGCAGCCCGAC GCCGCCACTGCAAAGGAGCTGGAGGAAAGCTGCTGGC ACTTGCTGGTGTAAATCTGCTCCCTCAGCCTATCAAC GGACCGCCTGTCGTACGCACCAGCCTGCCGTATTGG GCTCCGAGGGATCGTCGAGGCCTAGAGGCAGAAGGCC TGAATGCTTGGTGGCGGACAGCCACGACAACAACGCG CAACTCGAATCCTGGCCAAGACTCGCGAGATCCAGGA ATGGAGGACGGCGTCAAGACGTCCGCCCTCGTC TTCCGGTATTGTCCTTCCATGGTGTGCCTATGATCTC AGACAGTCTGAACCTGAGTCTAATCCACCTGGCCATGG TCTCTACCTCGGCGACGTCGTCAACTTGGTACTCACAA ACCTGTTCAAGTCGCTCAAGCACCAGCCTGCCGACTATGG GGCCTCAAGTCGCTCAAGCACCAGCCTGCCGACTATGG TGTGCTCGTCATGTCGGCACCTCCTCGCCTACTTCTT CAGCATCTTCCATGGTCATCTCTATCCTCTTCGAGCC TCATTCCCCGCCGGCACGATTTGACACCAAGCACC GTCATCACCTTGACCTTGGCCGCTATCTTGAGAA CAGCGCCAAGGGTCAGACATCAAAGGCTCTGTCCC TCATGTCCTAGCCCCGTGATGGCCACCATCTACACGG ATCCCATTGCCGCGGAGAAGGCAGCAGAATCATGGGCC AAGTCAACCGATAACCCCGCGGATGCAGAAAGGCCAACC GTCTGGAGATGCGAGCGGCTCGTCGTACGAGGAGAAGA
--	---

[0155]

	GCATCCCTACTGAGCTGCTTCAGGTGGGAGATATCGTCG TCATCCGACCCGGTGATAAGATTCCGGCGACGGCGTC GTTATGCGAGGAGAGACCTACGTCGACGAGAGCATGGT CACCGGAGAGGAATGCCGGTGCAGAAGAGGATGGCA GCAACGTGATTGGAGGCACGGTCAACGGCAACGGCAGA GTGGACTTCGCGTCACCGAGCCGGCGGGATACCCA GCTCAGTCAGATTGTCAAGCTTGTTCAGGACGCGCAGA CGACGAGGGCGCCTATTCAAAGGTGGCCGACACTTG GCTGGCTACTTGTGCCTACAATCTTGTGCTCGGCATC CTCACCTCCTGGCTGGTTGATCCTCAGCCACGCCCTG TCGCACCCCCCTATGATTTCTTGAAGAACACCAGTGGT GGCAAGGTCACTGATTGCGTCAAGCTGTGCATCTCGTC ATTGTATTGCACTGCCCTGTGCTCTGGGCTGGCAGC CCGACAGCTGTCATGGTAGGCACGGCGTGGCGCTGA GAATGGCATCCTCATCAAAGCGGAGCTGCGCTGGAGC GAACCACCCAGGTTACCAAAGTCGTCTGGACAAAACC GGCACAATCACTCGTGGCAAATGGAGGTGCGCAAGAG CGGCCTTGTGTTCCCTGGAATGACAACGTGTCGAGAC CAAAGTCTGGTGGGCCGCTGCGGTCTGGCGGAATGG GCAGCGAGCACCCATCGGAAGGGCGATTCTGGCAGCG GCCAAGGCAGAAGTCGGCATCCTGAAAGCCGAAGCCGC CATTCCAGGAAGCGTCAATGATTTCAAGTTGACTGTTGG CAAGGGCATCGATGCTATCGTTGAACCTGCATTATCCGG TGATCGGACACGCTATAGGGCCTGCTGGAAATGTCAC CTTCCTGAAAGAGAACGGCGTCGAGGTCCCCAAGGATG CCGTCGAGGCAGCAGAGCGAATCAACTCGTCCGTCAAG AGCTCACGAGCCAAGGCTGTGACTGCGGGCACGACCAA CATCTTGTGCCATTGATGGAAAGTACAGCGGCCACCT TTGTCTCTCCGACACCATCAAAGATGGGGCGGCCGGGG TCATTTCTGTACTGCATAGCATGGGCACTAAGACGGCCA TGGTGACGGGAGACCAGCGACCCACCGCCCTGGCGTT GCCGCCCTCGTGGCATCTCTCCGAGGACGTGTTGCC GGCGTCAGCCCCGACCAGAAGCAGGTGATACTACAGCA GTTCCAGAACCAAGGGAGAGGTGGTCGCCATGGGGAG ACGGCATCAACGACTCGCCGGCCCTCGCTACGGCCGAC
--	---

[0156]

		GTTGGTATGCCATGTCGAGCGAACGGACGTGGCCAT GGAGGCCGCAGATGTTGCTTATCGCTCCGACGACCT GCTGAGCATCCCCTGCCATCCACCTCACTCGGACCAT CTTCCGCCGCATCAAGCTGAACCTGGCGTGGCATGCAT CTACAACATTGTCGGCCTGCCATTGCCATGGGTTTCTT CCTGCCGTTGGCATCCACATGCACCCATGTTGCCGG GTTGCCATGGCCTGCAGTAGCATTAGTGTAGTGGTTAG CAGCCTGGCGCTCGATGGGGCAACGGGGGGTGGCCTGCCTGG TGGACGAGGCGTCCGAACCGGGGGTGGCCTGCCTGG ATGAGCGGCACGGGCATCGTGGCTGGCTAAGGAGAC GTTTGGACGCGTCAGGAGAGGGAAAGCGTGAGGAGGGTT ACGTGGCGTTGGAGAATTAGAGGTCTGA
5	T. 래세이 막 결합 구리 수송 ATPase 의 암호화 서열	ATGGCCCCAACATACATCAAAGTCCCCGGGCGGGACAA TGATGAGCATGCGAGTGCAGCCCTTACGCCAAAGAGCG CGCACATGGCCACAACCAACTCTGCGCTTGGTGGCATG ACATGTGGTTCGTGCACAGCAGCCGTGAGGGCGGCTT CAAGGGCGTCAAGGGCGTTGGTACCGTCTCCGTACGCC TTGTTATGGAGAGGGCTGTCATAATGCACGACCCCCGG ATCATCAGCGCTGAACAGGTTGAGAGAGATTATCGAAGA TTGTGGATTGACGCTGAGCTGCTGTCACGGACCTCTT GAGCCCACTCGTCCCTCGATTCTCGGATGCCAAGGGGG ATGAGGACATCGATAGCGGCCTTGTACGACCACGGTA GCCATCGAAGGCATGACGTGTCGGCGCTGTACATCTGCT GTCGAGGGTGGATCAAGGATATCCAGGTGTCAAGAG CTTCAGCATCTCGCTTCTTGAGCGAGCCGTACATCGA ACACGATCCAGAACCTTGCCCACCGACAAGATTACCG AAATCATCGAAGAACCGGGGCTTGGTGCCTGAAATCGTC GATTCCGTGAAGGGCGAACCTGGCAGCAGTACCGAGGC TGAGAACCCAGCAAGTCATGTCGTGACTACGACGGTAG CCATCGAAGGAATGACTTGCGGTGCCTGTACGTCTGCTG TTGAGGGAGGCTTCAGGGAGTTGACGGCATCCTGAAA TTCAACATCAGTCTTCTGGCCGAAAGGGCAGTCATTACT CACGATGTCACCAAGATCTCCGCCAACAGATTCGCA AATCGTTGAAGAACCGGGGATTGGTGCACGGTTTGTC CACCGTCCCGGAGGCAAACGATCTCAGCAGTACGACCT

[0157]

	<pre> CGCAGTTCAAAATCTATGGCAGCCGGACGCCACT GCAAAGGAGCTGGAGGAAAAGCTGCTGGCACTGCTGG TGTAAATCTGCTTCCCTCAGCTATCAACGGACCGCCT GTCCGTACGCACCAGCCTGCCGTATTGGCTCCGAGG GATCGTCGAGGCAGGTAGAGGCAGAAGGCCTGAATGCTT TGGTGGCGGACAGCCACGACAACAACCGCGAACACTCGAA TCCTTG GCCAAGACTCGCAGATCCAGGAATGGAGGAC GGCGTGCAGACGTCCGCCTCGTCGCCATTCCGGTATT CGTTCTTCCATGGTGTGCTATGATCTCAGACAGTCT GAACCTGAGTCTAACCTCACCTGGCATGGTCTCTACCT CGCGACGTCGTCAACTGGTACTCACAACACCTGTTCA GTTTGGGGTTGGAAAGCGCTTTACGTCTCGGCCTCAA GTCGCTCAAGCACCGTCGCGACTATGGATGTGCTCGT CATGCTCGGCACCTCCTCGCCTACTTCTTCAGCATTCT CTCCATGGTCATCTATCCTCTTCAGCCTCATCCCC GCCGGGACGATCTTGACACCAGCACCAGTCTCATCAC CTTGACCTGGCCGCTATCTTGAGAACAGCGCCAA GGGTCAGACATCAAAGGCTCTGTCGGTCTCATGCTCT AGCCCCGTCGATGCCACCATCTACACGGATCCCATTGC CGCGGAGAAGGCAGCAGAACATCGGCAAGTCACCG ATACACCCGCGGATGCGAAAGGCCAACCGTCTGGAGAT GCGAGCGGCTCGTCGTACGAGGAGAACAGCATCCCTAC TGAGCTGCTTCAGGTGGGAGATATCGTCGTATCCGACC CGGTGATAAGATTCCGGCGGACGGCGTCTGTTATGCGAG GAGAGACCTACGTCGACGAGAGCATGGTCACCGGAGAG GCAATGCCGGTGCAGAACAGAGGATTGGCAGCACGTGAT TGGAGGCACGGTCAACGGCAACGGCAGAGTGGACTTTC GCGTCACCCGAGCGGGCGGGATACCCAGCTCAGTCAG ATTGTCAAGCTTGTTCAGGACGCGCAGACGACGAGGGC GCCTATTCAAAGGTGGCGACACTTGGCTGGCTACTT TGTGCCTACAATCTGCTGCTCGGCATCCTCACCTCCT TGGCTGGTTGATCCTCAGCCACGCCCTGTCGACCCCCC TATGATTTCCTGAAGAACACCAGTGGTGGCAAGGTCA GATTGCGTCAAGCTGTGCATCTCCGTATTGTATTGC ATGCCCTGTGCTCTGGCCTGGCCACGCCGACAGCTGT </pre>
--	--

[0158]

		CATGGTAGGCACGGCGTGGCGCTGAGAATGGCATCC TCATCAAAGGCGGAGCTGCCTGGAGCGAACCAACCCAG GTTACCAAAGTCGTCTTGACAAAACCGGCACAATCAC TCGTGGAAAATGGAGGTGCCAAGAGCGGCCTGTGT TTCCCTGGAATGACAACGTGTCGCAGACCAAAGTCTGG TGGGCGCTGTCGTCTGGCGGAAATGGCAGCGAGCA CCCTATCGAAGGGCGATTCTGGCAGCGGCCAAGGCAG AAGTCGGCATCCTGAAGCGAAGCGCCATTCCAGGA AGCGTCAATGATTCAAGTTGACTGTTGGCAAGGGCATC GATGCTATCGTTGAACTGCATTATCCGGTATCGGACA CGCTATAAGGTCTTGCTGAAATGTCACCTCCTTGAA GAGAACGGCGTCGAGGTCCCCAAGGATGCCGTGAGGC AGCAGAGCGAATCAACTCGTCCGTCAAGAGCTCACGAG CCAAGGCTGTGACTGCGGGCACGACCAACATCTTGTC GCCATTGATGAAAGTACAGCGGCCACCTTGTCTCTCC GACACCATAAAGATGGGGCGGCCGGGTCAATTCTGT ACTGCATAGCATGGGCATCAAGACGGCCATGGTACGG GAGACCAGCGACCCACCGCCCTGGCCGTGCCGCCCTC GTGGCATCTCTCCGAGGACGTGTTGCCGGCGTCAGC CCCGACCAGAAGCAGGTGATAGTACAGCAGTTCCAGAA CCAGGGAGAGGTGGTCGCCATGGTGGAGACGGCATCA ACGACTCGCCGGCCCTCGCTACGGCCACGTTGGTATCG CCATGTCGAGCGAACGGACGTGGCCATGGAGGCCGCA GATGTTGTGCTTATGCGTCCGACGACCTGCTGAGCATC CCGTCGCCATCCACCTCACTCGGACCATCTCCGCCGC ATCAAGCTGAACCTGGCGTGGCATGGTTCTGCCGTT TGTCGGCTGCCATTGCCATGGTTCTGCCGTT TGGCATCCACATGCACCCATGTTGCCGGGTTGCCAT GGCCTGCAGTAGCATTAGTGTAGTGGTAGCAGCCTGG CGCTCCGATGGTGGCAACGACCGCAGTGGATGGACGAG GCGTCCGAACCGGCGGGTGGCCTGCCTGGATGAGCGG CACGGGCATGTTGGCTGGCTAAGGAGACGTTGGAC GCGTCAGGAGAGGGAAGCGTGAGGAGGGTTACGTGGCG TTGGAGAATTTAGAGGTCTGA
6	T. 래세이 막 결합 구리 수송	MAPTYIKVPGNDNEHASATLTPKSAHMATTLRVGGMT

[0159]

	ATPase 의 아미노산 서열	CGSCTAAVEGGFKGVKGVGTVSLSLVMERAVVMHDPRII SAEQVREIIEDCGFDAELLSTDLLSPVPRFSDAKGEDID SGLLTTVAIEGMTGACTSAVEEGGFKDIPGVKSFSISLLS ERAVIEHDPELLPTDKITEIIIEDRGFGAEIVDSVKAQPGSST EAENPASHVVTTVAIEGMTGACTSAVEEGGFQGVGDGILK FNISLLAERAVIDVTKISAEQISEIVEDRGFGATVLSTVP EANDLSSTSQFKIYGSPDAATAKELEKLLALAGVKSAS LSLSTDRLSVTHQPAVIGLRGIVEAVEAQGLNALVADSHD NNAQLESLAKTREIQEWRACKTSASFAIPVFVLSMVLPM ISDSLNLSLIHLGHGLYLGDVNVNLVTPVQFGVGKRFYV SAFKSLKHRSPMDVLVMLGTSCAYFFSIFSMVISILFEPH SPPGTIFDTSTMLITFVTLGRYLENSAKGQTSKALSRLMSL APSMATIYTDPIAAEKAAESWAKSTDTPADAKGQPSGDAS GSSYEKSIPTELLQVGDIVIRPGDKIPADGVVMRGETYV DESMVTGEAMPVQKRIGSNVIGGTVNNGNDRVFRVTRAG RDTQLSQIVKLVQDAQTTRAPIQKVADTLAGYFVPTILL GILTFLGWLILSHALSHPPMIFLKNTSGGKVMICVKLCISVI VFACPCALGLATPTAVMVGTVGAENGILIKGGAALERTT QVTKVVLDTGTITRGKMEVAKSGLVFPWNNDNSQTKV WWAAVGLAEMGSEHPIGRAILAAAACEVGILEAAIAPGS VNDFKLTGKGIDAIVEPALSGDRTRYRVLAGNVTFLEEN GVEVPKDAVEAAERINSSVKSSRAKAVTAGTTNIFVAIDG KYSGHCLSDTIKDGAAGVISVLHSMGIKTAMVTGDQRPT ALAVAALVGISPEDVFAGVSPDQKVIVQQFQNQGEVVA MVGDGINDSPALATADVGIAMSSGTDVAMEAADVVLMR PDDLLSIPSIAHLTRIFRRIKLNLAWACIYNIVGLPIAMGF FLPFGIHMHPMFAGFAMACSSISVVSSLALRWQRPQW MDEASEPAGGLRWMSGTGIVGWAKETFGRVRRGKREEG YVALENLEV
7	T. 레세이 타이로시나제의 유전자 서열	ATGCTTTGTCAGCGTCCCTCTGGCGTTGGCCTTGGCC ACAGTTCACTCGCACAGGGCACGACACACATCCCCGT CACCGGTGTTCCCGTCTCTCTGGTGTGCCGTGCCGT GAGACAGAACATCAATGACCTGCCAAGTCCGGCCGC AATGGTGAGTGACGCCCTCCTCCACCACACTTACCTC AGTCAAGAGACAAGAGGGAGACAAGTACAAAGCGGAT

[0160]

	GAAAAGAGGTGGACAAGAGAGAGAGAGAGAAAGTG TGTGTGTATGTGAGAGCGAGAGAGAGAGAGAGAC AAGAGCTATTGGATGGACCAGGAGGCCAGCATGGAGAAC AGGGGGAGACTTGACGATTGAGGAGAGGGGGCTCAC ATGTGCCTGCGAATAGGGATCTCTACGTTCAGGCCATGT ACAACATGTCCAAGATGGACTCCCACGACCCGTACAGC TTCTTCAGATTGCCGGTAATATACATCTCGGCCCTCCT GCGAGGGCGACGTGACTCTGGAGCTTAGTAACACCA GCTAGGCATCCACGGCGCACCGTACATTGAGTACAACA AGGCCGGAGCAAAGTCGGCGATGGCTGGCTGGCTAC TGCCCTCACGGTGTATGTGTTTGTCCATCGAGGAGGG CGCAAGAGTTCATGGACTTGAACCTTCGCCCTGTTG TGAGCCGGAAATCATCGTCTTGACAGTTTATTAGGAG GACCTCTTCATCAGCTGGCACCGCCCCATGTCTGCTC TTTGAGGTATGATTGACCACGCTGGACTTGACCTCAT ACAAACATCAACTGACATCGTTGCAGCAAGCCTGGTCT CCGTCGCCAAGGGCATGCCAACCTCGTATCCCCGTCTG TCCGCCTCAAGTACCAAGGCTGCCGCCAGCCTGCGC GCCCTACTGGACTGGCCGCCAGACAGCTCCGTGCC CGCCGTACCGTCCCCAGACGCTCAAGATCAACGTCCC CAGCGGCAGCAGCACCAAGACCGTCGACTACACCAACC CGCTCAAGACGTACTACTTCCCGCATGTCCTGACCG GCTCGTACGGCGAGTTACCCGGCGGAGGCAACGACCAC ACCGTCCGCTGCCGCCCTCCAAGCAGAGCTATCCGCC ACCGCCAACCTCAACCTGGCTGCCCTTACAAGTCC TGGATCGTACGTAGTCCCCCTTCCCTTGAAGCTTCC CCTTGAGTAAAGCTCGTCACTGACACAGAGAGCGGCC GCAGTACGATGTCTGACCAACTCTAAAACCTTGCCGA CTTCGCCCTCACCGGCCGCCGACATCAACGTTGAGCA GATCCACAACGCCATCCACTGGGACGGTGCCTGCC CCCAGTTCTGCCCGACTACTCCGGCTCGACCCCC TGTTGTAAGTCAATCGAGACGTCAAGAGTCATTTGTCA ACAACCGATGGCAAACGCAGTCTGTACTGACGCTGCAA AATAGCTTCATGCACCAAGGCCAGGTGACCGCATGTG GGCCTCTGGAGGCCATCATGCCCTCGTCGCCCTCTT
--	--

[0161]

		CACGGCCTCGTACAAGGCCAGTCGCCTCAACTCCA AGTCGGCAGCACCATACCCCCGACTCGCCCTGCAG CCCTTCTACCAGGCCAACGGCAAGTCCACACGTCCAAC ACGGTCAAGAGCATCCAGGGCATGGCTACTCGTACCA GGGCATCGAGTACTGGAAAAGTCCAGGCCAGATCA AGTCGAGCGTACCCACCATCATCAACCAGCTGTACGGG CCCAACTCGGGCAAGAAGCGAACGCCCGCGACTT CTTGAGCGACATTGTCACCGACGTCGAGAACCTCATCA AGACCCGTTACTTGCAAGATCTCGGTCAACGTGACCG AGGTGACGGTCCGCCCGCCGAGATCAACGTCTACGTC GGCGGCCAGAAGGCCGGCAGCTTGTATCGTGAAGCT CCCCGCCGAGGGCACGGTCAACGGCGGCTTCACCATTG ACAACCCCAGTCAAAGCATCCTGCACGGTGGTCTCCGC AACGCCGTCCAGGCCTTACCGAGGACATTGAGGTTGA GATTCTCTGTAAAGTTTCCCCCTCTCTCCACTCCGA CCACTCACTGTCACTATTCGACTAGTCACCGTCAAGAT GTGTATTGTTGCTGACCCCCAAGCGCAGAAGGACGG ACAAGCCATCCCCCTGAGACGGTCCCCAGCCTGTCCAT CGACCTCGAGGTGCCAACGTACCCCTGCCCTCCGCC CGACCAGCTGCCAAGTACGGCCAGCGCTCCAGGCACC GCGCCAAGGCCGCCAGCGCGAACCCGTTGCCGTT CCCCATATCCCTCTGTAA
8	T. 래세이 타이로시나제의 암호화 서열	ATGCTTTCACTCGCACAGGGCACGACACACATCCCCGT CACCGGTGTTCCCGTCTCTCTGGTGTGCCGTGCCGCT GAGACAGAACATCAATGACCTGGCAAGTCCGGGCC AATGGGATCTACGTTCAGGCCATGTACAACATGTCCA AGATGGACTCCCATGACCCGTACAGCTTCTCAGATTG CCGGCATCCACGGCGACCGTACATTGAGTACAACAAG GCCGGAGCAAAGTCGGCGATGGCTGGCTGGCTACTG CCCTCACGGTGAGGACCTCTCATCAGCTGGCACCGCCC CTATGTCCTGCTTTGAGCAAGCCTGGTCTCCGTGCG CAAGGGCATGCCAACCTGTATCCCCGTCTGTCCGCGC CAAGTACCAAGGCTGCCGCCAGCCTGCGGCC ACTGGGACTGGGCCGCCAGAGCTCCGTGCCGCCGTC

[0162]

		ACCGTCCCCAGACGCTAAGATCAACGTCCCCAGCGG CAGCAGCACCAAGACCGTCGACTACACCAACCCGCTCA AGACGTACTACTTCCCGCGCATGTCCTGACCGGGCTCGT ACGGCGAGTTCACCGGCGGAGGCAACGACCACACCGTC CGCTGCCGCCCTCCAAGCAGAGCTATCCC GCCACCGC CAACTCCAACCTGGCTGCCCGCTTACAAGTCCGGAT CTACGATGTCCGTACCAACTCTCAAAACTTGCCGACTT CGCCTCACCAGCGGCCCCGGCATCAACGTTGAGCAGA TCCACAACGCCATCCACTGGGACGGTGCCTGCGGCTCCC AGTTCCCTGCCCGACTACTCCGGCTCGACCCCTGT TCTTCATGCACCACGCCAGGGTCGACCGCATGTGGGCCT TCTGGGAGGCCATCATGCCCTCGTCGCCCTTCAACGG CCTCGTACAAGGGCAGTCGCGCTTCAACTCCAAGTCG GGCAGCACCATCACCCCGACTCGCCCTGCAGCCCTC TACCAAGCCAACGGCAAGTCCACACGTCAAACACGGT CAAGAGCATCCAGGGCATGGCTACTCGTACCAGGGCA TCGAGTACTGGAAAAGTCCAGGGCAGATCAAGTCG AGCGTACCAACCATCATCAACCAAGCTGTACGGGCCAA CTCGGGCAAGAACGCAACGCCCGCGACTTCTGA GCGACATTGTCAACGACGTGAGAACCTCATCAAGACC CGTTACTTGCAAGATCTCGGTCAACGTGACCGAGGTG ACGGTCCGCCCGCCGAGATCAACGTCTACGTGGCGG CCAGAAGGCCGGCAGCTGATCGTCAAGCTCCCG CCGAGGGCACGGTCAACGGCGCTTACCATGACAAC CCCATGCAAAGCATCCTGCACGGTGGTCTCCGCAACGC CGTCCAGGCCCTTACCGAGGACATTGAGGTTGAGATTCT CTCTAAGGACGGACAAGCCATCCCCCTCGAGACGGTCC CCAGCCTGTCATCGACCTCGAGGTCGCCAACGTCAACCC TGCCCTCCGCCCTCGACCAGCTGCCAAGTACGGCCAGC GCTCCAGGCACCGCGCCAAGGCCGCCAGCGCGGACAC CGCTTGCCGTTCCCCATATCCCTCCTGTAA
9	T. 래세이 타이로시나제의 아미노산 서열 (밑줄친 것은 신호 펩티드이고; 성숙 효소는 아래한	<u>MLLSASLALATVSLAQGTTIPVTGVPVSPGAAVPLR</u> QNINDLA <span style="text-decoration: underline;">KSGPQWDLYVQAMYNMSKMDSHDPYSFFQIAG</span> IHGAPYIEYNKAGAKSGDWLGYCPHGEDLFISWHRPYV LLFEQALVSVAKGIANSYPPSVRAKYQAAAASLRAPYWD

[0163]

	밀줄쳐진 서열을 포함하지 않음)	WAADSSVPAVTVPQLKINVPSGSSTKTVDYTNPLKTYYF PRMSLTGSYGEFTGGGNDHTVRCAASKQSYPATANSLA ARPYKSWIYDVLNTSQNFADFASTSGPGINVEQIHNAIH DGACGSQFLAPDYSGFDPFFMHQAQVDRMWAFWEAIM PSSPLFTASYKGQSRFSNSKGSTITPDSPLOPFYQANGKFH TSNTVKSIQGMGYSYQGIEYWQKSQAQIKSSVTIINQLY GPNSGKKRNAPRDFLSIVTDVENLIKTRYFAKISVNTEV TVRPAEINVYVGQKAGSLIVMKLPAEGTVNGGFTIDNPM QSILHGLLRNAVQAFTEDIEVEILSKDGQAIPLETVPSLSID LEVANVTLPSALDQLPKYQRSRRAKAAQRGHRFRAVPH IPPL
10	세레나 유니컬러 유래의 라카제 D 의 성숙 아미노산 서열 (성숙 = 신호 서열 없음)	AIGPVADLHIVNKDLAPDGVQRPTVLAGGTFPGTLITGQK GDNFQLNVIDDLLDDRLMLPTSIHWHGFFFQKGTAWADGP AFVTQCPPIADNSFLYDFDVPDFQAGTFWYHSHLSTQYCDG LRGAFVVYDPNDPHKDLYDVDDGGTVITLADWYHVLAQ TVVGAATPDSTLINGLGRSQTGPADAELAVISVEHNKRYR FRLVSISCDPNFTFSVDGHNMTVIEVDGVNTRPLTVDSIQI FAGQRYSFVLNANQPEDNYWIRAMPNIGRNTTLDGKNA AILRYKNASVEEPKTVGPAQSPLEADLRPLVPAPVPGN AVPGGADINHRLNLTSNGLFSINNASFTNPSVPALLQILS GAQNAQDLLPTGSYIGLELGKVVELVIPPLAVGGPHPFHL HGHNFVVVRSAKSDEYNFDDAILRDVVSIGAGTDEVTIRF VTDNPGPWFLHCHIDWHLEAGLAIVFAEGINQTAANPTP QAWDELCPKYNGLSASQKVVKPKKGTAI
11	T. 래세이 유래의 GH61A 의 성숙 아미노산 서열(성숙 = 신호 서열 없음)	HGHINDIVINGWVYQAYDPTFPYESNPPIVVGWTAADLD NGFVSPDAYQNPDIICHKNATNAKGHASVKAGDTILFQW VPVPWPHGPPIVDYLANCNGCETVDKTTLEFFKIDGVGL LSGGDPGTWASDVLISNNNTWVVKIPDNLAPGNYVLRHEI IALHSAGQANGAQNPQCFNIAVSGSGSLQPSGVLTDLY HATDPGVLINIYTSPNYIIPGPTVSGLPTSVAQGSSAATA TASATVPGGGSGPTSRRTTARTTQASSRPSSTPPATTSA AGGPTQTLYGQC GGSGYSGPTRCAPPATCSTLN PYYAQCL N
12	T. 래세이의 구리 이온 막관통 운반체 (웹사이트:	MDMGDGSSQSCKISMLWNWYTVDACFLSSWRIRNRGM FAASCIGIVLLVASVELMRRIGQEYDNSIVRQWHRQAAMA

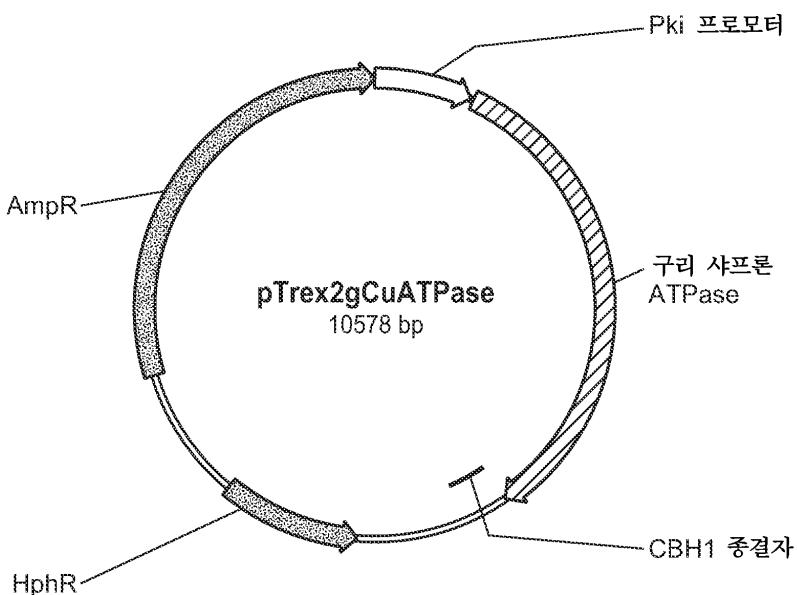
[0164]

	<a href="#">genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html</a> protein ID: 52315)	SDRAGGRTQGSASYCERLLFRATPLQQLVRAIIHAATFGA AYIVMLLAMYFNGYIICIIVGSGVGKFACHWLSVEIDLQP GEGERLLPKPILQTTICCD
13	T. 래세이의 구리 이온 막관통 운반체 (웹사이트: <a href="#">genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html</a> protein ID: 62716)	MLWNWNVNMNTCFISKHWQITSKGMFAGSCIGVILLVIALE FLRRRLSKEYDRFLIKQHAAPRAVPAFRPSVLQQALRALLH VAQFSVAYIVMLLAMYNGYFIICIFIGAYIGSFVFHWEPL TAG
14	T. 래세이의 구리 이온 막관통 운반체 (웹사이트: <a href="#">genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html</a> protein ID: 71029)	MDHSHHMAMEGHGGHGGMQDMCSMNMLFTWD TTNLCIVFRQWHVRSTASLIFSLIAVVLIGIGYEALRSVSR RYEASLATRLETVPQRQNRETVSKRGHVIKATLYAIQNFYA FMLMLVFMTYNGWVMVAVSLGAFVGYLLFGHSTSATKD NACH
15	T. 래세이의 구리 이온 막관통 운반체 (웹사이트: <a href="#">genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html</a> protein ID: 108749)	MTMLMAMVFQTDIRTPLYANSWTPHHAGAYAGTCIFLIA LAVIARLLVAFRARQERIWADHDARRYYVVVNGKEPVAE RLSRDSDAKSATMVISENGVEERVVVVEKKDGATRPWRF SVDPVRAAMDTIVGVGYLLMLAVMTMNVGYFMSVLGG TFLGSLLVGRYSEVYHH

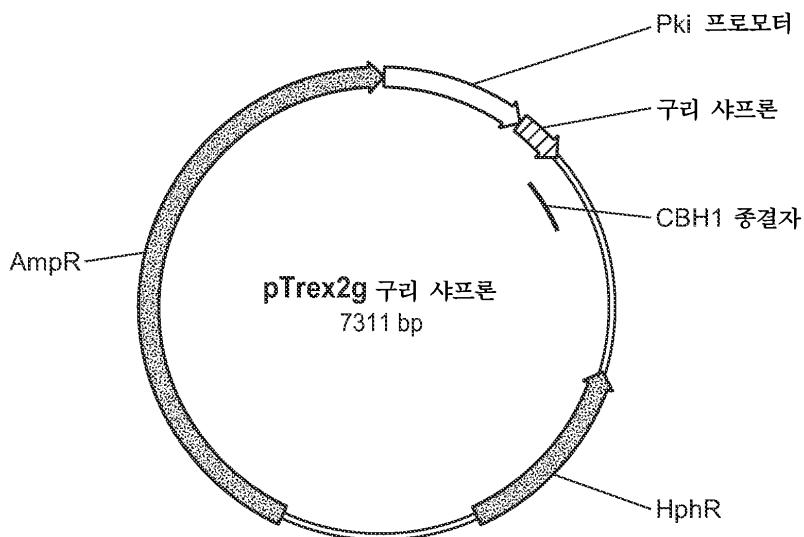
[0165]

## 도면

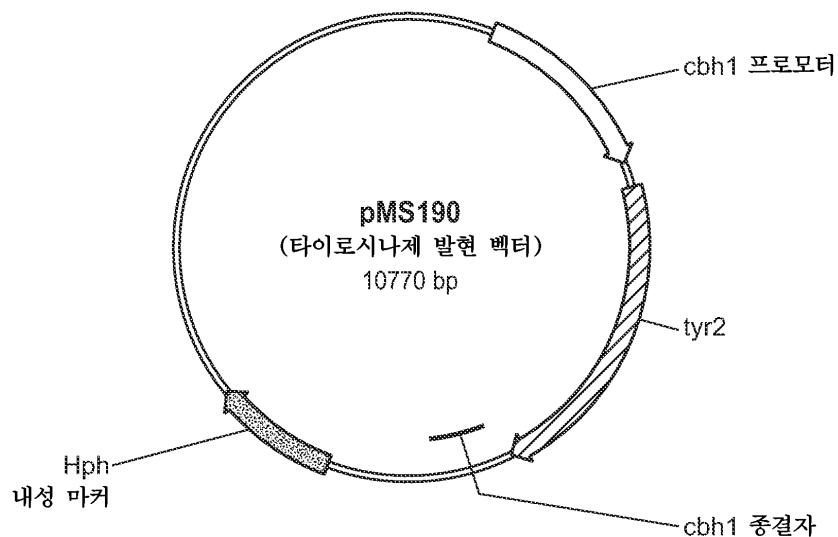
### 도면 1a



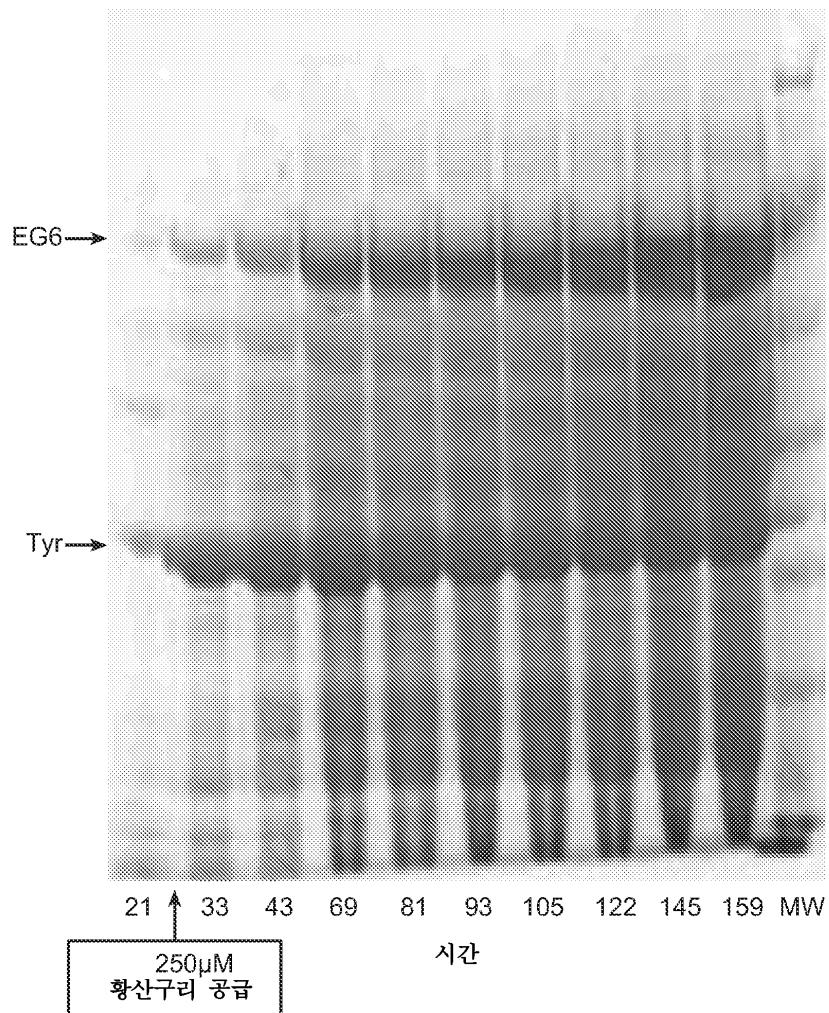
도면 1b



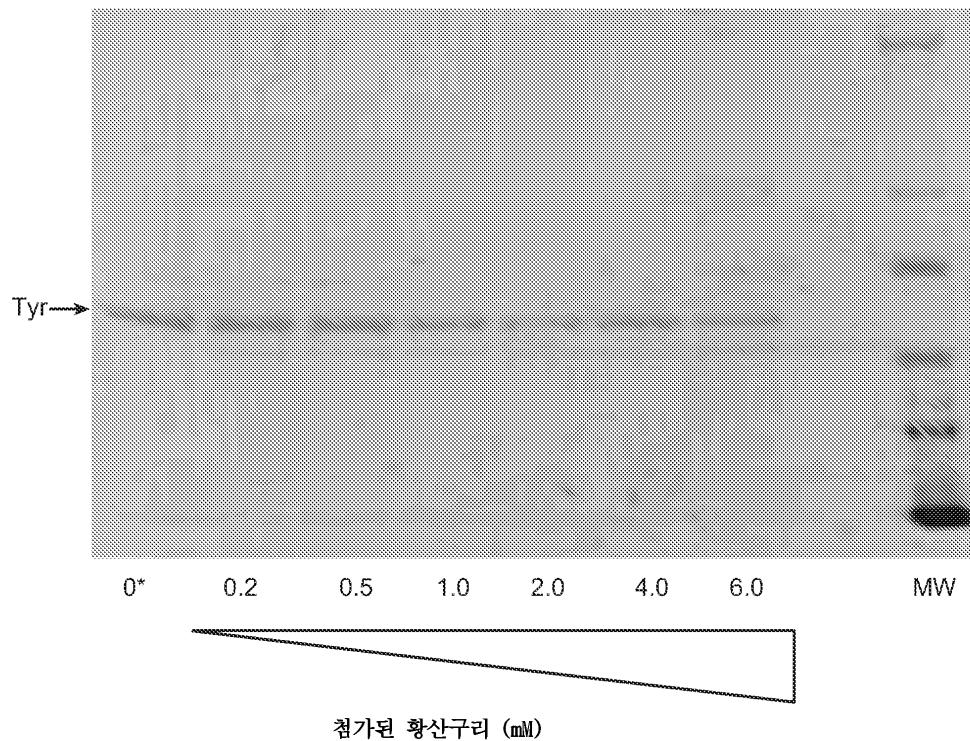
도면 1c



도면2

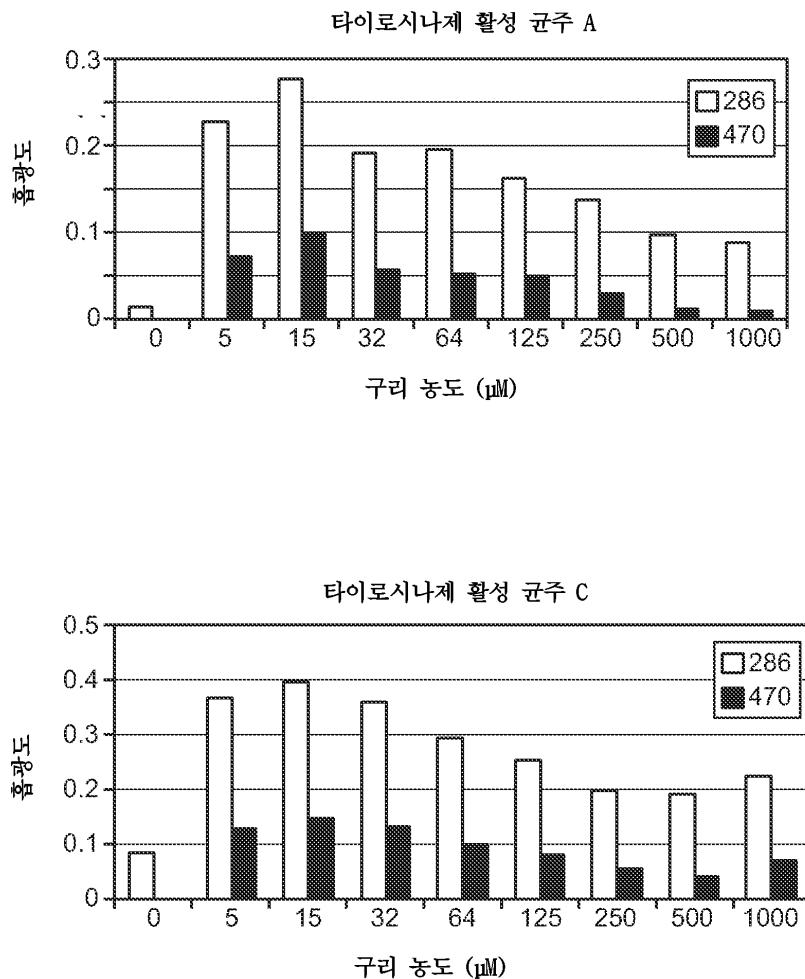


도면3

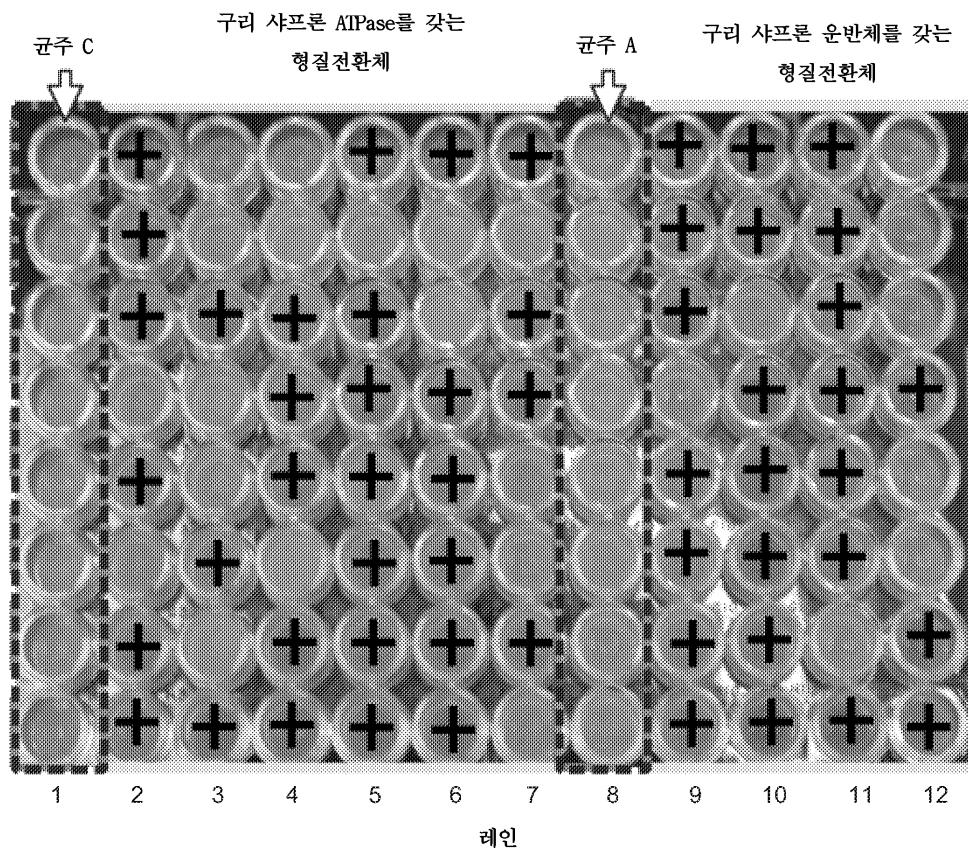


\*0은 미량 원소에 32 $\mu$ M 황산구리를 함유한다

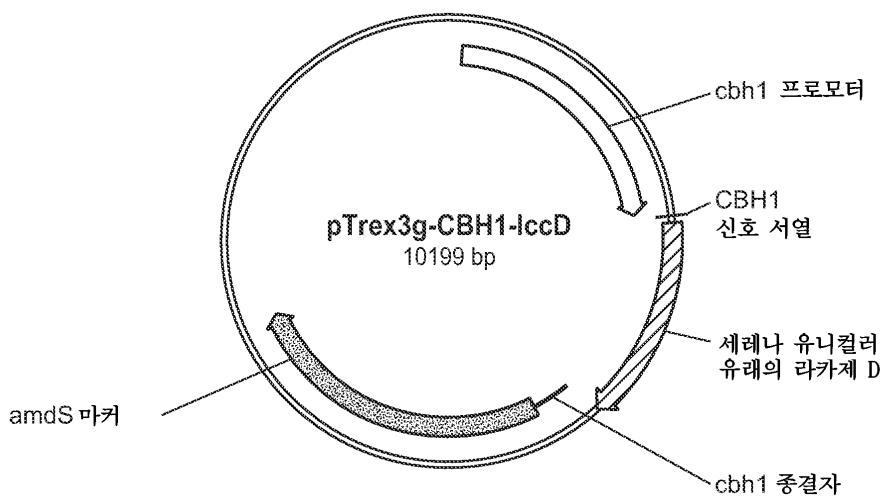
## 도면4

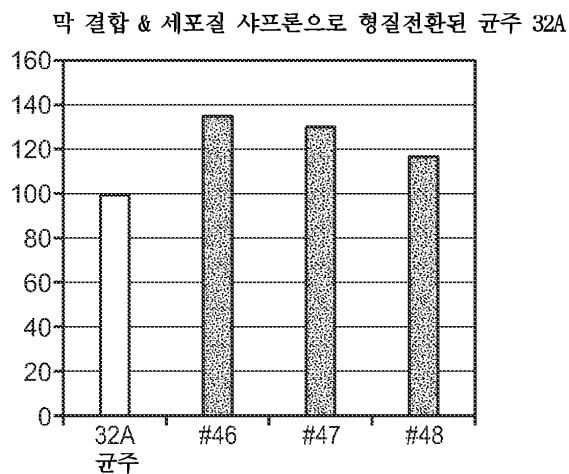
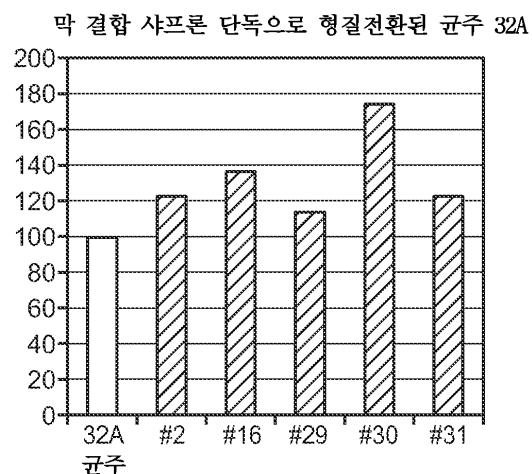
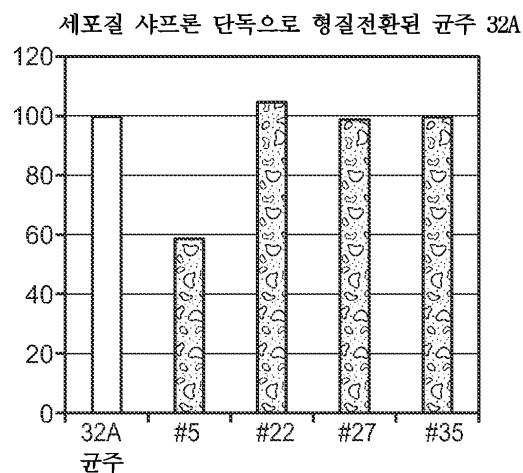


## 도면5



## 도면6



**도면7a****도면7b****도면7c****서 열 목록**

<110> Danisco US Inc.

<120> Compositions and Methods for Improved Protein Production

<130> 40456-WO-PCT

<150> 62/038,095

<151> 2014-08-15

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 407

<212> DNA

<213> T. reesei

<400> 1

atgtctgaga cgacacaccta cgagttcaac gtcaccatga cctgcggcgg ctgctccggc 60  
 gccatcgacc gagtcctcaa gaagctcgag ggtacgttct tgaacaatca ttctcccctc 120  
 tcctctcctc tcctcccctc tctctctccc tctctctcct ccgtcatgcc gtaggagcac 180

tgtctgccc cctccccctc caaagaaaaa cacagcactg actcggttgg ttttcttct 240  
 ttctcgagg cgtcgaaagc tacgaagtct ccctcgacaa ccagaccgca aaggtcgta 300  
 ccgcgcgtgcc ctacgagacg gtcctgacca agattgcca gacgggcaag aagatcaact 360  
 cggcgacggc cgacggcgtg ccgcagtcg tcgaggatc tgtgttag 407

<210> 2

<211> 251

<212> DNA

<213> T. reesei

<400> 2

atgtctgaga cgacacaccta cgagttcaac gtcaccatga cctgcggcgg ctgctccggc 60  
 gccatcgacc gagtcctcaa gaagctcgag gggcgctcg aagctacgaa gtctcccctc 120

acaaccagac cgcaaaaggc gtcaccgcgc tgccctacga gacggcgttg accaaggatg 180  
 ccaagacggg caagaagatc aactcgccga cggccgacgg cgtgccgcag tctgtcgagg 240  
 tatctgtgtatg 251

<210> 3

<211> 82

<212> PRT

<213> T. reesei

&lt;400&gt; 3

Met Ser Glu Thr His Thr Tyr Glu Phe Asn Val Thr Met Thr Cys Gly

1 5 10 15

Gly Cys Ser Gly Ala Ile Asp Arg Val Leu Lys Lys Leu Glu Gly Val

20 25 30

Glu Ser Tyr Glu Val Ser Leu Asp Asn Gln Thr Ala Lys Val Val Thr

35 40 45

Ala Leu Pro Tyr Glu Thr Val Leu Thr Lys Ile Ala Lys Thr Gly Lys

50 55 60

Lys Ile Asn Ser Ala Thr Ala Asp Gly Val Pro Gln Ser Val Glu Val

65 70 75 80

Ser Val

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 3605

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; T. reesei

&lt;400&gt; 4

atggcccaa catacatcaa agtccccggg cgggacaatg atgagcatgc gagtgcgacc 60

cttacgccaa agagcgcgca catggccaca accactctgc gcgttggtgg catgacgtag 120  
 gtttcgtccg ttccggctg tgcttccggc caaggctctgc agcacaagca tggctggtca 180  
 ttctttctaa cacttcttct tgcagatgtg gttcgtgcac agcagccgtc gagggcggct 240  
 tcaagggcgt caagggcgtt ggtaccgtct ccgtcagccct ttttatggag agggctgtcg 300  
 taatgcacga ccccccggatc atcagcgctg aacagggtcg agagattatc gaagattgtg 360  
 gattcgaacgc ttagctgctg tcgacggacc tcttgagccc actcgtccct cgattctcg 420  
 atgccaaggg ggatgaggac atcgatagcg gcctcttgac gaccacggta gccatcgaag 480

gcatgacgtg tggccctgt acatctgctg tcgagggtgg attcaaggat atcccaggtg 540  
 tcaagagctt cagcatctcg cttcttctg agcgagccgt catcgaacac gatccagaac 600  
 ttttgcac cggacaagatt accgaaatca tcgaagaccg gggcttttgtt gccgaaatcg 660  
 tcgattccgt gaaggcgcaa cctggcagca gtaccgaggc tgagaaccca gcaagtcatg 720  
 tcgtgactac gacggtagcc atcgaaggaa tgacttgccg tgcctgtacg tctgctgttg 780  
 agggaggctt tcagggagtt gacggcatcc tgaaattcaa catcagtctt ctggccgaaa 840

gggcagtcat tactcacgt gtcaccaaga tctccgccga acagattcc gaaatcggt	900
aagaccgggg atttggtgct acggtttgt ccaccgtccc ggaggcaaac gatctcagca	960
gtacgacctc gcagttcaaa atctatggca gcccggacgc cgccactgca aaggagctgg	1020
aggaaaagct gctggactt gctgggtta aatctgcttc cctcagccta tcaacggacc	1080
gcctgtccgt cacgcaccag cctggcgta ttgggtccg agggatcg tc gaggcgtag	1140
aggcgcaagg cctgaatgt ttgggtggcg acagccacga caacaacgca caactcaat	1200
ccttggccaa gactcgcgag atccaggaat ggaggacggc gtcaagacg tccgcctcg	1260
tcgcattcc ggtattcggtt ctggccatgg tggtgcctat gatctcagac agtctgaacc	1320
ttagtctaatttccatggc catggctctt acctcgccga cgctgtcaac ttggactca	1380
caacacctgt tcagtttggg gttggaaagc gctttacgt ctggccttc aagtcgtca	1440
agcaccgttc gccgactatg gatgtgtcg tcatgtcg cacccctgc gcttacttct	1500
tcagcatctt ctccatggtc atctctatcc tcttcgagcc tcattccccg ccggcacga	1560
tcttgacac cagcaccatg ctcatcacct ttgtgaccc ttggccgtat cttgagaaca	1620
gcgcacaaggg tcagacatca aaggctctgt cccgtctcat gtctctagcc ccgtcgatgg	1680
ccaccatcta cacggatccc attggcccg agaaggcagc agaatcatgg gccaagtcaa	1740
ccgatacacc cgccggatgcaaaaggccaaac cgtctggaga tgccgacggc tcgtcgtagc	1800
aggagaagag catccctact gagctgcitc aggtggaga tatcgctgc atccgaccgc	1860
gtgataagat tccggcggac ggcgtcgta tgccggaga gacctacgtc gacgagagca	1920
tggtcacccg agaggcaatg ccgggtcgaga agaggattgg cagcaacgtg attggaggca	1980
cggtaacccg caacggcaga gtggacttgc gctgtacccg agccggccgg gatacccg	2040
tcagtcagat tgtcaagctt gttcaggacg cgcagacgac gagggccctt attcaaaagg	2100
tggccgacac ttggctggc tactttgtgc ctacaatctt gctgctggc atcctcacct	2160
tccttgctg gttgatcctc agccacgccc tgcgcaccc ccctatgatt ttcttgaaaga	2220
acaccagtgg tggcaagggtc atgatttgcg tcaagctgtg catctcgtc attgtatttg	2280
catgcccttgc tgcgtcggtt ctggccacgc cgacagctgt catggtaggc acggcggtgg	2340
gcccgtggaa tggcatcctc atcaaaggcg gagctgcgtt ggagcgaacc acccaggta	2400
ccaaagtctgt ctggacaaa accggcacaa tcactcggtt caaaatggag gtcgccaaga	2460
gcggccctgtt gttccctgg aatgacaacg tgcgcagac caaagctgtt tggccgtgt	2520
tcggctggc gaaaaatggc agcgagcacc ctatcgaaag ggcgattctg gcagcggcca	2580

aggcagaagt	cggcatcctt	gaagccgaag	ccgccattcc	aggaagcgta	aatgattca	2640
agttgactgt	tggcaaggc	atcgatgcta	tcgttgaaacc	tgcattatcc	ggtgatcgga	2700
cacgctata	ggtccttgct	ggaaatgtca	ccttccttga	agagaacggc	gtcgagggtcc	2760
ccaaggatgc	cgtcgaggca	gcagagcga	tcaactcg	cgtcaagagc	tcacgagcca	2820
aggctgtgac	tgcgggcacg	accaacatct	ttgtcgccat	tgtatggaaag	tacagcggcc	2880
acctttgtct	ctccgacacc	atcaaagatg	gggcggccgg	ggtcatttct	gtactgcata	2940
gcatggccat	caagacggcc	atggtgacgg	gagaccagcg	accaccgc	ctggccgttg	3000
ccgcctcg	ggcatctct	cccgaggacg	tgttgccgg	cgtcagcccc	gaccagaagc	3060
aggtgatagt	acagcagttc	cagaaccagg	gagagggtgt	cgcattgg	ggagacggca	3120
tcaacgactc	gccggccctc	gctacggccg	acgttgttat	cgcattgtcg	agcggAACGG	3180
acgtggccat	ggaggccgca	gatgttgtgc	ttatggtcc	cgacgacctg	ctgagcatcc	3240
cgtccgccat	ccacactact	cgaccatct	tccgccc	caagctgaac	ctggcgtggg	3300
catgcatcta	caacattgtc	ggcctgccc	ttgccatggg	tttcttcctg	ccgttggca	3360
tccacatgca	ccccatgttc	gccgggttcg	ccatggcctg	cagtagcatt	agtgtatgg	3420
ttagcagcct	ggcgctccg	tggggcaac	gaccgcagt	gatggacgag	gcgtccgaac	3480
cggcggtgg	cctgcgcgtgg	atgagcggca	cggcatcgt	tggctggct	aaggagacgt	3540
ttggacgcgt	caggagaggg	aagcgtgagg	agggttacgt	ggcggtggag	aatttagagg	3600
tctga						3605
<210>	5					
<211>	3516					
<212>	DNA					
<213>	T. reesei					
<400>	5					
atggcccaa	catacatcaa	agtccccggg	cgggacaatg	atgagcatgc	gagtgcgacc	60
cttacgccaa	agagcgcgca	catggccaca	accactctgc	gcgttgtgg	catgacatgt	120
ggttcgtca	cagcagccgt	cgagggcggc	ttcaagggcg	tcaagggcgt	tggtaccgtc	180
tccgtcagcc	ttgttatgga	gagggctgtc	gtaatgcacg	accccccggat	catcagcgct	240
gaacaggttc	gagagattat	cgaagattgt	ggattcgacg	ctgagctgct	gtcgacggac	300
ctcttgagcc	cactcgccc	tcgattctcg	gatgccaagg	ggatgagga	catcgatagc	360
ggcctttga	cgaccacggt	agccatcgaa	ggcatgacgt	gtggcgcctg	tacatctgt	420
gtcgagggtg	gattcaagga	tatcccaggt	gtcaagagct	tcagcatctc	gcttcttct	480

gagcgagccg tcatcgaaca cgatccagaa ctttgccca ccgacaagat taccgaaatc	540
atcgaagacc gggccttgg tgccgaaatc gtcgattccg tgaaggcgca acctggcagc	600
agtaccgagg ctgagaaccc agcaagtcat gtcgtgacta cgacggtagc catcgaagga	660
atgacttgcg gtgcctgtac gtctgctgtt gagggaggct tttagggagt tgacggcatc	720
ctgaaattca acatcagtct tctggccaa agggcagtca ttactcacga tgtcaccaag	780
atctccgccc aacagattc cgaaatcggtt gaagaccggg gatttggtgc tacggtttg	840
tccaccgtcc cggaggcaaa cgatctcagc agtacgaccc cgacgttcaa aatctatggc	900
agcccgacg ccgcactgc aaaggagctg gaggaaaagc tgctggcact tgctgggttt	960
aaatctgctt ccctcagcct atcaacggac cgccctgtccg tcacgcacca gcctgccgtc	1020
attgggctcc gagggatcgt cgaggcgta gaggcgcaag gcctgaatgc tttggtggcg	1080
gacagccacg acaacaacgc gcaactcgaa tccttggcca agactcgcga gatccaggaa	1140
tggaggacgg cgtcaagac gtccgcctcg ttccgcattc cggtattcgt tcttccatg	1200
gtgttgcccta tgcatacaga cagtctgaac ctgagtcataa tccacccggg ccatggtctc	1260
tacctcgccg acgtcgtaa cttggactc acaacacctg ttcaagttgg gttggaaag	1320
cgctttacg tctcggcctt caagtcgctc aagcaccgtt cgccgactat ggatgtgctc	1380
gtcatgctcg gcacctcctg cgcttacttc ttcaagcatct tctccatggt catctctatc	1440
ctcttcgagc ctcattcccc gccgggcacg atcttgcaca ccagcacccat gctcatcacc	1500
tttgtgacct tggccgcta tcttgagaac agcgccaagg gtcaagacatc aaaggctctg	1560
tcccgctca tgtctctagc cccgtcgatg gcccacatct acacggatcc cattggcg	1620
gagaaggcag cagaatcatg gccaagtca accgatacac ccgcggatgc gaaaggccaa	1680
ccgtctggag atgcgagcgg ctgcgtac gaggagaaga gcatccctac tgagctgctt	1740
cagggtggag atatcgctgt catccgaccc ggtgataaga ttccggcgaa cggcgtcgat	1800
atgcgaggag agacctacgt cgacgagagc atggcaccc gagaggcaat gccggcgcag	1860
aaggaggattt gcagcaacgt gattggaggc acggtaacg gcaacggcag agtggacttt	1920
cgcgtcaccc gagccggcgc ggatacccg ctcagtcaga ttgtcaagct tggtcaggac	1980
gcgcagacga cgagggcgcc tattcaaaag gtggccgaca cttggctgg ctactttgt	2040
cctacaatct tgctgctcg catcctcacc ttccctggct ggttgcattc cagccaccc	2100
ctgtcgacc cccctatgtat ttcttgcag aacaccagtgt gtggcaaggt catgattgc	2160
gtcaagctgt gcatctccgt cattgtattt gcatgcctt gtgtctggg cctggccacg	2220

ccgacagctg tcatggtagg cacggcgtg ggcgctgaga atggcatcct catcaaaggc	2280
ggagctgcgc tggagcgaac cacccagtt accaaagtgc tcttggacaa aaccggcaca	2340
atcaactcgta gcaaaatgga ggtcgccaag agcggccttg tgttccctg gaatgacaac	2400
gtgtcgacca ccaaagtctg gtggccgt gtcggctgg cgaaatggg cagcggcac	2460
cctatcgaa gggcattct ggcagcggcc aaggcagaag tcggcatcct tgaagccaa	2520
gccgccattc caggaagcgt caatgattc aagttgactg ttggcaaggg catcgatgt	2580
atcggtgaac ctgcattatc cggtgatcgg acacgctata gggtccttgc tgaaatgtc	2640

accttccttgc aagagaacgg cgtcgaggc cccaggatg ccgtcgaggc agcagagcga	2700
atcaactcgta cctcaagag ctcacgagcc aaggctgtga ctgcggcac gaccaacatc	2760
tttgcgcca ttgatggaaa gtacagcggc cacccttgc tctccgacac catcaaagat	2820
ggggcggccg gggtcatttc tgtactgeat agcatggca tcaagacggc catggtgacg	2880
ggagaccagc gaccaccgc cctggccgtt gccgcctcg tggcatctc tcccgaggac	2940
gtgttgccg gcgtcagccc cgaccagaag caggtgatag tacagcagt ccagaaccag	3000
ggagaggtgg tcgccccatggt gggagacggc atcaacgact cgccggccct cgctacggcc	3060

gacgttggta tcgccccatggc gagcggaaacg gacgtggcca tggaggccgc agatgttgt	3120
cttatgcgtc ccgacgacct gctgagcatc ccgtccgcca tccacactac tcggaccatc	3180
ttccggccca tcaagctgaa cctggcgtgg gcatgcacatc acaacattgt cggcctgccc	3240
attggccatgg gtttcttctt gccgtttggc atccacatgc accccatgtt cgccgggttc	3300
gccatggcct gcagtagcat tagttagtgc gtttagcagcc tggcgctccg atggtgccaa	3360
cgaccgcagt ggtatggacga ggcgtccgaa cggcggtgc gcctgcgtg gatgagcggc	3420
acggccatcg ttggctggc taaggagacg tttggacgcg tcaggagagg gaagcgtgag	3480

gagggttacg tggcggttggaa gaatttagag gtctga	3516
---	------

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1171

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; T. reesei

&lt;400&gt; 6

Met Ala Pro Thr Tyr Ile Lys Val Pro Gly Arg Asp Asn Asp Glu His

1 5 10 15

Ala Ser Ala Thr Leu Thr Pro Lys Ser Ala His Met Ala Thr Thr

20 25 30

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

35	40	45
----	----	----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Ile Glu Gly Met Thr Cys Gly Ala Cys Thr Ser Ala Val Glu Gly Gly  
 130                  135                  140  
 Phe Lys Asp Ile Pro Gly Val Lys Ser Phe Ser Ile Ser Leu Leu Ser  
 145                  150                  155                  160  
 Glu Arg Ala Val Ile Glu His Asp Pro Glu Leu Leu Pro Thr Asp Lys  
 165                  170                  175  
 Ile Thr Glu Ile Ile Glu Asp Arg Gly Phe Gly Ala Glu Ile Val Asp  
 180                  185                  190

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

260	265	270
-----	-----	-----

Arg Gly Phe Gly Ala Thr Val Leu Ser Thr Val Pro Glu Ala Asn Asp  
 275                  280                  285

Leu Ser Ser Thr Thr Ser Gln Phe Lys Ile Tyr Gly Ser Pro Asp Ala  
 290 295 300  
 Ala Thr Ala Lys Glu Leu Glu Glu Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Val  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Ala Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asp Arg Leu Ser Val Thr His  
 325 330 335  
  
 Gln Pro Ala Val Ile Gly Leu Arg Gly Ile Val Glu Ala Val Glu Ala  
 340 345 350  
 Gln Gly Leu Asn Ala Leu Val Ala Asp Ser His Asp Asn Asn Ala Gln  
 355 360 365  
 Leu Glu Ser Leu Ala Lys Thr Arg Glu Ile Gln Glu Trp Arg Thr Ala  
 370 375 380  
 Cys Lys Thr Ser Ala Ser Phe Ala Ile Pro Val Phe Val Leu Ser Met  
 385 390 395 400  
 Val Leu Pro Met Ile Ser Asp Ser Leu Asn Leu Ser Leu Ile His Leu  
  
 405 410 415  
 Gly His Gly Leu Tyr Leu Gly Asp Val Val Asn Leu Val Leu Thr Thr  
 420 425 430  
 Pro Val Gln Phe Gly Val Gly Lys Arg Phe Tyr Val Ser Ala Phe Lys  
 435 440 445  
 Ser Leu Lys His Arg Ser Pro Thr Met Asp Val Leu Val Met Leu Gly  
 450 455 460  
 Thr Ser Cys Ala Tyr Phe Phe Ser Ile Phe Ser Met Val Ile Ser Ile  
 465 470 475 480  
  
 Leu Phe Glu Pro His Ser Pro Pro Gly Thr Ile Phe Asp Thr Ser Thr  
 485 490 495  
 Met Leu Ile Thr Phe Val Thr Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Asn Ser Ala  
 500 505 510  
 Lys Gly Gln Thr Ser Lys Ala Leu Ser Arg Leu Met Ser Leu Ala Pro  
 515 520 525  
 Ser Met Ala Thr Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Ala Ala  
 530 535 540

Glu Ser Trp Ala Lys Ser Thr Asp Thr Pro Ala Asp Ala Lys Gly Gln

545 550 555 560

Pro Ser Gly Asp Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Glu Glu Lys Ser Ile Pro

565 570 575

Thr Glu Leu Leu Gln Val Gly Asp Ile Val Val Ile Arg Pro Gly Asp

580 585 590

Lys Ile Pro Ala Asp Gly Val Val Met Arg Gly Glu Thr Tyr Val Asp

595 600 605

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

610 615 620

Ser Asn Val Ile Gly Gly Thr Val Asn Gly Asn Gly Arg Val Asp Phe

625 630 635 640

Arg Val Thr Arg Ala Gly Arg Asp Thr Gln Leu Ser Gln Ile Val Lys

645 650 655

Leu Val Gln Asp Ala Gln Thr Thr Arg Ala Pro Ile Gln Lys Val Ala

660 665 670

Asp Thr Leu Ala Gly Tyr Phe Val Pro Thr Ile Leu Leu Leu Gly Ile

675 680 685

Leu Thr Phe Leu Gly Trp Leu Ile Leu Ser His Ala Leu Ser His Pro

690 695 700

Pro Met Ile Phe Leu Lys Asn Thr Ser Gly Gly Lys Val Met Ile Cys

705 710 715 720

Val Lys Leu Cys Ile Ser Val Ile Val Phe Ala Cys Pro Cys Ala Leu

725 730 735

Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala Val Met Val Gly Thr Gly Val Gly Ala

740 745 750

Glu Asn Gly Ile Leu Ile Lys Gly Ala Ala Leu Glu Arg Thr Thr

755 760 765

Gln Val Thr Lys Val Val Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Arg Gly

770 775 780

Lys Met Glu Val Ala Lys Ser Gly Leu Val Phe Pro Trp Asn Asp Asn

785	790	795	800
Val Ser Gln Thr Lys Val Trp Trp Ala Ala Val Gly Leu Ala Glu Met			
805	810	815	
Gly Ser Glu His Pro Ile Gly Arg Ala Ile Leu Ala Ala Lys Ala			
820	825	830	
Glu Val Gly Ile Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ile Pro Gly Ser Val Asn			
835	840	845	
Asp Phe Lys Leu Thr Val Gly Lys Gly Ile Asp Ala Ile Val Glu Pro			
850	855	860	
Ala Leu Ser Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Val			
865	870	875	880
Thr Phe Leu Glu Glu Asn Gly Val Glu Val Pro Lys Asp Ala Val Glu			
885	890	895	
Ala Ala Glu Arg Ile Asn Ser Ser Val Lys Ser Ser Arg Ala Lys Ala			
900	905	910	
Val Thr Ala Gly Thr Thr Asn Ile Phe Val Ala Ile Asp Gly Lys Tyr			
915	920	925	
Ser Gly His Leu Cys Leu Ser Asp Thr Ile Lys Asp Gly Ala Ala Gly			
930	935	940	
Val Ile Ser Val Leu His Ser Met Gly Ile Lys Thr Ala Met Val Thr			
945	950	955	960
Gly Asp Gln Arg Pro Thr Ala Leu Ala Val Ala Ala Leu Val Gly Ile			
965	970	975	
Ser Pro Glu Asp Val Phe Ala Gly Val Ser Pro Asp Gln Lys Gln Val			
980	985	990	
Ile Val Gln Gln Phe Gln Asn Gln Gly Glu Val Val Ala Met Val Gly			
995	1000	1005	
Asp Gly Ile Asn Asp Ser Pro Ala Leu Ala Thr Ala Asp Val Gly Ile			
1010	1015	1020	
Ala Met Ser Ser Gly Thr Asp Val Ala Met Glu Ala Ala Asp Val Val			
1025	1030	1035	1040
Leu Met Arg Pro Asp Asp Leu Leu Ser Ile Pro Ser Ala Ile His Leu			

1045                  1050                  1055

Thr Arg Thr Ile Phe Arg Arg Ile Lys Leu Asn Leu Ala Trp Ala Cys

1060                  1065                  1070

Ile Tyr Asn Ile Val Gly Leu Pro Ile Ala Met Gly Phe Phe Leu Pro

1075                  1080                  1085

Phe Gly Ile His Met His Pro Met Phe Ala Gly Phe Ala Met Ala Cys

1090                  1095                  1100

Ser Ser Ile Ser Val Val Ser Ser Leu Ala Leu Arg Trp Trp Gln

1105                  1110                  1115                  1120

Arg Pro Gln Trp Met Asp Glu Ala Ser Glu Pro Ala Gly Gly Leu Arg

1125                  1130                  1135

Trp Met Ser Gly Thr Gly Ile Val Gly Trp Ala Lys Glu Thr Phe Gly

1140                  1145                  1150

Arg Val Arg Arg Gly Lys Arg Glu Glu Gly Tyr Val Ala Leu Glu Asn

1155                  1160                  1165

Leu Glu Val

1170

<210> 7

<211> 2404

<212> DNA

<213> T. reesei

<400> 7

atgcgttgt cagcgtccct ctggcgtt gccttggcca cagtttact cgcacaggc 60

acgacacaca tccccgtcac cggtgttccc gtctctcctg gtgctgccgt gccgctgaga 120

cagaacatca atgacctggc caagtccggg ccgcaatggt gagtgacgcc ctccattcac 180

cacactttac ctcatgtcaag agacaagagg gagacaagta caaagcggat gaaaagaggt 240

ggacaagaga gagagagaga gaaagtgtgt gtgtgtatgt gagagcgaga gagagagaga 300

gagacaagag ctattggatg gaccaggagc cagcatggag aacagggga gacttgacga 360

ttcgaggaga gggggctca catgtgcgtg cgaataggta tctctacgtt caggccatgt 420

acaacatgtc caagatggac tcccatgacc cgtacagctt cttccagatt gccggtaaat 480

atacatctcg gcctcctgctg aggcgacgtg actctcgag cttagtaa caccagctag 540

gcatccacgg cgcacgtac attgagtaca acaaggccgg agcaaagtgc ggcgatggct	600
ggctgggcta ctgccctcac ggtgtatgtg ttttgtcca tcgaggaggg cgcaagagtt	660
tcatggactt gaactcttcg cccttgggt gagccggaaa tcatcgctc tgacagttc	720
attaggagga cctcttcatac agctggcacc gcccctatgt ccigctctt gaggtatgtat	780
ttgaccacgc tggactttga cctcatacaa acatcaactg acatcggtgc agcaagcctt	840
ggtctccgctc gc当地aggca tcgccaactc gtatccccg tctgtccgctc ccaagtagcca	900
ggctgccccc gccagcctgc gcccctta ctggactgg gcccggaca gctccgtgcc	960
cgcgtcacc gtccccaga cgctcaagat caacgtcccc agcggcagca gcaccaagac	1020
cgtcgactac accaaccgc tcaagacgt a ctacttcccg cgcatgtct tgaccggctc	1080
gtacggcgag ttccacggcg gaggcaacga ccacaccgtc cgctgcggc cctccaagca	1140
gagctatccc gccacccgcca actccaacct ggctgcccgt cttacaagt cctggatcgt	1200
acgtatccc cttccctt tggaaagctt cccttgagta aagctcgta ctgacacaga	1260
gagccggcccg cagtagatg tcctgaccaa ctctcaaaac ttggccact tcgcctccac	1320
cagccggccccc ggc当地caacg ttgagcagat ccacaacgcc atccactggg acggtgcttg	1380
cggtcccgag ttccctgccc cc当地actactc cggcttcgac cccctgttgt aagtcaatcg	1440
agacgtcaag agtcatcttgc tcaacaacgg atggcaaaacg cagtcgtac tgacgctgca	1500
aaatagcttc atgcaccacg cccaggtcga cc当地atgtgg gccttctgg aggccatcat	1560
gccctcgctc cccctttca cggccctcgta caagggccag tc当地cttca actccaagtc	1620
ggccagcacc atcaccccg actcgccct gcagcccttc taccaggcca acggcaagtt	1680
ccacacgtcc aacacggtca agagcatcca gggcatggc tactcgtaacc accatcgatcga	1740
gtactggcaa aagtccagg cccagatcaa gtc当地cgctc accaccatca tcaaccagct	1800
gtacggggcc aactcgccca agaagcgcaa cggccggcgc gacttcttgc ggc当地atgt	1860
caccgacgtc gagaacctca tcaagacccg ttactttgc aagatctcg tcaacgtgac	1920
cgaggtgacg gtccggcccg cc当地agatcaa cgtctacgtc ggccggccaga aggccggcag	1980
cttgc当地gtc atgaagctcc cggccgaggg cacggtaaac ggccggcttca ccattgacaa	2040
ccccatgcaa agcatcctgc acgggtgtc cc当地acgcc ggccggcttca ttaccggaga	2100
cattgagggtt gagattctt ctgtaagttt tcccccctt ctccactccc gaccactcac	2160
tgtcactatt tcgacttagtc accgtcaaga tgtgtatttgc ttgc当地gacc cccaaagcgca	2220
gaaggacgga caagccatcc cc当地cgagac ggtcccgagc ctgtccatcg acctcgaggt	2280
cgccaaacgtc accctgcctt cc当地ctcgta ccagctgccc aagtacggcc agcgc当地ccag	2340
gcaccggcggcc aaggccggccc agcgc当地gaca cc当地tttgc gttcccccata tccctctt	2400

gtaa	2404
<210>	8
<211>	1686
<212>	DNA
<213>	T. reesei
<400>	8
atgctgttgt cagcgtccct ctggcggt gccttggcca cagttcact cgcacaggc	60
acgacacaca tccccgtcac cggtgttccc gtctctctg gtgctgccgt gccgctgaga	120
cagaacatca atgacctggc caagtccggg ccgcaatggg atctctacgt tcaggccatg	180
tacaacatgt ccaagatgga ctcccatgac ccgtacagct tcttccagat tgccggcatc	240
cacggcgac cgtacattga gtacaacaag gccggagcaa agtcgggcga tggctggctg	300
ggctactgcc ctacgggtga ggaccttcc atcagctggc accgccccta tgtcctgctc	360
ttttagcaag ctttggtctc cgtcgccaag ggcatacgca actcgatacc cccgtctgtc	420
cgcgccaagt accaggctgc cgccgcccagc ctgcgcgccc cctactggga ctggccgccc	480
gacagctccg tccccggcgt caccgtcccc cagacgctca agatcaacgt ccccgccgc	540
agcagcacca agaccgtcga ctacaccaac ccgtcaaga cgtactactt cccgcgcatt	600
tccttgaccg gctcgtaacgg cgagttcacc ggcggaggca acgaccacac cgtccgctgc	660
gccgcctcca agcagagcta tccccccacc gccaactcca acctggctgc ccgtccttac	720
aagtccatgg tctacgtatgt cctgaccaac tctcaaaaact ttggcgactt cgcctccacc	780
agcgcccccg gcatcaacgt tgtagcagatc cacaacgca tccactggga cggtgcttgc	840
ggctcccaagt tcctcgcccc cgactactcc ggcttcgacc ccctgttctt catgcaccac	900
gcccgaggctcg accgcatgtg ggccttctgg gaggccatca tgcctcgtc gccccttcc	960
acggcctcgta acaagggcca gtcgcgttca aactccaagt cgggcagcac catcaccccc	1020
gactcgcccc tgcagccctt ctaccaggcc aacggcaagt tccacacgtc caacacggtc	1080
aagagcatcc agggcatggg ctactcgatc cagggcatcg agtactggca aaagtcccag	1140
gcccgaggatca agtcgagcgt caccaccatc atcaaccagc tgtacgggcc caactcggtc	1200
aagaagcgca acgccccgca cgacttcttgc agcgacattg tcaccgacgt cgagaacctc	1260
atcaagaccc gttactttgc caagatctcg gtcaacgtga ccgaggtgac ggtccgcccc	1320
gcccgaggatca acgtctacgt cggcgccag aaggccgca gcttgcgttcatgaagctc	1380
cccgccgagg gcacggtaa cggcggttca accattgaca accccatgca aagcatctg	1440
cacggtggtc tccgcaacgc cgtccaggcc ttaccgagg acattgaggt tgagattctc	1500

tctaaggacg	gacaagccat	ccccctcgag	acgggtccca	gcctgtccat	cgacctcgag	1560
gtcgccaacg	tcaccctgcc	ctccgcccgc	gaccagctgc	ccaagtacgg	ccagcgtcc	1620
aggcaccgcg	ccaaggccgc	ccagcgcgga	caccgcttg	cggttccccca	tatccctct	1680
ctgtaa						1686
<210>	9					
<211>	561					
<212>	PRT					

<213> T. reesei

<400> 9

Met Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ala Thr Val Ser  
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Gly Thr Thr His Ile Pro Val Thr Gly Val Pro Val Ser

20 25 30

Pro Gly Ala Ala Val Pro Leu Arg Gln Asn Ile Asn Asp Leu Ala Lys  
 35 40 45

Ser Gly Pro Gln Trp Asp Leu Tyr Val Gln Ala Met Tyr Asn Met Ser  
 50 55 60

Lys Met Asp Ser His Asp Pro Tyr Ser Phe Phe Gln Ile Ala Gly Ile  
 65 70 75 80

His Gly Ala Pro Tyr Ile Glu Tyr Asn Lys Ala Gly Ala Lys Ser Gly  
 85 90 95

Asp Gly Trp Leu Gly Tyr Cys Pro His Gly Glu Asp Leu Phe Ile Ser  
 100 105 110

Trp His Arg Pro Tyr Val Leu Leu Phe Glu Gln Ala Leu Val Ser Val  
 115 120 125

Ala Lys Gly Ile Ala Asn Ser Tyr Pro Pro Ser Val Arg Ala Lys Tyr

130 135 140  
 Gln Ala Ala Ala Ala Ser Leu Arg Ala Pro Tyr Trp Asp Trp Ala Ala

145 150 155 160  
 Asp Ser Ser Val Pro Ala Val Thr Val Pro Gln Thr Leu Lys Ile Asn

165 170 175  
 Val Pro Ser Gly Ser Ser Thr Lys Thr Val Asp Tyr Thr Asn Pro Leu

180	185	190
Lys Thr Tyr Tyr Phe Pro Arg Met Ser Leu Thr Gly Ser Tyr Gly Glu		
195	200	205
Phe Thr Gly Gly Asn Asp His Thr Val Arg Cys Ala Ala Ser Lys		
210	215	220
Gln Ser Tyr Pro Ala Thr Ala Asn Ser Asn Leu Ala Ala Arg Pro Tyr		
225	230	235
240		
Lys Ser Trp Ile Tyr Asp Val Leu Thr Asn Ser Gln Asn Phe Ala Asp		
245	250	255
Phe Ala Ser Thr Ser Gly Pro Gly Ile Asn Val Glu Gln Ile His Asn		
260	265	270
Ala Ile His Trp Asp Gly Ala Cys Gly Ser Gln Phe Leu Ala Pro Asp		
275                    280                    285		
Tyr Ser Gly Phe Asp Pro Leu Phe Phe Met His His Ala Gln Val Asp		
290	295	300
Arg Met Trp Ala Phe Trp Glu Ala Ile Met Pro Ser Ser Pro Leu Phe		
305	310	315
320		
Thr Ala Ser Tyr Lys Gly Gln Ser Arg Phe Asn Ser Lys Ser Gly Ser		
325	330	335
Thr Ile Thr Pro Asp Ser Pro Leu Gln Pro Phe Tyr Gln Ala Asn Gly		
340	345	350
Lys Phe His Thr Ser Asn Thr Val Lys Ser Ile Gln Gly Met Gly Tyr		
355	360	365
Ser Tyr Gln Gly Ile Glu Tyr Trp Gln Lys Ser Gln Ala Gln Ile Lys		
370	375	380
Ser Ser Val Thr Thr Ile Ile Asn Gln Leu Tyr Gly Pro Asn Ser Gly		
385	390	395
400		
Lys Lys Arg Asn Ala Pro Arg Asp Phe Leu Ser Asp Ile Val Thr Asp		
405	410	415
Val Glu Asn Leu Ile Lys Thr Arg Tyr Phe Ala Lys Ile Ser Val Asn		
420                    425                    430		

Val Thr Glu Val Thr Val Arg Pro Ala Glu Ile Asn Val Tyr Val Gly  
 435 440 445  
 Gly Gln Lys Ala Gly Ser Leu Ile Val Met Lys Leu Pro Ala Glu Gly  
 450 455 460  
 Thr Val Asn Gly Gly Phe Thr Ile Asp Asn Pro Met Gln Ser Ile Leu  
 465 470 475 480  
 His Gly Gly Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Phe Thr Glu Asp Ile Glu  
 485 490 495

Val Glu Ile Leu Ser Lys Asp Gly Gln Ala Ile Pro Leu Glu Thr Val  
 500 505 510  
 Pro Ser Leu Ser Ile Asp Leu Glu Val Ala Asn Val Thr Leu Pro Ser  
 515 520 525  
 Ala Leu Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Gly Gln Arg Ser Arg His Arg Ala  
 530 535 540  
 Lys Ala Ala Gln Arg Gly His Arg Phe Ala Val Pro His Ile Pro Pro  
 545 550 555 560  
 Leu

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 505

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cerrena unicolor

&lt;400&gt; 10

Ala Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu His Ile Val Asn Lys Asp Leu Ala

1 5 10 15

Pro Asp Gly Val Gln Arg Pro Thr Val Leu Ala Gly Gly Thr Phe Pro

20 25 30

Gly Thr Leu Ile Thr Gly Gln Lys Gly Asp Asn Phe Gln Leu Asn Val

35 40 45

Ile Asp Asp Leu Thr Asp Asp Arg Met Leu Thr Pro Thr Ser Ile His

50 55 60

Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Ala Trp Ala Asp Gly Pro Ala

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

325	330	335
Leu Phe Ser Ile Asn Asn Ala Ser Phe Thr Asn Pro Ser Val Pro Ala		
340	345	350
Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Asn Ala Gln Asp Leu Leu Pro		
355	360	365
Thr Gly Ser Tyr Ile Gly Leu Glu Leu Gly Lys Val Val Glu Leu Val		
370	375	380
Ile Pro Pro Leu Ala Val Gly Gly Pro His Pro Phe His Leu His Gly		
385	390	395
His Asn Phe Trp Val Val Arg Ser Ala Gly Ser Asp Glu Tyr Asn Phe		
405	410	415
Asp Asp Ala Ile Leu Arg Asp Val Val Ser Ile Gly Ala Gly Thr Asp		
420	425	430
Glu Val Thr Ile Arg Phe Val Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu		
435	440	445
His Cys His Ile Asp Trp His Leu Glu Ala Gly Leu Ala Ile Val Phe		
450	455	460
Ala Glu Gly Ile Asn Gln Thr Ala Ala Ala Asn Pro Thr Pro Gln Ala		
465	470	475
Trp Asp Glu Leu Cys Pro Lys Tyr Asn Gly Leu Ser Ala Ser Gln Lys		
485	490	495
Val Lys Pro Lys Lys Gly Thr Ala Ile		
500	505	
<210>	11	
<211>	323	
<212>	PRT	
<213>	T. reesei	
<400>	11	
His Gly His Ile Asn Asp Ile Val Ile Asn Gly Val Trp Tyr Gln Ala		
1	5	10
Tyr Asp Pro Thr Thr Phe Pro Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Ile Val Val		
20	25	30

Gly Trp Thr Ala Ala Asp Leu Asp Asn Gly Phe Val Ser Pro Asp Ala

35 40 45

Tyr Gln Asn Pro Asp Ile Ile Cys His Lys Asn Ala Thr Asn Ala Lys

50 55 60

Gly His Ala Ser Val Lys Ala Gly Asp Thr Ile Leu Phe Gln Trp Val

65 70 75 80

Pro Val Pro Trp Pro His Pro Gly Pro Ile Val Asp Tyr Leu Ala Asn

85 90 95

Cys Asn Gly Asp Cys Glu Thr Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe

100 105 110

Lys Ile Asp Gly Val Gly Leu Leu Ser Gly Gly Asp Pro Gly Thr Trp

115 120 125

Ala Ser Asp Val Leu Ile Ser Asn Asn Asn Thr Trp Val Val Lys Ile

130 135 140

Pro Asp Asn Leu Ala Pro Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile

145 150 155 160

Ala Leu His Ser Ala Gly Gln Ala Asn Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln

165 170 175

Cys Phe Asn Ile Ala Val Ser Gly Ser Gly Ser Leu Gln Pro Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Asn Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Asn Tyr Ile Ile Pro Gly Pro Thr Val

210 215 220

Val Ser Gly Leu Pro Thr Ser Val Ala Gln Gly Ser Ser Ala Ala Thr

225 230 235 240

Ala Thr Ala Ser Ala Thr Val Pro Gly Gly Ser Gly Pro Thr Ser

245 250 255

Arg Thr Thr Thr Ala Arg Thr Thr Gln Ala Ser Ser Arg Pro Ser

260 265 270

Ser Thr Pro Pro Ala Thr Thr Ser Ala Pro Ala Gly Gly Pro Thr Gln

275                    280                    285

Thr Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Arg

290                    295                    300

Cys Ala Pro Pro Ala Thr Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln

305                    310                    315                    320

Cys Leu Asn

<210>      12

<211>      178

<212>      PRT

<213>      T. reesei

<400>      12

Met Asp Met Gly Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Lys Ile Ser Met Leu

1                    5                    10                    15

Trp Asn Trp Tyr Thr Val Asp Ala Cys Phe Leu Ser Ser Ser Trp Arg

20                    25                    30

Ile Arg Asn Arg Gly Met Phe Ala Ala Ser Cys Ile Gly Ile Val Leu

35                    40                    45

Leu Val Ala Ser Val Glu Leu Met Arg Arg Ile Gly Gln Glu Tyr Asp

50                    55                    60

Asn Ser Ile Val Arg Gln Trp His Arg Gln Ala Ala Met Ala Ser Asp

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Leu Phe Arg Ala Thr Pro Leu Gln Gln Leu Val Arg Ala Ile Ile His

100                    105                    110

Ala Ala Thr Phe Gly Ala Ala Tyr Ile Val Met Leu Leu Ala Met Tyr

115                    120                    125

Phe Asn Gly Tyr Ile Ile Cys Ile Ile Val Gly Ser Gly Val Gly

130                    135                    140

Lys Phe Ala Cys His Trp Leu Ser Val Glu Ile Asp Leu Gln Pro Gly

145                    150                    155                    160

Glu Gly Glu Arg Leu Leu Pro Lys Pro Ile Leu Gln Thr Thr Ile Cys

165 170 175

Cys Asp

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> T. reesei

<400> 13

Met Leu Trp Asn Trp Asn Val Met Asn Thr Cys Phe Ile Ser Lys His

1 5 10 15

Trp Gln Ile Thr Ser Lys Gly Met Phe Ala Gly Ser Cys Ile Gly Val

20 25 30

Ile Leu Leu Val Ile Ala Leu Glu Phe Leu Arg Arg Leu Ser Lys Glu

35 40 45

Tyr Asp Arg Phe Leu Ile Lys Gln His Ala Ala Pro Arg Ala Val Pro

50 55 60

Ala Phe Arg Pro Ser Val Leu Gln Gln Ala Leu Arg Ala Leu Leu His

65 70 75 80

Val Ala Gln Phe Ser Val Ala Tyr Ile Val Met Leu Leu Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Asn Gly Tyr Phe Ile Ile Cys Ile Phe Ile Gly Ala Tyr Ile Gly

100 105 110

Ser Phe Val Phe His Trp Glu Pro Leu Thr Ala Gly

115 120

<210> 14

<211> 159

<212> PRT

<213> T. reesei

<400> 14

Met Asp His Ser His His Met His Ala Met Glu Gly His Glu Gly His

1 5 10 15

Gly Gly His Gly Gly Met Gln Asp Met Cys Ser Met Asn Met Leu

20	25	30
Phe Thr Trp Asp Thr Thr Asn Leu Cys Ile Val Phe Arg Gln Trp His		
35	40	45
Val Arg Ser Thr Ala Ser Leu Ile Phe Ser Leu Ile Ala Val Val Leu		
50	55	60
Leu Gly Ile Gly Tyr Glu Ala Leu Arg Ser Val Ser Arg Arg Tyr Glu		
65	70	75
Ala Ser Leu Ala Thr Arg Leu Glu Thr Val Pro Arg Gln Asn Arg Glu		
85	90	95
Thr Val Ser Lys Arg Gly His Val Ile Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Ile		
100	105	110
Gln Asn Phe Tyr Ala Phe Met Leu Met Leu Val Phe Met Thr Tyr Asn		
115	120	125
Gly Trp Val Met Val Ala Val Ser Leu Gly Ala Phe Val Gly Tyr Leu		
130	135	140
Leu Phe Gly His Ser Thr Ser Ala Thr Lys Asp Asn Ala Cys His		
145	150	155
<210> 15		
<211> 172		
<212> PRT		
<213> T. reesei		
<400> 15		
Met Thr Met Leu Met Ala Met Val Phe Gln Thr Asp Ile Arg Thr Pro		
1	5	10
Leu Tyr Ala Asn Ser Trp Thr Pro His His Ala Gly Ala Tyr Ala Gly		
20	25	30
Thr Cys Ile Phe Leu Ile Ala Leu Ala Val Ile Ala Arg Leu Leu Val		
35	40	45
Ala Phe Arg Ala Arg Gln Glu Arg Ile Trp Ala Asp His Asp Ala Arg		
50	55	60
Arg Arg Tyr Val Val Val Asn Gly Lys Glu Pro Val Ala Glu Arg Leu		

65                    70                    75                    80

Ser Arg Asp Ser Asp Ala Lys Ser Ala Thr Met Val Ile Ser Glu Asn

85                    90                    95

Gly Val Glu Glu Arg Val Val Val Glu Lys Lys Asp Gly Ala Thr

100                    105                    110

Arg Pro Trp Arg Phe Ser Val Asp Pro Val Arg Ala Ala Met Asp Thr

115                    120                    125

Val Ile Val Gly Val Gly Tyr Leu Leu Met Leu Ala Val Met Thr Met

130                    135                    140

Asn Val Gly Tyr Phe Met Ser Val Leu Gly Gly Thr Phe Leu Gly Ser

145                    150                    155                    160

Leu Leu Val Gly Arg Tyr Ser Glu Val Tyr His His

165                    170