



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0034969
(43) 공개일자 2022년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/75 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12P 13/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/75 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0116803

(22) 출원일자 2020년09월11일

심사청구일자 2020년09월11일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

오민규

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호

이준민

서울특별시 성북구 안암로9가길 9-27, 204호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 15 항

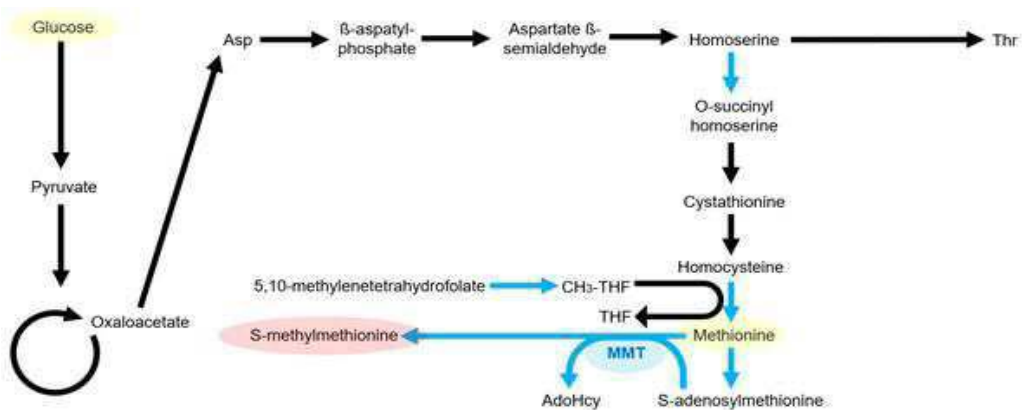
(54) 발명의 명칭 S-메틸메티오닌 생산용 재조합 미생물 및 이를 이용한 S-메틸메티오닌의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자가 과발현되어, S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용한 SMM 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 종래 식물 추출 또는 화학적 합성법과 달리 미생물 생합성을 통해 S-메틸메티오닌을 우수한 수율로 생성할 수 있는바, S-메틸메티오닌 생산의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/76 (2013.01)
C12N 15/81 (2013.01)
C12N 9/0028 (2013.01)
C12N 9/1007 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
C12N 9/1085 (2013.01)
C12Y 105/0102 (2013.01)
C12Y 201/01012 (2013.01)
C12Y 205/01006 (2013.01)

박민호

서울특별시 동대문구 안암로14길 15

(72) 발명자

박부수

경기도 하남시 위례중안로 215, 6045동 903호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105405
과제번호	NRF-2018M3A9F3079662
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미생물 제어 및 응용 원천기술개발
연구과제명	방선균 시스템 재설계 기반 고부가 의약품 질 고생산 산업균주 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105759
과제번호	NRF-2012M1A2A2026560
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응 기초원천기술개발과제
연구과제명	대사플렉스 측정기술 기반 바이오화학소재 생산균주 개발 시스템 구축
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자가 과발현되어, S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖는 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 S-메틸메티오닌은 S-메틸-L-메티오닌(S-Methyl-L-methionine)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 MMT를 코딩하는 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 3 중 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 MMT를 코딩하는 유전자는 애기장대(Arabidopsis thaliana), 보리(Barley), 해바라기(Sunflower)로부터 유래된 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 MMT를 코딩하는 유전자에 대응하는 아미노산 서열은 서열번호 1에 대응하는 아미노산 서열인 서열번호 47의 아미노산 서열과 60% 이상의 서열상동성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 MMT를 코딩하는 유전자는 포도(Vitis vinifera), 코요테 담배(Nicotiana attenuata), 뽕장대(Arabidopsis lyrata), 옥수수(Zea mays), 툴립(Anthurium amnicola)으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서,

메티오닌 생합성 경로의 억제인자를 코딩하는 metJ(methionine repressor) 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서,

mmuP(transport of S-methylmethionine)유전자 및 mmuM(Homocysteine S-methyltransferase) 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제1항에 있어서,

S-아데노실메티오닌 합성효소를 코딩하는 metK(S-adenosylmethionine synthetase) 유전자 및 5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase)를 코딩하는 metF 유전자가 추가로 과발현되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

제1항에 있어서,

호모세린 O-숙시닐트랜스퍼라아제(Homoserine O-succinyltransferase)를 코딩하는 metA 유전자를 변이시킨 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 metA의 변이 유전자는 상기 metA 유전자의 염기서열에서, 190번째 염기인 시토신이 구아닌으로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 metA의 변이 유전자는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물은 대장균 (*Escherichia coli*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 스트렙토미세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 14

(a) 제1항의 재조합 미생물을 배양하여 S-메틸메티오닌을 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 생성된 S-메틸메티오닌을 수득하는 단계;를 포함하는 S-메틸메티오닌의 제조방법

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 (a) 단계의 배양은 수크로스, 락토스, 말토스, 트레할로스, 투라노스, 셀로비오스, 라피노스, 멜레치토스, 말로트리오스, 아카보스, 스타키오스, 글루코스, 아밀로스, 셀룰로스, 프럭토스, 아노스, 또는 갈락토스로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 탄소원으로 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자가 과발현되어, S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용한 SMM 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 발효 조건 최적화와 미생물 대사회로 조작은 미생물 발효를 통한 특정 대사산물 생산성 향상을 위해 주로 수행되며, 그 중에서도 대사공학적인 관점에서 미생물의 대사 경로와 역할을 이해하고 목표하는 대사산물의 향상을 위하여 유전자를 과발현시키고, 미생물 계능 상의 특정 유전자를 제거하는 방법은 대사공학 분야에서 가장 근본적인 접근이라 할 수 있다. 또한, 목적산물의 생산능을 향상시키기 위해 생산에 직접적 또는 간접적으로 관련

된 유전자를 플라스미드를 기반으로 클로닝하여 과발현시켜 목적산물로의 대사회로를 활성화시키는 연구가 진행되어 왔다.

[0003] 한편, S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM)는 비타민 U로 알려진 물질로서, 양배추, 브로콜리, 당근, 김 등에 풍부하게 존재하며, 항염증작용, 혈중 지질의 개선 효과, 항우울 효과, 세포막 손상억제기능 등 다양한 생리학적 기능을 갖는 것으로 알려지면서, SMM에 대한 관심이 증가하고 있다.

[0004] 그러나 현재 생산되고 있는 SMM은 양배추, 당근 등 SMM이 다량 함유된 식물로부터 추출하거나 화학적 합성을 통해 만들어지고 있을 뿐, 미생물 발효를 통한 SMM의 생산에 대해서는 보고된 바 없다.

[0005] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 미생물 발효를 통한 SMM의 생산 방법에 대하여 예의 연구하던 중, 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자를 도입 및 과발현시킬 경우, 높은 수율로 SMM을 생성시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖도록 대사공학적으로 설계된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 이용한 S-메틸메티오닌의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자가 과발현되어, S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖는 재조합 미생물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, (a) 상기 S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖는 재조합 미생물을 배양하여 S-메틸메티오닌을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 S-메틸메티오닌을 수득하는 단계;를 포함하는 S-메틸메티오닌의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 종래 식물 추출 또는 화학적 합성법과 달리 미생물 생합성을 통해 S-메틸메티오닌을 우수한 수율로 생성할 수 있는바, S-메틸메티오닌 생산의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명에 따라 해당 과정 및 SAM 생합성 경로 과정을 갖는 대장균에서 MMT 유전자를 도입하여 SMM을 생합성하는 경로를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1에 따른 재조합 미생물(대장균)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(Δ metJ, dJMP: Δ metJ, Δ mmuP, Δ mmuM, aK: pZA(metK), aKF: pZA(metK, metF), cM: pCDFDuet(A.MMT), sA*: pZS(metA* fbr), cBM: pCDFDuet(B.MMT), csfM: pCDFDuet(Sf.MMT)).

도 3은 본 발명의 실시예 1에 따른 재조합 미생물(대장균)의, 다양한 MMT 유전자 유래별 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(*Arabidopsis thaliana*(dJMP+aKcMsA*), *Barley*(dJMP+aKcBMsA*), *Sunflower*(dJMP+aKcsfMsA*)).

도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 재조합 미생물(사카로마이세스 세레비지에)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(Y1: BY4742 + pSH47(MMT::URA).Y2: K6-1 + p425(MMT::Leu))

도 5는 본 발명의 실시예 3에 따른 재조합 미생물(바실러스 서브틸리스)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(BS+M(wtBacillus + pBE-S(MMT)), BS+MK(wtBacillus + pBE-S(metK, MMT))

도 6은 본 발명의 실시예 4에 따른 재조합 미생물(스트렙토마이세스 베네수엘라)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 다양한 유래의 MMT 유전자 서열에 대한 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 진행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 본 발명에서는 종래 식물 추출 또는 화학적 합성법과 달리 미생물 생합성을 통해 S-메틸메티오닌을 우수한 수율로 생성할 수 있는 재조합 미생물을 제조하였으며, 상기 제조된 재조합 미생물은 우수한 S-메틸메티오닌 수율 및 생산성을 나타낸다.
- [0015] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자가 과발현되어, S-메틸메티오닌(S-Methylmethionine, SMM) 생성능을 갖는 재조합 미생물에 관한 것이다(도 1).
- [0016] 본 발명의 일 양태에서는 상기 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물로 대장균(*Escherichia coli*) 또는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하였으며, SAM으로부터 메틸기를 전달받아 메티오닌으로부터 S-메틸메티오닌을 생성하도록 하기 위하여, 메티오닌 S-메틸메티오닌 트랜스퍼라제(methionine S-methylmethionine transferase, MMT)를 코딩하는 유전자를 도입 및 과발현시켰다.
- [0017] 본 발명에 따르면, 상기 S-메틸메티오닌은 S-메틸-L-메티오닌(S-Methyl-L-methionine)일 수 있다.
- [0018] 이때, 상기 MMT를 코딩하는 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 3 중 어느 하나로 표시될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이때, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3의 유전자는 각각 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 보리(*Barley*), 해바라기(*Sunflower*)로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 MMT를 코딩하는 유전자는, 상기 MMT를 코딩하는 유전자에 대응하는 아미노산 서열이 서열번호 1에 대응하는 아미노산 서열인 서열번호 47의 아미노산 서열과 60% 이상의 서열상동성을 갖는 것이면 모두 가능할 수 있으며, 예를 들어 상기 MMT를 코딩하는 유전자는 포도(학명: *Vitis vinifera*), 코요테 담배(학명: *Nicotiana attenuata*), 뫇장대(학명: *Arabidopsis lyrata*), 옥수수(학명: *Zea mays*), 튜립(학명: *Anthurium amnicola*)으로부터 유래된 것일 수 있으며, 이들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 50 내지 54로 표시되는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명에서는 SMM 생성능 향상을 위해, wild type의 대장균에 존재하는 메티오닌 생합성 경로의 억제인자를 코딩하는 metJ(methionine repressor) 유전자를 추가로 결실시켰다.
- [0021] 또한, 본 발명에서는 SMM 생성능 향상을 위해, SMM을 uptake 하도록 하는 유전자인 mmuP(transport of S-methylmethionine) 유전자 및 SMM으로부터 메티오닌을 합성하는 역할을 하는 유전자인 mmuM(Homocysteine S-methyltransferase) 유전자를 추가로 결실시켰다.
- [0022] 또한, 본 발명에서는 SMM 생성능 향상을 위해, SMM 생성 시 메티오닌에 메틸기를 전달하는 SAM을 생성하는 유전자인 S-아데노실메티오닌 합성효소를 코딩하는 metK(S-adenosylmethionine synthetase) 유전자, SMM의 전구체인 메티오닌 생성에 도움을 주는 5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase)를 코딩하는 metF 유전자를 추가로 과발현시켰다.
- [0023] 또한, 본 발명에서는 SMM 생성능 향상을 위해, 메티오닌 생합성에 관여하는 호모세린 O-숙시닐트랜스퍼라아제(Homoserine O-succinyltransferase)를 코딩하는 metA 유전자를 변이시켰다. 이때, 상기 metA의 변이 유전자는 상기 metA 유전자의 염기서열에서, 190번째 염기인 시토신이 구아닌으로 치환된 것으로서, 서열번호 4로 표시되는 것일 수 있다.

- [0024] 또한, 상기 미생물은 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물이거나 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 대장균(*Escherichia coli*), 효모, 고초균, 또는 방선균일 수 있으며, 이때, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 상기 방선균은 스트렙토미세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)일 수 있다.
- [0025] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 S-메틸메티오닌을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 S-메틸메티오닌을 수득하는 단계;를 포함하는 S-메틸메티오닌의 제조방법에 관한 것이다.
- [0026] 이때, 상기 재조합 미생물을 배양하는 방법은 당업계에서 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 상기 재조합 미생물로부터 SMM을 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [0027] 배양에 사용되는 배지는 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유할 수 있으며, 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다.
- [0028] 이때, 사용될 수 있는 탄소원은 수크로스, 락토스, 말토스, 트레할로스, 투라노스, 셀로비오스, 라피노스, 멜레치토스, 말로트리오스, 아카보스, 스타키오스, 글루코스, 아밀로스, 셀룰로스, 프럭토스, 아노스, 또는 갈락토스로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산 암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산 망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [0029] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0031] [실시예]
- [0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0034] **실험 방법**
- [0035] 균주, 배지 및 배양
- [0036] 본 발명에서는 대장균으로 MG1655 K-12 균주, 효모로는 *S. cerevisiae* K6-1을 사용하였다. 세포를 기하 급수적으로 성장시키기 위해 30%(v/v) 글리세롤을 첨가하여 *E.coli* 및 *S.cerevisiae*의 냉동 스톱을 제조하였다. 대장균의 경우 두 가지 다른 배지를 사용하여 세포를 배양하였다. 대장균 세포 성장에는 LB (Luria-Bertani) 배지를 사용하였다. 최소 배지로 M9 배지를 사용하였으며, M9의 조성은 다음과 같다: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6g), KH_2PO_4 (3g), NaCl (0.5g), NH_4Cl (1g), 1M MgSO_4 2mL, 1M CaCl_2 10uL 및 50g/L glucose(40mL) in 1L bottle. 효모 배양은 YPD 배지 및 SD 배지를 사용하였다. 최소 배지인 SD 배지는 L-루신 없이, 효모 질소 염기 w/o 아미노산 (6.7g), H_2O (865mL), AA-Mix 10x 농축물 (10mL)을 사용하여 제조하였다. 대장균 배양물은 각각의 필요한 항생제(카나마이신, 클로람페니콜, 스펙티노마이신 (25mg/mL))로 성장시켰다. 한천 플레이트는 20g / L 한천으로 제조하였다.

[0038] 플라스미드 및 균주 구성

[0039] *E. coli* DH5a를 모든 플라스미드 클로닝 및 증식에 사용 하였다. 사용 된 모든 플라스미드는 Gibson Assembly (New England BioLab.)를 사용하여 구축되었다. 사용된 유전자는 *E. coli* MG1655 K-12 (*metF*, *metH*, *metA*) 및 *Arabidopsis thaliana* (MMT), Sunflower (MMT), Barley (MMT)에서 유래되었다. MMT 유전자는 모두 pCDFDuet 벡터에 통합되었다. 효모 (K6-1)의 경우 양방향 프로모터가 있는 pESC 벡터를 사용하였다. 과발현의 성공적인 케놈 통합은 Bionics 사의 진단 PCR에 의해 확인하였다.

[0041] 배양 및 분석

[0042] 대장균 세포를 30 °C에서 진탕시키면서 37 °C에서 배양하였다. 먼저, 원추형 튜브에서, 재조합 미생물에 1일 동안 필요한 항생제를 5mL LB에 접종하였다. 그리고 나서, 24시간 동안 각각 항생제가 필요한 배지에서 적응시키기 위해 M9 배지 (최소 배지) 5mL로 옮겼다. 다음으로, 배양을 위해 배플링되지 않은 플라스크에서 초기 OD (0.125)로, 25mL M9 배지에서 종자를 스케일업 하였다. 대장균을 48시간 동안 최대 OD (4.2)로 배양하였다.

[0043] *S. cerevisiae* K6(Sake yeast kyokai No.6) 세포를 30rpm에서 진탕하면서 30 °C에서 배양하였다. 효모 세포 (pESC 벡터 (MMT, SAM2)를 갖는 *S.cerevisiae* K6-1)를 36시간 동안 추가 아미노산없이 5mL YPD에 먼저 접종한 후, 그 배지에 적응시키기 위해 SD 배지 (최소 배지) 5mL로 옮겼다. 다음으로, 배양을 위해 배플링된 플라스크에서 초기 OD (0.125)로, 25mL SD 배지에서 종자를 스케일업 하였다. pESC 벡터 (MMT, SAM2)를 갖는 효모 (*S. cerevisiae* K6-1)를 72시간 동안 최대 OD (5.0)로 배양하였다.

[0044] S- 메틸메티오닌 및 L-메티오닌은 UV 분광 분석법을 사용한 고성능 액체 크로마토그래피를 통해 측정하였다. 분석에는 2가지 이동상이 사용되었다(1: Sodium phosphate di-basic 8.51g with 3mL phosphoric acid in 3L DW, 2: Acetonitrile(45), Methanol(45), DW(10) in 3L bottle). 또한, Agilent의 아미노산 분석 컬럼을 모든 샘플에 사용하였으며, 아미노산 유도체화에 OPA 시약 (Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

[0046] 실시예 1. 재조합 대장균 제조

[0047] 해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물로 대장균 (*Escherichia coli* K-12 MG1655)을 사용하였으며, 유전자 조작 등에 따른 균주 또는 플라스미드 명은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0048]

Strains or plasmids	Description	source
Strains		
dJ	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 $\Delta metJ$	This study
dJMP	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 $\Delta metJ$, $\Delta mmuM$, $\Delta mmuP$	This study
Plasmids		
pRedET	λ phage red γ , β , α -producing vector, pBAD_promoter; ori101 Tetr	Gene Bridges
707-FLP	Flp recombinase-producing vector; Psc101 ori c11578 Tetr	Gene Bridges
pKD4	FRT-flanked resistance cassette-involved vector; oriR γ Kmr	Datsenko KA and Wanner BL, 2000
aK	pZA(<i>metK</i>)	This study
aKF	pZA(<i>metK</i> , <i>metF</i>)	This study
cM	pCDFDuet (MMT)	This study
cBM	pCDFDuet (Barley MMT)	This study
csfM	pCDFDuet (Sunflower MMT)	This study
sA*	pZS(<i>metA</i> *)	This study

sA*H	pZS(metA*, metH)	This study
------	------------------	------------

[0050] metJ 결실

[0051] wild type *E. coli* K-12 MG1655의 metJ 유전자를 제거하기 위해 람다 레드(Lambda red) 재조합 방법을 사용했다. 우선 세포 내부로 유입된 선형 유전자의 분해를 방지하고 상동 재조합(homologous recombination)의 효율을 높이기 위한 효소의 발현 벡터를 컴피턴트 세포로 준비된 wild type *E. coli* K-12 MG1655 균주에 도입시켰다. BAD 프로모터를 가지고 테트라사이클린 저항성이 있는 pRedET 벡터를 본 발명에 사용하였고, 형질전환을 확인하였다. 다음으로 상동 재조합을 위한 선형 유전자를 제작하였다. FRT-kanamycin-FRT cassette을 가지는 pKD4 벡터를 주형으로 사용하였다. 상동 재조합이 발생하는 위치인 wild type *E. coli* K-12 MG1655의 metJ 유전자 양옆의 homologous한 50개의 염기쌍과 주형으로 쓰는 pKD4의 FRT-kanamycin-FRT cassette을 중합하기 위한 20개의 염기쌍, 총 70개의 염기쌍을 프라이머로 제작하였고 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 metJ 유전자를 제거하기 위한 선형 유전자를 제작하였다. 카나마이신은 상동재조합이 성공적으로 이루어졌는지 확인하기 위한 selection marker로 활용이 되고, FRT 부위는 목표 유전자가 제거된 후 다른 유전자의 제거를 위해 selection marker를 제거해 주는 역할을 한다. 다음 단계로 pRedET 벡터가 형질전환 된 것이 확인된 MG1655+pRedET 균주를 30℃에서 배양하였다. pRedET 벡터는 온도에 민감한 벡터로써 37℃ 이상이 되면 그 활성을 잃기 때문에 30℃에서 배양하였다. 또한 배양 1시간 후 OD600이 0.3 정도 되었을 때 10%의 아라비노스(L-arabinose)로 pRedET의 레드 람다 재조합 효소 발현 유도를 시켜주었다. 1시간 더 배양시켜 OD600이 0.6정도가 되었을 때 전기천공법을 위한 컴피턴트 세포로 만든 후 제작한 선형유전자를 형질전환 하였다. LB 배지에 37℃에서 1시간 배양 후 카나마이신이 12.5 mg/ml 첨가된 LB 고체배지에 스프레딩하고 12시간 배양시켰다. 상동재조합의 성공 여부를 확인하기 위해 2가지의 프라이머를 제작하였다. metJ 유전자 양옆의 상동한 20-24개의 염기쌍을 del metJ conf F와 del metJ conf R로(표 2) 명칭하였다. 이 2가지 프라이머를 사용하여 콜로니 PCR 을 수행하였을 때 PCR 생산물의 길이를 통해 상동 재조합의 여부를 확인하였다.

[0053] mmuM, mmuP 결실

[0054] dJ 균주의 mmuM, mmuP 유전자를 제거하기 위해 람다 레드(Lambda red) 재조합 방법을 사용했다. 우선 세포 내부로 유입된 선형 유전자의 분해를 방지하고 상동재조합(homologous recombination)의 효율을 높이기 위한 효소의 발현 벡터를 컴피턴트 세포로 준비된 dJ 균주에 도입시켰다. BAD 프로모터를 가지고 테트라사이클린 저항성이 있는 pRedET 벡터를 본 발명에 사용하였고, 형질전환을 확인하였다. 다음으로 상동재조합을 위한 선형 유전자를 제작하였다. FRT-kanamycin-FRT cassette을 가지는 pKD4 벡터를 주형으로 사용하였다. 상동재조합이 발생하는 위치인 wild type *E. coli* K-12 MG1655의 metJ 유전자 양 옆의 homologous한 50개의 염기쌍과 주형으로 쓰는 pKD4의 FRT-kanamycin-FRT cassette을 중합하기 위한 20개의 염기쌍, 총 70개의 염기쌍을 프라이머로 제작하였고 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 metJ 유전자를 제거하기 위한 선형 유전자를 제작하였다. 카나마이신은 상동재조합이 성공적으로 이루어졌는지 확인하기 위한 selection marker로 활용이 되고, FRT 부위는 목표 유전자가 제거된 후 다른 유전자의 제거를 위해 selection marker를 제거해 주는 역할을 한다. 다음 단계로 pRedET 벡터가 형질전환 된 것이 확인된 dJ+pRedET 균주를 30℃에서 배양하였다. pRedET 벡터는 온도에 민감한 벡터로써 37℃ 이상이 되면 그 활성을 잃기 때문에 30℃에서 배양하였다. 또한 배양 1시간 후 OD600이 0.3 정도 되었을 때 10%의 아라비노스(L-arabinose)로 pRedET의 레드 람다 재조합 효소 발현 유도를 시켜주었다. 1시간 더 배양시켜 OD600이 0.6정도가 되었을 때 전기천공법을 위한 컴피턴트 세포로 만든 후 제작한 선형유전자를 형질전환 하였다. LB 배지에 37℃에서 1시간 배양 후 카나마이신이 12.5 mg/ml 첨가된 LB 고체 배지에 스프레딩하고 12시간 배양시켰다. 상동재조합의 성공 여부를 확인하기 위해 2가지의 프라이머를 제작하였다. metJ 유전자 양옆의 상동한 20-24개의 염기쌍을 del mmuMP conf F와 del mmuMP conf R로(표 2) 명칭하였다. 이 2가지 프라이머를 사용하여 콜로니 PCR 을 수행하였을 때 PCR 생산물의 길이를 통해 상동재조합의 여부를 확인하였다.

[0056] 유전자 과발현

[0057] 본 발명에 따른 유전자 과발현에 사용된 모든 vector들은 gibson assembly를 통해 제조하였다. S-

adenosylmethionine을 많이 만들어주는 metK 유전자를 과발현하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 2에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pZA(metK) 벡터를 제작하였다.

[0058] S-methylmethionine을 만들어주도록 해주는 유전자인 MMT 유전자를 과발현 하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 2에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pCDFDuet(MMT) 벡터를 제작하였다.

[0059] E.coli 내에 methionine biosynthesis pathway에서 O-succinyl homoserine을 합성하는 유전자인 metA의 변이 유전자(서열번호 4)를 과발현하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 2에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pZS(metA*) 벡터를 제작하였다.

[0060] SMM 생성 시 메티오닌에 메틸기를 전달하는 SAM을 생성하는 유전자 metK와, E.coli 내에 tetrahydrofolate cycle의 활성을 높여주는 유전자인 metF를 과발현 하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 2에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pZA(metK, metF) 벡터를 제작하였다.

[0061] 위와 같이 제작된 벡터들을 이용하여 형질 전환(Transformation)을 통해 본 발명에 따른 재조합 대장균을 제조하였다. 형질 전환은 당업계에 일반적으로 알려진 방법에 따라 수행하였으며, 간략히, 형질 전환 대상 균주를 5mL falcon tube에 배양을 하고 24시간 후 원심분리기를 이용하여 cell down을 수행한 후, 2번 세척하고, glycerol 10%의 용액으로 세포를 풀어준 뒤, 제작된 벡터들을 넣어준 후 1950V의 전기를 가해주는 방식으로 수행하였다.

표 2

[0062]

Primer name	Sequence(5' -3')	Source	서열번호
metK cut primer F	TTACATATAATTAGAGGAAGAAAAATGGCAAA ACACCTTTTACGTC	This study	서열번호 5
metK cut primer R	TACTTCAGACCGGCAGCAT	This study	서열번호 6
pZA_metK_fwd	TCTGAAGTAAATATCGAATTCTGCAGC	This study	서열번호 7
pZA_metK_rev	TTATATGTAACAAGCTTATCGATACCGTC	This study	서열번호 8
metK gib F	GATAAGCTTGTTCATATAATTAGAGGAAGAAA AAATGGC	This study	서열번호 9
metK gib R	AATTCGATATTTACTTCAGACCGGCAGC	This study	서열번호 10
MMT F	ATGGCTGACCTGTCTAGCGT	This study	서열번호 11
MMT R	TTAGTTAGCCAGAACGCTTT	This study	서열번호 12
pCDFDuet_MMT_F	TTCTAACTGAGGGCCGCTCGACTAGCTT	This study	서열번호 13
pCDFDuet_MMT_R	CAGCGGCCATGGGTGTAGCTCCTCCTATTGT TG	This study	서열번호 14
MMT gib F	AGCTACACCATGGCCGCTGCGGGGGT	This study	서열번호 15
MMT gib R	CGACGGGCCCTCAGTTAGAACCGTTAACTTTAG CGCCACCACC	This study	서열번호 16
metF cut primer F	ATGAGCTTTTTCACGCCAG	This study	서열번호 17
metF cut primer R	TTATAAACCAGGTGCAACCC	This study	서열번호 18
pZA_metK_metF_gib F	TGGTTTATAAATATCGAATTCTGCAGCC	This study	서열번호 19
pZA_metK_metF_gib R	AAAAGCTCATTTACTTCAGACCGGCAGC	This study	서열번호 20
metF gib F	TCTGAAGTAAATAGCTTTTTCACGCC	This study	서열번호 21
metF gib R	AATTCGATATTTATAAACCAGGTGCAACC	This study	서열번호 22
del metJ conf F	ATTTATTGACGAAGAGGATTAAGTATCTC	This study	서열번호 23
del metJ conf R	AGCAAAAAAGAGCGGCGGAGTGGAATCG	This study	서열번호 24
del mmuMP conf F	AACCTTCTTTGGATGTTTAGATGTCCA	This study	서열번호 25
del mmuMP conf R	GGGTTTATCGGGTCTACATCGTTTCATTG	This study	서열번호 26

[0064]

실시예 2. 재조합 효모 제조

[0065]

해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물로 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) (BY4742, Sake koykai No.6)를 사용하였으며, 유전자 조작 등에 따른 균주 또는 플라스미드 명은 하기 표 3에 나타내었다. 또한, 본 발명에 따른 유전자 과발현에 사용된 모든 vector들은 gibbon assembly를 통해 제조하였다. S-methylmethionine을 만들어주는 유전자를 발현하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 4에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 p425(MMT), pSH47(MMT)를 제작하였다. 이후, 상기 실시예 1에서 설명한 MMT 유전자 과발현 방법과 동일한 방법을 통해 MMT 유전자가 과발현된 재조합 효모를 제조하였다.

표 3

[0066]

Strains and plasmids	Description	source
Strains		
BY4742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Δ His, Δ Leu, Δ Lys, Δ Ura	This study
K6-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sake K6 Δ Leu	This study
Plasmid		
pSH47	pSH47(MMT)	This study
p425	p425(MMT)	This study

표 4

[0067]

Primer name	Sequence(5' -3')	Source	서열번호
MMT rbs F	GAGAATTTTATAAGGAGTCTTTATCATGGCTGACCTGTCTAGCGT	This study	서열번호27
MMT rbs R	TTAGTTAGCCAGAACGCTTTTGAACCTGC	This study	서열번호28
p425 MMT gib F	GCTGCAGGAATTCGATATCAGAGAATTTTATAAGGAGTCTTTATCATG	This study	서열번호29
p425 MMT gib R	CGAGGTCGACGGTATCGATATTAGTTAGCCAGAACGCTTTTG	This study	서열번호30
psh47_fwd	GGCTAACTAATCATATGTCACCATAAATATCAAATAATTA TAG	This study	서열번호31
psh47_rev	TTGATAATGAGAAAGGATTTCAACATCGAC	This study	서열번호32
mnt with promoter_fwd	AAATCCTTTCTCATTATCAATACTGCCATTTCAG	This study	서열번호33
mnt with promoter_rev	TGACATATGATTAGTTAGCCAGAACGCTTTTG	This study	서열번호34

[0069]

실시예 3. 재조합 고초균 제조

[0070]

해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물로 고초균(*Bacillus subtilis* ATCC6633)를 사용하였으며, 유전자 조작 등에 따른 균주 또는 플라스미드 명은 하기 표 5에 나타내었다. 또한, 본 발명에 따른 유전자 과발현에 사용된 모든 vector들은 gibbon assembly를 통해 제조하였다. metK 유전자를 과발현하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 6에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pBE-S(metK) 벡터를 제작하였다. MMT 유전자를 과발현 하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 6에 나타내었다. 이렇게 해당 프라이머를 사용하여 cloning을 해주고 그 후 gibbon primer에 맞게 재 클로닝을 해준 후 각각의 fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pBE-S(MMT, metK) 벡터를 제작하였다.

[0071]

이후, 상기 실시예 1에서 설명한 MMT 유전자 과발현, metK 유전자 과발현 방법과 동일한 방법을 통해 MMT 유전자 및 metK 유전자가 과발현된 재조합 고초균을 제조하였다.

표 5

Strains and plasmids	Description	source
Strains		
BS	wild type <i>Bacillus subtilis</i>	This study
Plasmid		
pBE-S(M)	pBE-S(MMT)	This study
pBE-S(K,M)	pBE-S(metK, MMT)	This study

표 6

Primer name	Sequence(5' -3')	Source	서열번호
pBE-S_fwd	ggctaactaagggatccgaattcaagcttgtc	This study	서열번호35
pBE-S_rev	ttatatgtaatcgagggtaccgagctcc	This study	서열번호36
pBE-S metK gib_fwd	gtacctcgattacatataattaggaagaa aaaatggc	This study	서열번호37
pBE-S metK gib_rev	ttatttgttgttacttcagaccggcagc	This study	서열번호38
pBE-S MMT gib_fwd	tctgaagtaacaacaaataaggaggagctac	This study	서열번호39
pBE-S MMT gib_rev	ttcgatcccttagttagccagaacgcttttg	This study	서열번호40
pBE-S (MMT in) gib_fwd	ggctaactaagggatccgaattcaagcttgtc	This study	서열번호41
pBE-S (MMT in) gib_rev	ttatttgttgtcgagggtaccgagctcc	This study	서열번호42
MMT gene cut to in pBE-S_fwd	gtacctcgacaacaaataaggaggagctac	This study	서열번호43
MMT gene cut to in pBE-S_rev	ttcgatcccttagttagccagaacgcttttg	This study	서열번호44

실시예 4. 재조합 방선균 제조

해당 과정 및 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물로 방선균 (*Streptomyces venezuelae* ATCC 15439)을 사용하였으며, 유전자 조작 등에 따른 균주 또는 플라스미드 명은 하기 표 7에 나타내었다. 또한, 본 발명에 따른 유전자 과발현에 사용된 모든 vector들은 gibbon assembly를 통해 제조하였다. MMT 유전자를 과발현하기 위해 사용한 프라이머는 아래의 표 8에 나타내었다. 해당 프라이머를 사용하여 MMT gene fragment를 만들고 XbaI과 NdeI으로 자른 backbone vector fragment들을 gibbon assembly를 통해 합쳐 주었다. 이와 같은 방법으로 pSET(M) 벡터를 제작하였다.

이후, 상기 실시예 1에서 설명한 MMT 유전자 과발현 방법과 동일한 방법을 통해 MMT 유전자가 과발현된 재조합 방선균을 제조하였다.

표 7

Strains and plasmids	Description	source
Strains		
SV	wild type <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	This study
Plasmid		
pSET(M)	pSET(MMT)	This study

표 8

Primer name	Sequence(5' -3')	Source	서열번호
MMT-over40bp-F	CAGGAGAATACGACAGCG TGCAGGACTGGGGGAGTG CGCAATGGCTGACCTGTCTAGC	This study	서열번호45
MMT-over40bp-R	CTATGACATGATTACGAATTCGATATCGCGCGCGGCCGCG TTAGTTAGCCAGAACGCTTTTG	This study	서열번호46

[0081] **평가예 1. 재조합 대장균의 SMM 생산량 측정**

[0082] 본 발명의 실시예 1에 따른 재조합 대장균을 10g/L의 glucose가 보충된 M9(minimal media) 배지에서 24시간 동안 배양하였으며, HPLC를 사용하여 SMM 생산량을 측정하였다. 칼럼은 Agilent사의 Amino Acid Analysis 칼럼을 사용하였고, HPLC의 이동상으로는 A: Sodium phosphate diabasic, Phosphoric acid, DW / B : DW, Acetonitrile, Methanol을 사용하였다.

[0083] 도 2는 본 발명의 실시예 1에 따른 재조합 미생물(대장균)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(J : Δ metJ, dJMP : Δ metJ, Δ mmuP, Δ mmuM, aK : pZA(metK), aKF : pZA(metK, metF), cM : pCDFDuet(A.MMT), sA^{*} : pZS(metA^{*}fbr), cBM : pCDFDuet(B.MMT), csfM : pCDFDuet(Sf.MMT)).

[0084] 도 2를 통해 본 발명에 따른 재조합 대장균을 이용할 경우, SMM의 전구체인 메티오닌을 넣어주지 않아도, SMM을 우수한 수율로 생산할 수 있다는 점(dJMP+aKcMsA^{*}과 dJMP+aKFcMsA^{*}에서 각각 0.063g/L 및 0.07g/L 생산)을 확인하였다.

[0086] **평가예 2. 재조합 대장균의, 다양한 MMT 유전자 유래별 SMM 생산량 측정**

[0087] 도 3은 본 발명의 실시예 1에 따른 재조합 미생물(대장균)의, 다양한 MMT 유전자 유래별 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(*Arabidopsis thaliana*(dJMP+aKcMsA^{*}), *Barley*(dJMP+aKcBMsA^{*}), *Sunflower*(dJMP+aKcsfMsA^{*})). 배양 조건 및 SMM 생산량 측정 방법은 상기 평가예 1에서 설명한 것과 동일하다.

[0088] 도 3을 통해 SMM의 전구체인 메티오닌을 넣어주지 않아도 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 보리(*Barley*), 및 해바라기(*Sunflower*)로부터 유래된 MMT 유전자가 도입 및 과발현될 경우 모두 SMM을 우수한 수율로 생산할 수 있다는 점(각각 0.07g/L, 0.039g/L 및 0.024g/L 생산)을 확인하였다.

[0090] **평가예 3. 재조합 효모(사카로마이세스 세레비지에)의 SMM 생산량 측정**

[0091] 본 발명의 실시예 2에 따른 재조합 효모를 10g/L의 glucose 및 0.5g/L의 methionine을 첨가한 SD(minimal media) 배지에서 24시간 동안 배양하였으며, HPLC를 사용하여 SMM 생산량을 측정하였다. 칼럼은 Agilent사의 Amino Acid Analysis 칼럼을 사용하였고, HPLC의 이동상으로는 A: Sodium phosphate diabasic, Phosphoric acid, DW / B : DW, Acetonitrile, Methanol을 사용하였다.

[0092] 도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 재조합 미생물(사카로마이세스 세레비지에)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(Y1: BY4742 + pSH47(MMT ::URA).Y2 : K6-1 + p425(MMT :: Leu))

[0093] 도 4를 통해, 본 발명에 따른 재조합 효모를 이용할 경우에도 SMM을 우수한 수율로 생산할 수 있다는 점(Y1 : 0.043g/L, Y2 : 0.105g/L 생산)을 확인하였다.

[0095] **평가예 4. 재조합 고초균의 SMM 생산량 측정**

[0096] 본 발명의 실시예 3에 따른 재조합 고초균을 10g/L의 glucose 및 0.5g/L의 methionine을 첨가한 LB(rich media) 배지에서 24시간 동안 배양하였으며, HPLC를 사용하여 SMM 생산량을 측정하였다. 칼럼은 Agilent사의 Amino Acid Analysis 칼럼을 사용하였고, HPLC의 이동상으로는 A: Sodium phosphate diabasic, Phosphoric acid, DW / B : DW, Acetonitrile, Methanol을 사용하였다.

[0097] 도 5는 본 발명의 실시예 3에 따른 재조합 미생물(바실러스 서브틸리스)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다(BS+M(wtBacillus + pBE-S(MMT)), BS+MK(wtBacillus + pBE-S(metK, MMT))

[0098] 도 5를 통해, 본 발명에 따른 재조합 고초균을 이용할 경우에도 SMM을 우수한 수율로 생산할 수 있다는 점(BS+M(1.6mg/L), BS+MK(3.2mg/L))을 확인하였다.

[0100] **평가예 5. 재조합 방선균의 SMM 생산량 측정**

[0101] 본 발명의 실시예 4에 따른 재조합 방선균을 0.5g/L의 methionine을 첨가한 GYM 배지에서 96시간 동안 배양하였으며, HPLC를 사용하여 SMM 생산량을 측정하였다. 칼럼은 Agilent사의 Amino Acid Analysis 칼럼을 사용하였고, HPLC의 이동상으로는 A: Sodium phosphate diabasic, Phosphoric acid, DW / B : DW, Acetonitrile, Methanol을 사용하였다.

[0102] 도 6은 본 발명의 실시예 4에 따른 재조합 미생물(스트렙토마이세스 베네수엘라)의 SMM 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0103] 도 6을 통해, 본 발명에 따른 재조합 방선균을 이용할 경우에도 SMM을 우수한 수율로 생산할 수 있다는 점 (4.86mg/L 생산)을 확인하였다.

[0105] **평가예 6. 다중서열정렬(multiple sequence alignment)**

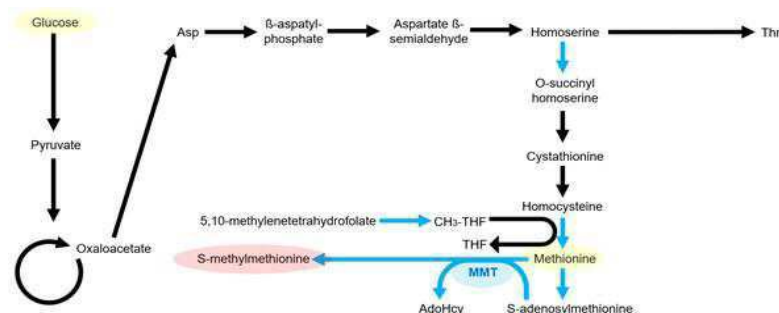
[0106] 다양한 유래(애기장대(Arabidopsis thaliana), 보리(Barley), 해바라기(Sunflower), 포도(Vitis vinifera), 코요테 담배(Nicotiana attenuata), 뿔장대(Arabidopsis lyrata), 옥수수(Zea mays), 툴립(Anthurium amnicola), 난초(Apostasia shenzhenica), 노린재(Lygus hesperus))의 MMT 유전자 서열들을 이에 대응하는 아미노산 서열로(순서대로 각각 서열번호 47 내지 56으로 표시) 바꾸고, ClustalX의 양식에 맞는 FASTA 형식으로 바꿔준 후 ClustalX 프로그램을 사용하여 유사성(similarity)(%)과 동정성(identity)(%)을 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다.

[0107] 상기 다중서열정렬은 ClustalX 프로그램을 통해 진행하였으며, 그 결과, 난초(Apostasia shenzhenica), 노린재(Lygus hesperus)가 보유한 MMT 유전자에 대응하는 아미노산 서열(서열번호 55 및 56)과 달리, 포도(Vitis vinifera), 코요테 담배(Nicotiana attenuata), 뿔장대(Arabidopsis lyrata), 옥수수(Zea mays), 툴립(Anthurium amnicola)으로부터 유래한 MMT 유전자에 대응하는 아미노산 서열(서열번호 50 내지 54)은 애기장대(Arabidopsis thaliana)로부터 유래한 MMT 유전자(서열번호 1)에 대응하는 아미노산 서열(서열번호 47)과 유사성(similarity) 및 동정성(identity)이 60% 이상인 것으로 확인되었으며, 이를 통해 이들로부터 유래한 MMT 유전자 또한 본 발명에 동일하게 적용될 수 있음을 확인하였다.

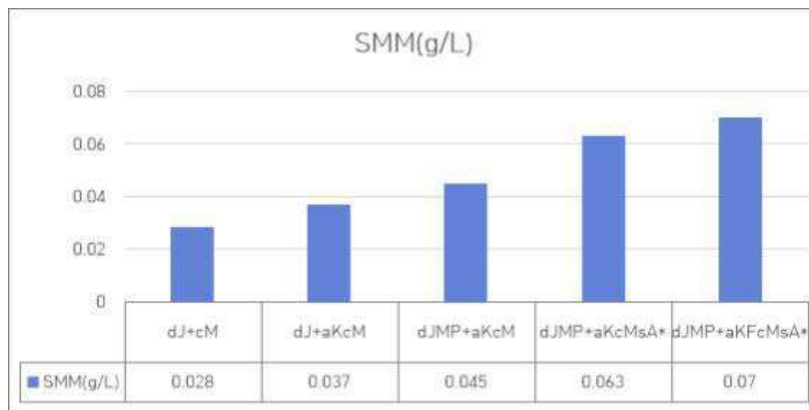
[0109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

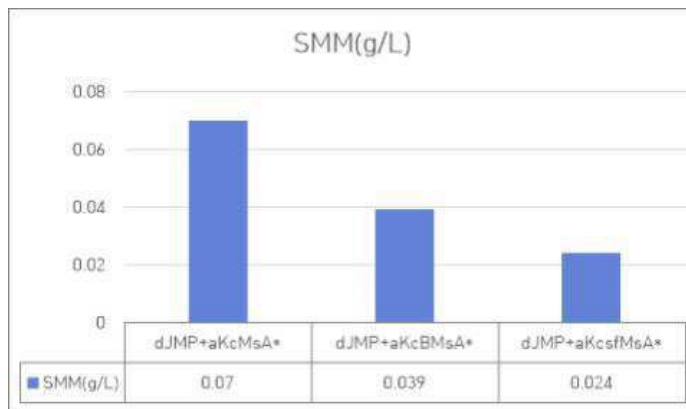
도면1



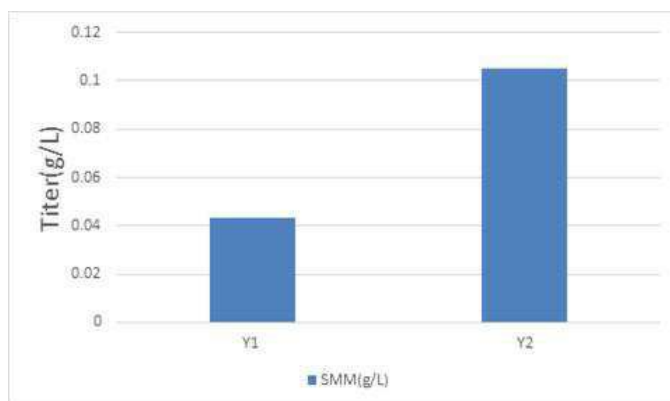
도면2



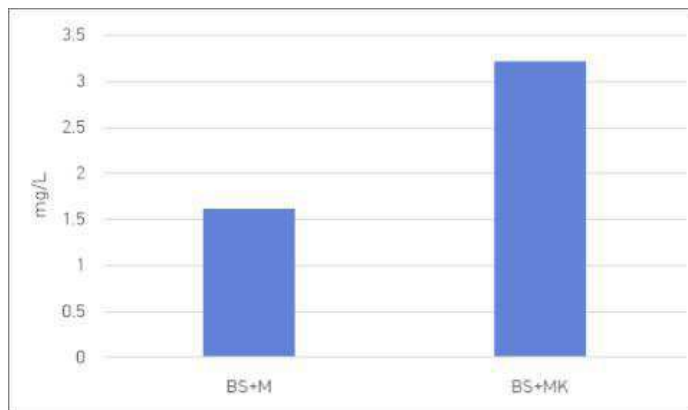
도면3



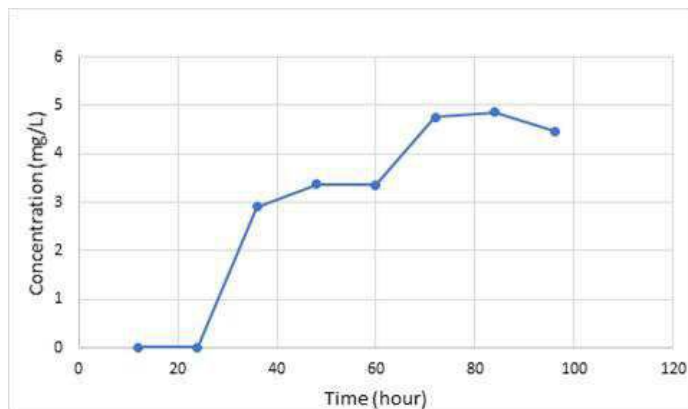
도면4



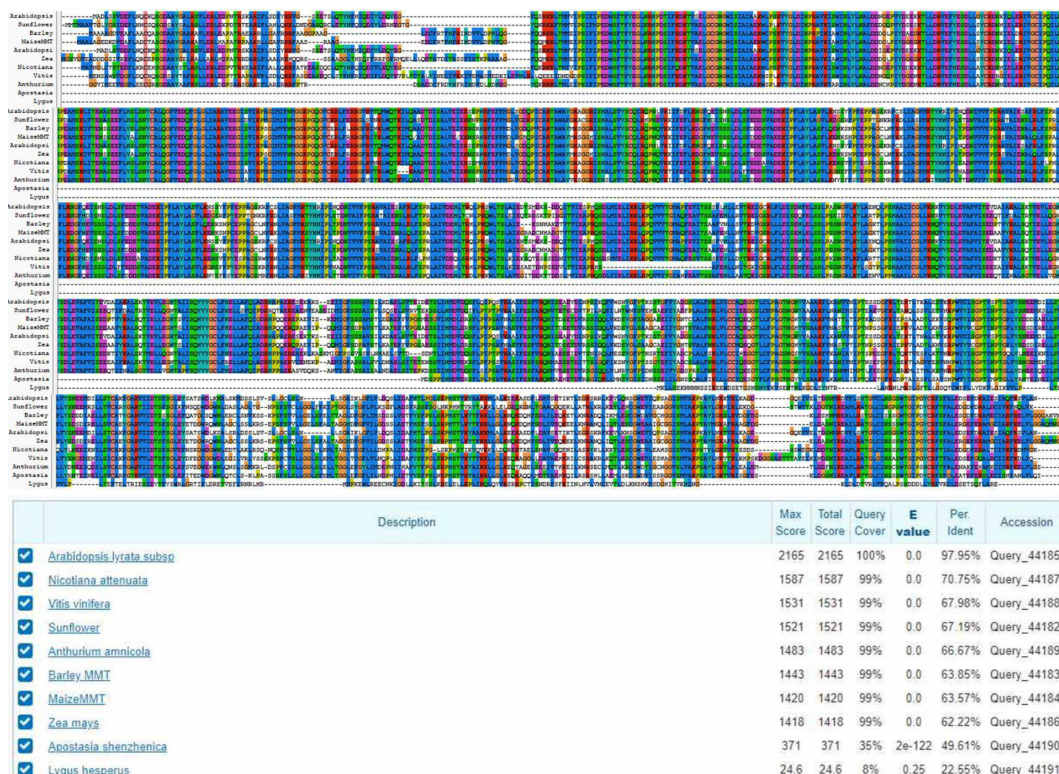
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Recombinant microorganism for producing S-methylmethionine, and method for preparing S-methylmethionine using the same	
<130>	JKP-1465	
<160>	56	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	3216	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	gene coding MMT of Arabidopsis thaliana	
<400>	1	
atggctgacc tgtctagcgt tgatgaattc ctgaaccagt gtaaacagag cggtagcgcc		60
gcataatggcg cctgcgtag cgttctggaa cgtctggaag atccgaacac tcgctctaaa		120
gcacgtatct tctgtccga tatctataaa cgtgtaggtt cttctgaaac ctccctgcag		180
acctatcatt tccacatcca ggatatctac ctggaccagt atgaaggttt ccagtccgt		240
aaaaaactga ctatgatggt gatcccgctc attttcatcc cggaagactg gagcttcacc		300
ttctatgaag gcctgaaccg ccatccgat accattttta aagacaaaac cgtttctgaa		360
ctgggctgtg gtaacgggtg gattagcatt gcaatcgctg ctaaatggct gccctctaaa		420
gtttacggcc tggatatcaa cccgcgtgca gttaaaatct cttggattaa cctgtacctg		480
aacgcgctgg atgacaacgg tgagcctgta tacgatgaag agaagaaaac tctgctcgat		540
cggtgtgaat ttatgaatc tgacctgctg ggctactgcc gtgataacaa aatccagctg		600
gaacgtatcg tgggctgcat cccgcagatc ctgaacccaa acccggaagc aatgtccaaa		660
ctgattactg aaaacgcgtc cgaagaattc ctgcactctc tgagcaatta ctgcgcactg		720
cagggttttg ttgaagacca gttcggcctg ggattgatcg cccgtgcggt cgaagaaggc		780
attagcgtga ttaaaccggc aggcacatg attttcaata tgggcggtcg tccgggtcag		840
ggtgtgtgtc gtcgcctgtt cgaacgtcgt ggcgtagctg ttacgcaaat gtggcagacc		900
aaaatcctgc aggcagcggg taccgatatt agcgcgctgg ttgaaatcga acgcagctct		960
ccgcacgctt ttgaattctt catgggtctg agcggtgacc agccgatctg cgcgcgcacc		1020
gcgtgggctt acggtaaagc aggcggtcgc atttcacatg cactgagcgt atattcctgc		1080
cagatccgcc agccgaacct cgtaaatac atctttgact tcctgaaaaa cggttttcag		1140

gaaatcagca acitctctgga ccttagtttt gaagacgaaa ccgttgctga cgaaaaaatc	1200
ccgttcttgg catacctggc ttctgtgctg aaaaactcct cttactttcc ttttgaaccg	1260
ccggccggta gtaaacgttt ctgtagcctg attgctgggt tcatgcgtac ctaccaccgt	1320
atcccgatca accaggacaa catcggttg tccccgtccc gcgcgggtggc aattgagtct	1380
gccttcgctc tgttctcccc gcgcctggcg attgtgatg agcatctgac ccgtcagctc	1440
ccgcgtagct ggctcactag ccttgctatt gaagacacca gcatggacaa atctgacgat	1500
cagatcactg ttatcgagag cccgcaccag tccgatctga tgattgaact aatcaaaaaa	1560
ctgaaaccgc aagtgtggt taccggcatg gccccgttg aagtattac cagctcaagt	1620
ttcctgcacc tgctggaagt gactaaagaa atcggctgcc gtctgttctt ggacattagc	1680
gatcatttcg aactgtccag cctgccggct tccaacgggt tcctgaaata tctggcggaa	1740
aaccagctgc cgtgcacgc tgcaatcatc tgcggcctgg tgaagaacaa agtgtacagc	1800
gatctggaag ttgccttctg taccactgaa gtcgacgca ttgcgaaagc tctgtccaaa	1860
accgtcgaag tgctggaagg ccataccgct atcatcagcc agtattacta cggctgcctg	1920
ttccacgaac tgctggcggt ccagctggct gaccgccacg cgccggctga acgtgaaagt	1980
gaaaaagcca aatccgaaga aatcatcggt ttttctctgt ccgcgggttc aattctgaaa	2040
gatgtgaac tctcggtagc tgaaattgat gaaactagcc tgattcatat ggatgttgat	2100
cagtcattec tgcagatccc gcaatccgtt aaagcagcta tctttgaatc tttcgttctg	2160
cagaacatct cggaagccga agttgatatc aaccctcta ttaaacagtt cgtttggtct	2220
aattacggct tcccgaccaa atcttccacc ggctttgtgt acgcagatgg gagcctggcg	2280
ctgtttaata aactggtaat ctgctgtgca caggaaggcg gtactctgtg cctgccagcg	2340
ggtaccaacg gcaactacgt ggctgtgcc aaattcctga aagcgaacgt ggtgaacatc	2400
ccgactgaat ctacgatgg ctttaaaactg accgaaaaaa cctgactaa agcactggaa	2460
agtgttaaaa agccgtgggt gtgcatttct ggtccgaccg tgtccccgac cggcctgggt	2520
tattcaaacg aagaaatgga catcctgtctg agtacctgtg ccaaattcgg tgctaaagt	2580
attatcgata cctcgtttag cggctctggaa tattccgca cctcctggga tctgaaaaac	2640
gcgtgtcta aaatggattc ctctctgagc gtctctctgc tgggttgtct gagcctgaac	2700
ctgctgtccg gtgcgattaa actgggtttt ctggtgtctg atcagagcct gattgatgcc	2760
ttccataccc ttccgggtct gtcgaaaccg cacagcacgg tgaatacgc agcgaaaaag	2820
atgtggcgcg tgaagagga aaaagcctcc gatttcctgg atgcggtctc tgaaaccatc	2880
aaaaccctgg aaggccgctc tcgccgctg aaagaagttc tgcagaacag cggttgggaa	2940
gtgatccagc cgtctgcggg catttctatg gtagcgaaac cgaaagcgta cctgaataaa	3000

aaagtgaaac tgaaagcggg tgacggccag gaaatcgtgg aactgaccga tagcaacatg 3060

cgatgatgttt tctgagcca taccggtgtt tgcctgaaca gcggtcctg gacgggcatt 3120

ccgggttact gccgtttcag cttcgtctg gaagatagcg aattcgataa agcaatcgaa 3180

tctatcgcg agttcaaaag cgttctggct aactaa 3216

<210> 2

<211> 3267

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene coding MMT of Barley

<400> 2

atggccgctg cggcgggtga tgttgaagcg ttcctggtg catgtcaggc gagcgtgat 60

gcggcgtagc gtgcggcgaa agcggttctg gaacgcctgg aagcaccggc aaccctgctg 120

gaagcacgtc gtctgctggg tgcggttcgt cgtcgtttcg cggcaggcgg tccggcggcg 180

ggtctggaat gtttcgtac cttccacttc cgtattcacg acgttggttct ggaccgcac 240

ctgcagggtt tccagcagcg taaaaaactg accatgatgg aaatcccag cattttcatc 300

ccggaagatt ggtctttcac cttctatgaa ggtctgaacc gtcaccgga ttctatcttc 360

cgtgataaaa ccgtagcga actgggttgt ggtaacggct ggattagcat cgcgtggct 420

gaaaaatggt gtccgtctaa agtatcgggt ttagatatta acccgctcc gattaaaatc 480

gcatggatta acctgtatct gaacgcgtg gatgatgatg gtctgccgat ctatgatgct 540

gaaggtaaaa cctgctgga tcgtgttgag ttctacgaat ctgacctgct gagctattgt 600

cgtgataaca aaatcgaact ggatcgtatc gtgggttgta tcccgcagat cctgaaccg 660

aaccggaag caatgtccaa aatcgtgacc gaaaacagct ctgaagaatt tctgtatagc 720

ctgagcaact attgtgctct gcagggtttc gttgaagatc agttcggcct aggtctgac 780

gcgcgcgcgg tggaagaagg tattagcgtt atcaaaccga gcggcctgat ggttttcaac 840

atgggtggtc gtccgggtca ggggttttgt gaacgtctgt tctgcgtcg tggttttcgt 900

atcaacaaac tgtggcagac caaatcatg caggcagctg ataccgatat ttccgcgtg 960

gttgaaatcg aaaagaactc tcgtcaccgc ttcgaatttt tcatggatct ggtgggtgat 1020

cagccggtgt gtgcacgtac cgcttgggcg tatatgaaat ccggtggcgg tatctctcac 1080

gcactgtctg tttattcctg ccagctgcgc cagccgaacc aggtgaagaa aatcttcgaa 1140

tttctgaaag atggcttcca cgaagtttcc tccagcctgg atctgagctt tgacgatgac 1200

agcgttgcgg atgaaaaaat cccgttcttg gcatacctgg cttcgttcct gcaggaaaac 1260

aaatctaacc cgigtgaacc gccggctggt tgtctgaact tccgtaacct ggtagccggt	1320
ttcataaata ctatcacca cattccgctg accccggata acgttgttgt gttcccgagc	1380
cgcgagttg ctatcgaata cgcgctgctg ctgttctctc cgggtctggc tattgttgat	1440
gaacacctga cccgtcacct gccgaaacag tggctgacca gccctggcgat tgaagaatct	1500
aaccacgcta aagataacct tactgttctc gaagcaccgc gtcagtctga tctgctgatt	1560
gaactgatcc gtaaacgaa accgcagggt gtagttaccg gcatggctca gttcgaagca	1620
attaccagcg ctgcattcgt taacctgctg agcgtgacca aagacgtagg ctcccgtctg	1680
ctgctggaca tctctgaaca cctggaactg tctagcctgc cgtctagcaa cggcgttctg	1740
aaatacctgg cgggtaaaac cctgccgagc catgccgcta ttctgtcggg tctgggtaaa	1800
aaccagggtt actctgatct ggaagtagcg ttccgcatct ctgaggaccg gaccgtttat	1860
aaagcgtgt cgagaccat cgaactgctg gaaggtcaca cctccgtgat cagccagcac	1920
tattacggct gcctgtttca cgaactgctg gctttccaga tcggtgatcg ccaccgcag	1980
caggaacgcg aaccggcgga agttatcagc aaagaaatga tcggtttcag ctctccgcg	2040
atgagcaccg tggaaaggcg ggaatttttc gttccgggct ctatggaatc tggcgttctc	2100
cacatggatc tggaccgtag ctttctgccg gtccatccg cgggttaacgc gtccatcttc	2160
gagagcttcg ttctcagaa cattactgac tctgaaaccg acgtgcgttc cagcattcag	2220
cagctggtga aagacagcta tggtttctcc gcgggtggcg cgtctgaaat catctatggt	2280
aacacctgtc tggcactgtt caacaaactg gtctctgtgt gtatgcagga acagggtact	2340
ctgctgttcc cgtcgggcac caacggccac tacgttaacg cggcgaaatt cgttaacgt	2400
accacctga ccatcccgac caaagcagac agcggtttca aaatcgaacc gagcgcgctg	2460
gcggataccc tggaaaaagt ttctcagccg tgggtttaca ttagcgttcc gacgattaac	2520
ccgaccggtt tctgtattc cgatgacgac atcgctgaac tgctgtccgt ttgcgcgacc	2580
tacggcgcac gtgttgttat cgatacctct tcttctggcc tggaaattca agcaaccggc	2640
tgctctcagt ggaacctgga acgttgctg agcaacgtta aatccagcaa accgtccttt	2700
agcgtggtgc tgctgggtga actgtctttt gaattgacca ccgcgggtct ggacttcggt	2760
ttctgatta tgctgatag ctccctggtt gataccttct acagcttccc gacgtgtcc	2820
cgcccgact ccacctgaa atacaccttc cgaaactgc tgggtctgaa aaaccagaaa	2880
gatcagcact tctccgatct gattctggaa cagaaagaaa cctgaaaaa ccgcgtgac	2940
cagctgatca aaatgctgga atcctgcggc tgggatgctg tgggttgcca cgggtgtatt	3000

tctatgctgg caaaaccgac cgcatatc ggtaaaagcc tgaaagtga cggtttcgaa 3060

ggtaaaactgg atttctataa catgcgtgaa gcgctgctgc gtagcaccgg tctgtgcac 3120

tcttcttctg gttggaccgg tgttcgggat tactgcccgtt tcagcttcgc attagaaagc 3180

ggtgacttcg accgtgcgat ggaatgtatc gcacgcttcc gtgaactggg tctgggtggg 3240

ggcgctaaag ttaacgggtc taactga 3267

<210> 3

<211> 3267

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene coding MMT of Sunflower

<400> 3

atggcagcag ttaccggcct gtacggtagc attgatgaat tcctgaacca ctgctctcag 60

tctggtgata gcgctatag gcgctgctgt tcctgctgg aacgtctgga aaaaccggat 120

actcgtaccg aagcgcgat ctctctggcg cacctgcaga aaaaactgga taacgacgg 180

gcgagccagc gttgtctgga aacctacat ttccagattc aggatatcta cctggatcgt 240

aacgaaggta ccggttacca gaaccgtaaa aaattcacca tgatggttat cccgtccatt 300

tttatgccgg aggactggag ctccaccttc tacgaaggta ttaaccgtca tccggattct 360

atcttcaaag ataaaaccgt tgctgaactg ggctgcggca acggctggat ttctatcgca 420

atcgcgaaa aatggctgcc actgaaagt tttggcctgg atatcaacc gcgctgtgtg 480

aaaattagct ggatcaacct gtacctgaac gcgttcgatg aagatggtca gccggtttat 540

gattccgaat ctaaaacct gctggatcgt gttgaattct atgaatctga tctgctgagc 600

tactgccgtg acaaccatat cgaactggaa cgattgttg gttgcatccc gcagatcctg 660

aaccgaacc cggatgcat gtccaaactg gtgaccgaaa acgcttctga agaattcctg 720

cattccctgt ccaactattg cgctctgcag ggtttcgttg aagatcagtt cggcctgggc 780

ctgatcggc gtgcggttga agaaggcatt gacgtaatca aaccgatggg catcatgac 840

tttaacatgg gtggccgtcc gggtcagggc gtgtgcaaac gcctgttcga acgtcgcggt 900

ctgtccgtta aaaaactgtg gcaaaccaaa atcctgcagg cttctgacac tgatatctct 960

gctctcgttg aaatcgagaa aaacaacccg caccgctttg aattctttat gggcctgggt 1020

ggtgatgcc cgatttgcgc gcgtaccgcg tgggcattcg gtaaagcatg cggccgtatt 1080

agccacgctc tgtctgtgta ctcttgccag ctgcgccacc cgaacgaagt gaaaaagatc 1140

ttcgaattcc tgaaaaacgg ttccacgac atcagcaact ctctggatct gtccttcgaa 1200

gatgattccg tggcggatga aaaaatcccg ttcttggttt atctggccgg cgttctgaaa	1260
gacggtagcc gtttcccgtg cgaaccgccg accggttaaca aacgctttcg tgatctgac	1320
gcgtctttta tgaaaacctt ccatcacgta ccgctgagca ccgataacgt tgccattttc	1380
ccgtcccgtg cgaccgcgat cgaacacagc ctgcgcctgt tcaccccgcg tctggctatc	1440
gttgaagaac acctgacctg caacctgccg cgtcagtggc tgaccagcct ggaatcgaa	1500
caaaccgtg attctaaaac cccgatcgat ggtatcaccc ttatcgaagc gccgcgtcag	1560
tctgatctga tgattgaact gattaaaaaa ctgaaaccgc aggttgttgt taccggcatc	1620
gcgcagttcg aagcggttac ctcttctgca ttgaaacacc tgctgcgcgt taccctgaa	1680
atcggttccc gtctgttcat cgatatttcc gatcagttcg aactgtctag cctgccgagc	1740
agcatcggcg ttctgaaata cctggcgcgt actcctctgc cgtcccacgc ggcaatcatc	1800
tgtggcctgc tgcgtaaccg tgtttacacc gatctggaag tggcgttcgt tatcagcgaa	1860
gaacaaacca tctttgatgc actgactcgt accgttgaac tgttcaggg taacaccgt	1920
ctgatcagcc agtactacta cggctgtctg ttccacgaac tgctgagctt ccagatccc	1980
gatcgtgcc agaccgcgga acgtgaagca gaaaacgttg aagcaagcga tatcgatatg	2040
atcggtttt cctcttctgc aatcagcgtt ctgtcccaga gcgaactgtc tgtgcgcgtt	2100
actgaaaaga gctctctgct gcatatggac gttgatcaga tcttctgcc gactccgact	2160
ccggtgaaag ctgcaatttt cgaatccttt gctcgtcaga acgtgaccga aaccgaatgt	2220
gatgttacc cgaattctgc tcaattcatc ctgaacacgt ggaacttctc cgttgaacat	2280
tctgctgaat tcatttatgc tgactttccg ctggcgtgt tcaacaaact ggtgctgtgc	2340
tgcattgaag aaggcggctc tctgtgtatg ccggcgggct ctaacggcaa ctacgccgcg	2400
gctgctaaat ttctgaacgc taacattatg tctatcccga ccgaagcgga agttggcttc	2460
aaactgactg ctaaacagtt gtccagcgtg ctggaaaccg tgcacaaacc gtgggtttac	2520
atcagcggtc cgaccatcaa ccgaccggc ctgctgtata gcaacgaaga aatgaaatcg	2580
ctgctgactg tatgcgctcg ttacggcgcg cgtaccatca tcgatactc gttctccgt	2640
atcaaattta acagccagga ctgggatggc tggaacctgg atgcctctct ggccggcctg	2700
accgtaacc cttccttcag cgtttgtctg ctgggtggc tgttcttcaa aatcccgacc	2760
ggcggcctgt cttacggctt cctggttctg aaaagcggct ttctggccga ctccttcgc	2820
agctcgttct ccggtctgaa caaacgcgt aacaccgtgc gttataccgc taaaaactg	2880
ctggaactgg gcgaacagaa aggcaacctg accggtgcag cgcagggtca ggaaaaactg	2940

ttggctactc gtctgaaacg cctgaaagaa accctggaaa actgcggttg ggaagttatc 3000

gaagcgcgtg gcggtgtttc tgttatcgcg aaaccgtctg cctatctggg taaaaacatc 3060

aaactggaaa aagatggctc cacctgggtg accaaactgg atggtaccaa cattcgtgaa 3120

gcgatgctgc gcgctaccgg cctgtgcatt aacggtccgt cttggaccgg tatcccgat 3180

tattgccgt tcactttcgc actggaagat ggtgatttcg atcgtgctct ggattgcac 3240

gttaaattca accagctggg taaataa 3267

<210> 4

<211> 930

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene coding metA variant

<400

> 4

atgccgattc gtgtgccgga cgagctacc gccgtcaatt tcttgcgtga agaaaacgtc 60

tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggg caggaaattc gtcacttaa gtttctgac 120

cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt tctgcgcct gctttcaaac 180

tcacctttgg aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg 240

cccgcagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt 300

gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgtg ggctgtgtgg agtttaatga tgcgcttac 360

tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt 420

gtctgctggg cggtacaggc cgcgtcaat atcctctacg gcattcctaa gaaaactcgc 480

accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg 540

cgtggttttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgt atgctgactt tccggcagcg 600

ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat 660

ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg 720

caaacgctgg cgcaggaatt ttccgcgat gtggaagccg gactagacc ggatgtaccg 780

tataactatt tccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac 840

ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat 900

ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa 930

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> metK cut primer F

<400> 5

ttacatataa ttagaggaag aaaaaatggc aaaacacctt tttacgtc 48

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> metK cut primer R

<400> 6

ttacttcaga ccggcagcat 20

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pZA_metK_fwd

<400> 7

tctgaagtaa atatcgaatt cctgcagc 28

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pZA_metK_rev

<400> 8

ttatatgtaa caagcttatt gataccgtc 29

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> metK gib F

<400> 9

gataagcttg ttacatataa ttagaggaag aaaaaatggc 40

<210> 10

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> metK gib R
 <400> 10
 aattcgatat ttacttcaga ccggcagc 28
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMT F
 <400> 11
 atggctgacc tgtctagcgt 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMT R
 <400> 12
 ttagttagcc agaacgcttt 20

 <210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pCDFDuet_MMT_F
 <400> 13
 ttctaactga gggcccgtcg actagctt 28
 <210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pCDFDuet_MMT_R
 <400> 14
 cagcgccat ggggtgtagct cctccttatt tgttg 35

<210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMT gib F
 <400> 15
 agctacaccc atggccgctg cggcgggt 28

<210> 16
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMT gib R
 <400> 16
 cgacggggccc tcagttagaa ccgttaactt tagcgccacc accc 44

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> metF cut primer F
 <400> 17
 atgagctttt ttcagccag 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> metF cut primer R
 <400> 18
 ttataaacca ggtcgaaccc 20

<210> 19
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pZA_metK_metF_gib F

<400> 19
 tggtttataa atatgaatt cctgcagcc 29

<210> 20
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pZA_metK_metF_gib R
 <400> 20
 aaaagctcat ttacttcaga ccggcagc 28

<210> 21
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> metF gib F
 <400> 21
 tctgaagtaa atgagctttt ttcacgcc 28

<210> 22
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> metF gib R
 <400> 22
 aattcgatat ttataaacca ggtcgaacc 29

<210> 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> del metJ conf F
 <400> 23
 atttattgac gaagaggatt aagtatctc 29

<210> 24
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> del metJ conf R

<400> 24

agcaaaaaag agcggcgcgg agtggaatcg 30

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> del mmuMP conf F

<400> 25

aaccttcttt ggatgttttag atgtcca 27

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> del mmuMP conf R

<400> 26

gggtttatcg ggtctacatc gttcattg 28

<210> 27

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMT rbs F

<400> 27

gagaatttta taaggagtct ttatcatggc tgacctgtct agcgt 45

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMT rbs R

<400> 28

ttagttagcc agaacgcttt tgaactgc 28

<210> 29

<211> 48

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> p425 MMT gib F

<400> 29

gctgcaggaa ttcgatatca gagaatttta taaggagtct ttatcatg 48

<210> 30

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p425 MMT gib R

<400> 30

cgaggctcgac ggtatcgata ttagttagcc agaacgcttt tg 42

<210> 31

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> psh47_fwd

<400> 31

ggctaactaa tcatatgtca ccataaatat caaataatta tag 43

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> psh47_rev

<400> 32

ttgataatga gaaaggattt caacatcgac 30

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmt with promoter_fwd

<400> 33

aaatcctttc tcattatcaa tactgccatt tcaag 35

<210> 34
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mmt with promoter_rev
 <400>
 > 34
 tgacatatga ttagttagcc agaacgcttt tg 32
 <210> 35
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pBE-S_fwd
 <400> 35
 ggctaactaa gggatccgaa ttcaagcttg tc 32
 <210> 36
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pBE-S_rev
 <400> 36
 ttatatgtaa tcgagggtac cgagctcc 28
 <210> 37
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pBE-S metK gib_fwd
 <400> 37
 gtaccctcga ttacatataa ttagaggaag aaaaaatggc 40
 <210> 38
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pBE-S metK gib_rev

<400>	38	
ttatttgttg ttacttcaga ccggcagc		28
<210>	39	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pBE-S MMT gib_fwd	
<400>	39	
tctgaagtaa caacaaataa ggaggagcta c		31
<210>	40	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pBE-S MMT gib_rev	
<400>	40	
ttcggatccc ttagttagcc agaacgcttt tg		32
<210>	41	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pBE-S (MMT in) gib_fwd	
<400>	41	
ggctaactaa gggatccgaa ttcaagcttg tc		32
<210>	42	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pBE-S (MMT in) gib_rev	
<400>	42	
ttatttgttg tcgagggtac cgagctcc		28
<210>	43	
<211>	31	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMT gene cut to in pBE-S_fwd

<400> 43

gtaccctcga caacaaataa ggaggagcta c 31

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMT gene cut to in pBE-S_rev

<400> 44

ttcggatccc ttagttagcc agaacgcttt tg 32

<210> 45

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMT-over40bp-F

<400> 45

caggagaata cgacagcgtg caggactggg ggagtgcgca atggctgacc tgtctagc 58

<210> 46

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMT-over40bp-R

<400> 46

ctatgacatg attacgaatt cgatatcgcg cgcggccgcg ttagttagcc agaacgcttt 60

tg 62

<210> 47

<211> 1071

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of MMT from Arabidopsis thaliana

<400> 47

Met Ala Asp Leu Ser Ser Val Asp Glu Phe Leu Asn Gln Cys Lys Gln

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

 50 55 60
 His Ile Gln Asp Ile Tyr Leu Asp Gln Tyr Glu Gly Phe Gln Ser Arg
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Thr Met Met Val Ile Pro Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp
 85 90 95
 Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu Asn Arg His Pro Asp Thr Ile
 100 105 110
 Phe Lys Asp Lys Thr Val Ser Glu Leu Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile
 115 120 125

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

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

260 265 270
 Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly Val Cys Arg Arg Leu Phe Glu
 275 280 285
 Arg Arg Gly Val Arg Val Thr Gln Met Trp Gln Thr Lys Ile Leu Gln
 290 295 300
 Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu Val Glu Ile Glu Arg Ser Ser
 305 310 315 320
 Pro His Arg Phe Glu Phe Phe Met Gly Leu Ser Gly Asp Gln Pro Ile
 325 330 335
 Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Gly Arg Ile Ser
 340 345 350
 His Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln Ile Arg Gln Pro Asn Leu Val
 355 360 365
 Lys Ile Ile Phe Asp Phe Leu Lys Asn Gly Phe Gln Glu Ile Ser Asn
 370 375 380
 Ser Leu Asp Leu Ser Phe Glu Asp Glu Thr Val Ala Asp Glu Lys Ile
 385 390 395 400
 Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Val Leu Lys Asn Ser Ser Tyr Phe
 405 410 415
 Pro Phe Glu Pro Pro Ala Gly Ser Lys Arg Phe Cys Ser Leu Ile Ala
 420 425 430
 Gly Phe Met Arg Thr Tyr His Arg Ile Pro Ile Asn Gln Asp Asn Ile
 435 440 445
 Val Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala Ile Glu Ser Ala Phe Arg Leu
 450 455 460
 Phe Ser Pro Arg Leu Ala Ile Val Asp Glu His Leu Thr Arg Gln Leu
 465 470 475 480
 Pro Arg Ser Trp Leu Thr Ser Leu Ala Ile Glu Asp Thr Ser Met Asp
 485 490 495
 Lys Ser Asp Asp Gln Ile Thr Val Ile Glu Ser Pro His Gln Ser Asp
 500 505 510

Leu Met Ile Glu Leu Ile Lys Lys Leu Lys Pro Gln Val Val Val Thr
 515 520 525
 Gly Met Ala Pro Phe Glu Val Ile Thr Ser Ser Ser Phe Leu His Leu
 530 535 540
 Leu Glu Val Thr Lys Glu Ile Gly Cys Arg Leu Phe Leu Asp Ile Ser
 545 550 555 560
 Asp His Phe Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Ser Asn Gly Val Leu Lys
 565 570 575
 Tyr Leu Ala Glu Asn Gln Leu Pro Ser His Ala Ala Ile Ile Cys Gly
 580 585 590
 Leu Val Lys Asn Lys Val Tyr Ser Asp Leu Glu Val Ala Phe Val Ile
 595 600 605
 Thr Glu Val Asp Ala Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Thr Val Glu Val
 610 615 620
 Leu Glu Gly His Thr Ala Ile Ile Ser Gln Tyr Tyr Tyr Gly Cys Leu
 625 630 635 640
 Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Leu Ala Asp Arg His Ala Pro Ala
 645 650 655
 Glu Arg Glu Ser Glu Lys Ala Lys Ser Glu Glu Ile Ile Gly Phe Ser
 660 665 670
 Ser Ser Ala Val Ser Ile Leu Lys Asp Ala Glu Leu Ser Val Thr Glu
 675 680 685
 Ile Asp Glu Thr Ser Leu Ile His Met Asp Val Asp Gln Ser Phe Leu
 690 695 700
 Gln Ile Pro Gln Ser Val Lys Ala Ala Ile Phe Glu Ser Phe Val Arg
 705 710 715 720
 Gln Asn Ile Ser Glu Ala Glu Val Asp Ile Asn Pro Ser Ile Lys Gln
 725 730 735
 Phe Val Trp Ser Asn Tyr Gly Phe Pro Thr Lys Ser Ser Thr Gly Phe
 740 745 750
 Val Tyr Ala Asp Gly Ser Leu Ala Leu Phe Asn Lys Leu Val Ile Cys
 755 760 765

Cys Ala Gln Glu Gly Gly Thr Leu Cys Leu Pro Ala Gly Thr Asn Gly

770

775

780

Asn Tyr Val Ala Ala Ala Lys Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Asn Ile

785

790

795

800

Pro Thr Glu Ser Ser Asp Gly Phe Lys Leu Thr Glu Lys Thr Leu Thr

805

810

815

Lys Ala Leu Glu Ser Val Lys Lys Pro Trp Val Cys Ile Ser Gly Pro

820

825

830

Thr Val Ser Pro Thr Gly Leu Val Tyr Ser Asn Glu Glu Met Asp Ile

835

840

845

Leu Leu Ser Thr Cys Ala Lys Phe Gly Ala Lys Val Ile Ile Asp Thr

850

855

860

Ser Phe Ser Gly Leu Glu Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Asp Leu Lys Asn

865

870

875

880

Ala Leu Ser Lys Met Asp Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly Cys

885

890

895

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ser Gly Ala Ile Lys Leu Gly Phe Leu Val

900

905

910

Leu Asp Gln Ser Leu Ile Asp Ala Phe His Thr Leu Pro Gly Leu Ser

915

920

925

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

930

935

940

Lys Glu Glu Lys Ala Ser Asp Phe Leu Asp Ala Val Ser Glu Thr Ile

945

950

955

960

Lys Thr Leu Glu Gly Arg Ser Arg Arg Leu Lys Glu Val Leu Gln Asn

965

970

975

Ser Gly Trp Glu Val Ile Gln Pro Ser Ala Gly Ile Ser Met Val Ala

980

985

990

Lys Pro Lys Ala Tyr Leu Asn Lys Lys Val Lys Leu Lys Ala Gly Asp

995

1000

1005

Gly Gln Glu Ile Val Glu Leu Thr Asp Ser Asn Met Arg Asp Val Phe

1010 1015 1020
 Leu Ser His Thr Gly Val Cys Leu Asn Ser Gly Ser Trp Thr Gly Ile
 1025 1030 1035 1040
 Pro Gly Tyr Cys Arg Phe Ser Phe Ala Leu Glu Asp Ser Glu Phe Asp
 1045 1050 1055
 Lys Ala Ile Glu Ser Ile Ala Gln Phe Lys Ser Val Leu Ala Asn

 1060 1065 1070
 <210> 48
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of MMT from Barley

<400> 48
 Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
 20 25 30
 Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala

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

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
 115 120 125
 Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140
 Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Pro Ile Lys Ile

145 150 155 160
 Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175
 Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr

 180 185 190
 Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205
 Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
 210 215 220
 Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
 245 250 255

 Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270
 Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285
 Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300
 Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Glu Ile Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Asp

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

Ser Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Phe
 405 410 415
 Leu Gln Glu Asn Lys Ser Asn Pro Cys Glu Pro Pro Ala Gly Cys Leu
 420 425 430
 Asn Phe Arg Asn Leu Val Ala Gly Phe Met Lys Ser Tyr His His Ile
 435 440 445
 Pro Leu Thr Pro Asp Asn Val Val Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala
 450 455 460
 Ile Glu Asn Ala Leu Arg Leu Phe Ser Pro Gly Leu Ala Ile Val Asp
 465 470 475 480
 Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser Leu Ala
 485 490 495
 Ile Glu Glu Ser Asn His Ala Lys Asp Thr Val Thr Val Ile Glu Ala
 500 505 510
 Pro Arg Gln Ser Asp Leu Leu Ile Glu Leu Ile Arg Lys Leu Lys Pro
 515 520 525
 Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu Ala Ile Thr Ser Ala
 530 535 540
 Ala Phe Val Asn Leu Leu Ser Val Thr Lys Asp Val Gly Ser Arg Leu
 545 550 555 560
 Leu Leu Asp Ile Ser Glu His Leu Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ser Ser
 565 570 575
 Asn Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Gly Lys Thr Leu Pro Ser His Ala
 580 585 590
 Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp Leu Glu
 595 600 605
 Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Pro Thr Val Tyr Lys Ala Leu Ser
 610 615 620
 Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser Val Ile Ser Gln His
 625 630 635 640
 Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655

Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
660 665 670

Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
675 680 685

Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
690 695 700

Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
705 710 715 720

Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
725 730 735

Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
740 745 750

Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
755 760 765

Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
770 775 780

Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
785 790 795 800

Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
805 810 815

Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
820 825 830

Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
835 840 845

Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
850 855 860

Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
865 870 875 880

Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
885 890 895

Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu

900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975

 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990
 Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005
 Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu Asp
 1010 1015 1020
 Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu Cys Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg Phe Ser Phe

 1045 1050 1055
 Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu Cys Ile Ala Arg
 1060 1065 1070
 Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys Val Asn Gly Ser Asn
 1075 1080 1085
 <210> 49
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence of MMT from sunflower
 <400> 49
 Met Ala Ala Val Thr Gly Leu Tyr Gly Ser Ile Asp Glu Phe Leu Asn

 1 5 10 15
 His Cys Ser Gln Ser Gly Asp Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Leu

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

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

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

 Asp Ala Met Ser Lys Leu Val Thr Glu Asn Ala Ser Glu Glu Phe Leu
 225 230 235 240
 His Ser Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln
 245 250 255
 Phe Gly Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Asp Val
 260 265 270
 Ile Lys Pro Met Gly Ile Met Ile Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly

275 280 285
 Gln Gly Val Cys Lys Arg Leu Phe Glu Arg Arg Gly Leu Ser Val Asn

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

 Cys Gln Leu Arg His Pro Asn Glu Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu
 370 375 380
 Lys Asn Gly Phe His Asp Ile Ser Asn Ser Leu Asp Leu Ser Phe Glu
 385 390 395 400
 Asp Asp Ser Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala
 405 410 415
 Gly Val Leu Lys Asp Gly Ser Arg Phe Pro Tyr Glu Pro Pro Thr Gly
 420 425 430
 Asn Lys Arg Phe Arg Asp Leu Ile Ala Ser Phe Met Lys Thr Tyr His

 435 440 445
 His Val Pro Leu Ser Thr Asp Asn Val Ala Ile Phe Pro Ser Arg Ala
 450 455 460
 Thr Ala Ile Glu Asn Ser Leu Arg Leu Phe Thr Pro Arg Leu Ala Ile
 465 470 475 480
 Val Glu Glu His Leu Thr Cys Asn Leu Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser
 485 490 495
 Leu Glu Ile Glu Gln Thr Arg Asp Ser Lys Thr Pro Ile Asp Gly Ile
 500 505 510

 Thr Val Ile Glu Ala Pro Arg Gln Ser Asp Leu Met Ile Glu Leu Ile
 515 520 525

Lys Lys Leu Lys Pro Gln Val Val Val Thr Gly Ile Ala Gln Phe Glu
 530 535 540
 Ala Val Thr Ser Ser Ala Phe Glu His Leu Leu Arg Val Thr Arg Glu
 545 550 555 560
 Ile Gly Ser Arg Leu Phe Ile Asp Ile Ser Asp Gln Phe Glu Leu Ser
 565 570 575
 Ser Leu Pro Ser Ser Ile Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Arg Thr Pro
 580 585 590
 Leu Pro Ser His Ala Ala Ile Ile Cys Gly Leu Leu Arg Asn Arg Val
 595 600 605
 Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ala Phe Val Ile Ser Glu Glu Gln Thr Ile
 610 615 620
 Phe Asp Ala Leu Thr Arg Thr Val Glu Leu Leu Gln Gly Asn Thr Ala
 625 630 635 640
 Leu Ile Ser Gln Tyr Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ser
 645 650 655
 Phe Gln Ile Pro Asp Arg Arg Gln Thr Ala Glu Arg Glu Ala Glu Asn
 660 665 670
 Val Glu Ala Ser Asp Ile Asp Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Ile
 675 680 685
 Ser Val Leu Ser Gln Ser Glu Leu Ser Val Arg Val Thr Glu Lys Ser
 690 695 700
 Ser Leu Leu His Met Asp Val Asp Gln Ile Phe Leu Pro Thr Pro Thr
 705 710 715 720
 Pro Val Lys Ala Ala Ile Phe Glu Ser Phe Ala Arg Gln Asn Val Thr
 725 730 735
 Glu Thr Glu Cys Asp Val Thr Pro Ile Leu Arg Gln Phe Ile Leu Asn
 740 745 750
 Thr Trp Asn Phe Ser Val Glu His Ser Ala Glu Phe Ile Tyr Ala Asp
 755 760 765
 Phe Pro Leu Ala Leu Phe Asn Lys Leu Val Leu Cys Cys Ile Glu Glu
 770 775 780

Gly Gly Ser Leu Cys Met Pro Ala Gly Ser Asn Gly Asn Tyr Ala Ala
785 790 795 800

Ala Ala Lys Phe Leu Asn Ala Asn Ile Met Ser Ile Pro Thr Glu Ala
805 810 815

Glu Val Gly Phe Lys Leu Thr Ala Lys Gln Leu Ser Ser Val Leu Glu
820 825 830

Thr Val His Lys Pro Trp Val Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro
835 840 845

Thr Gly Leu Leu Tyr Ser Asn Glu Glu Met Lys Ser Leu Leu Thr Val
850 855 860

Cys Ala Arg Tyr Gly Ala Arg Thr Ile Ile Asp Thr Ser Phe Ser Gly

865 870 875 880
Ile Lys Phe Asn Ser Gln Asp Trp Asp Gly Trp Asn Leu Asp Ala Ser
885 890 895

Leu Ala Gly Leu Thr Gly Asn Pro Ser Phe Ser Val Cys Leu Leu Gly
900 905 910

Gly Leu Phe Phe Lys Ile Pro Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Gly Phe Leu
915 920 925

Val Leu Lys Ser Gly Phe Leu Ala Asp Ser Phe Arg Ser Ser Phe Ser
930 935 940

Gly Leu Asn Lys Pro His Asn Thr Val Arg Tyr Thr Ala Lys Lys Leu
945 950 955 960

Leu Glu Leu Gly Glu Gln Lys Gly Asn Leu Thr Gly Ala Ala Gln Gly
965 970 975

Gln Glu Lys Leu Leu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Leu Lys Glu Thr Leu
980 985 990

Glu Asn Cys Gly Trp Glu Val Ile Glu Ala Arg Gly Gly Val Ser Val
995 1000 1005

Ile Ala Lys Pro Ser Ala Tyr Leu Gly Lys Asn Ile Lys Leu Glu Lys

1010 1015 1020

Asp Gly Ser Thr Trp Val Thr Lys Leu Asp Gly Thr Asn Ile Arg Glu

1025 1030 1035 1040
 Ala Met Leu Arg Ala Thr Gly Leu Cys Ile Asn Gly Pro Ser Trp Thr
 1045 1050 1055
 Gly Ile Pro Asp Tyr Cys Arg Phe Thr Phe Ala Leu Glu Asp Gly Asp
 1060 1065 1070
 Phe Asp Arg Ala Leu Asp Cys Ile Val Lys Phe Asn Gln Leu Val Lys
 1075 1080 1085

<210> 50

<211> 1094

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of MMT from Vitis vinifera

<400> 50

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

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

 115 120 125
 Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu Asn Arg
 130 135 140
 His Pro Asp Ser Ile Phe Lys Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu Gly Cys

145 150 155 160
 Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Ile Ala Glu Lys Trp Ser Pro Leu
 165 170 175
 Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Val Lys Ile Ser Trp
 180 185 190

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

 260 265 270
 Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly Leu Gly
 275 280 285
 Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ala Val Ile Lys Pro Met
 290 295 300
 Gly Ile Met Ile Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly Val Cys
 305 310 315 320
 Lys Arg Leu Phe Glu Arg Arg Gly Phe Arg Val Thr Arg Leu Trp Gln
 325 330 335

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

Gln Val Lys Thr Ile Phe Glu Phe Leu Lys Asn Gly Phe His Glu Ile

405 410 415

Ser Ser Ser Leu Asp Leu Phe Phe Glu Asp Asp Ser Val Ala Asp Glu

420 425 430

Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Val Leu Lys Gly Asn Ser

435 440 445

Phe Phe Pro Tyr Glu Pro Pro Ala Gly Ser Lys Arg Phe Arg Asn Leu

450 455 460

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

465 470 475 480

Asn Val Val Ile Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala Ile Glu Asn Ala Leu

485 490 495

Arg Leu Phe Ser Pro Arg Leu Ala Ile Val Asp Glu Asn Leu Thr Arg

500 505 510

His Leu Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Leu Lys Ile Glu Ser Ala Glu

515 520 525

Thr Asp Asn Pro Ser Glu Asp Val Leu Thr Val Ile Glu Ala Pro Arg

530 535 540

His Ser Ala Phe Glu His Leu Leu Asn Ile Thr Gly Lys Ile Gly Ser

545 550 555 560

Arg Leu Phe Leu Asp Ile Ser Asp His Phe Glu Leu Ser Ser Leu Pro

565 570 575

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

580 585 590

His Ala Ala Val Ile Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp

595 600 605

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

610 615 620

Leu Ser Lys Thr Val Glu Leu Leu Glu Gly Asn Thr Ala Leu Ile Ser

625 630 635 640

Gln Tyr Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe Arg Glu Leu Leu Ala Phe Gln Leu

645 650 655
 Ala Asp Arg His Pro Pro Ala Glu Arg Val Cys Glu Asn Glu Lys Pro
 660 665 670
 Ala Glu Met Ile Gly Phe Ala Ser Ser Ala Leu Ser Val Leu Asp Asn
 675 680 685
 Ala Glu Leu Ser Ile Thr Glu Thr Glu Asn Ser Ser Val Ile His Met

 690 695 700
 Asp Val Asp Lys Ser Phe Leu Pro Phe Pro Ser Ser Val Lys Ala Ser
 705 710 715 720
 Ile Phe Glu Ser Phe Ser Arg Gln Asn Met Ala Glu Ser Glu Thr Asp
 725 730 735
 Ile Thr Thr Ser Ile Gly Gln Phe Ile Lys Ser Asn Tyr Gly Phe Pro
 740 745 750
 Thr Ser Ser Gly Thr Glu Phe Ile Tyr Ala Asp Cys Ser Leu Ala Leu
 755 760 765

 Phe Asn Lys Leu Val Leu Cys Cys Ile Gln Glu Gly Gly Thr Leu Cys
 770 775 780
 Phe Pro Ala Gly Ser Asn Gly Asn His Val Ser Ser Ala Lys Phe Leu
 785 790 795 800
 Lys Ala Asn Ile Val Asn Ile Pro Thr Asn Ser Glu Phe Gly Phe Lys
 805 810 815
 Leu Ser Glu Lys Thr Leu Ala Gly Val Phe Glu Ser Val Asn Asn Pro
 820 825 830
 Trp Leu Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Leu Val Tyr

 835 840 845
 Ser Asn Gly Glu Met Glu Asn Ile Leu Ser Ile Cys Ala Lys Phe Gly
 850 855 860
 Ala Lys Val Val Leu Asp Thr Ser Phe Ser Gly Leu Glu Tyr Asp Phe
 865 870 875 880
 Glu Gly Cys Gly Gly Trp Asp Leu Glu Gly Ile Leu Val Arg Leu Tyr
 885 890 895
 Ser Ser Ser Lys Pro Ser Phe Cys Val Ser Leu Leu Gly Gly Leu Ser

900 905 910
 Leu Lys Met Leu Thr Gly Gly Leu Thr Cys Gly Phe Leu Val Leu Asn
 915 920 925
 Gln Pro Leu Leu Ile Asp Ala Phe Tyr Ser Phe Pro Gly Leu Ser Lys
 930 935 940
 Pro His Ser Thr Val Lys Tyr Thr Val Lys Lys Leu Leu Gly Leu Arg
 945 950 955 960
 Glu Gln Lys Ala Gly Gly Leu Leu Asp Ala Val Ala Glu His Lys Arg
 965 970 975
 Ile Leu Cys Ser Arg Ala Lys Arg Leu Lys Gln Thr Leu Glu Ser Cys
 980 985 990
 Gly Trp Glu Val Leu Glu Ser His Ala Gly Val Ser Met Val Ala Lys
 995 1000 1005
 Pro Ser Ala Tyr Leu Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys His Pro Ser Lys
 1010 1015 1020
 Asp Gly Gly Ser Ala Glu Thr Thr Thr Ala Tyr Glu Ile Lys Ile Asn
 1025 1030 1035 1040
 Asp Ser Asn Ile Arg Glu Ala Ile Leu Arg Ala Thr Gly Leu Gly Ile
 1045 1050 1055
 Asn Ser Ala Ser Trp Thr Gly Ile Pro Gly Tyr Cys Arg Phe Thr Phe
 1060 1065 1070
 Ala Leu Glu Asp Ser Glu Phe Gly Gln Ala Leu Asp Cys Ile Ile Lys
 1075 1080 1085
 Phe Lys Asp Leu Ile Gln
 1090
 <210> 51
 <211> 1083
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence of MMT from *Nicotiana attenuata*
 <400> 51

Met Ala Val Asn Gly Leu Cys Thr Ser Thr Glu Asp Phe Leu Lys Arg

1 5 10 15

Cys Glu His Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Ser Thr Leu Arg Ser Leu Leu

20 25 30

Glu Arg Leu Glu Asp Pro Val Thr Arg Lys Glu Ala Arg Ile Phe Leu

35 40 45

Ala Leu Leu Gln Lys Arg Phe Ala Thr Lys Glu Ala Ser Asp Gln Cys

50 55 60

Leu Gln Thr Tyr His Phe Gln Ile Gln Asp Ile Val Leu Glu Gln Tyr

65 70 75 80

Glu Gly Phe Gln Lys Arg Lys Lys Leu Thr Met Ile Val Ile Pro Ser

85 90 95

Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu Asn

100 105 110

Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Gln Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu Gly

115 120 125

Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Ile Ala Glu Lys Trp Leu Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asn Gly Glu Pro Ile

165 170 175

Tyr Asp Asp Glu Lys Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe His Glu

180 185 190

Ser Asp Leu Leu Ala Tyr Cys Lys Asp Asn His Ile Glu Leu Glu Arg

195 200 205

Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Asp Ala Met

210 215 220

Ser Lys Leu Ile Thr Glu Asn Ala Ser Glu Glu Phe Leu His Ser Leu

225 230 235 240

Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly Leu

245 250 255
 Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys Pro
 260 265 270
 Leu Gly Ile Met Ile Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly Val
 275 280 285
 Cys Lys Arg Leu Phe Glu Arg Arg Gly Leu Arg Val Asn Lys Leu Trp

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

 Arg Gln Pro Asn Gln Val Arg Lys Ile Phe Glu Phe Ile Lys Asn Gly
 370 375 380
 Phe His Asp Ile Ser Asn Ser Leu Asp Leu Ser Phe Glu Asp Asp Ala
 385 390 395 400
 Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Val Leu
 405 410 415
 Lys Glu Asn Ser Val Phe Pro Tyr Glu Ser Pro Ala Gly Ser Arg Trp
 420 425 430
 Phe Arg Asn Leu Ile Ala Gly Phe Met Lys Thr Tyr His His Phe Pro

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

500 505 510
 Glu Ala Pro Arg Gln Ser Asp Ser Met Val Glu Leu Ile Lys Lys Leu
 515 520 525
 Lys Pro Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu Ser Val Thr
 530 535 540
 Ser Ser Ser Phe Glu Tyr Leu Leu Asp Thr Thr Arg Glu Ile Gly Cys
 545 550 555 560
 Arg Leu Phe Val Asp Ile Ser Asp Gln Phe Glu Leu Ser Ser Leu Pro
 565 570 575
 Lys Ser Asn Gly Val Leu Lys Phe Leu Ala Arg Thr Thr Leu Pro Ser

 580 585 590
 His Ala Ala Ile Ile Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp
 595 600 605
 Leu Glu Val Ala Phe Val Ile Ser Glu Asp Lys Thr Ile Tyr Lys Ala
 610 615 620
 Leu Ser Lys Thr Met Glu Leu Leu Gln Gly Asn Thr Ala Leu Ile Ser
 625 630 635 640
 Gln Tyr Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Leu
 645 650 655

 Ala Asp Arg His Pro Pro Ala Glu Arg Glu Ala Glu Lys Leu Lys Ala
 660 665 670
 Ser Lys Met Ile Gly Phe Pro Ser Ser Val Ser Ser Val Leu Asn His
 675 680 685
 Ala Glu Leu Ser Val Thr Asp Ser Asp Asn Thr Leu Ile His Met Asp
 690 695 700
 Val Asp Gln Ser Phe Leu Pro Ile Pro Thr Pro Val Lys Ala Ala Ile
 705 710 715 720
 Phe Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Ala Glu Ser Glu Ile Asp Val

 725 730 735
 Thr Ser Asn Ile Arg Gln Leu Met Glu Ser Ser Tyr Gly Phe Pro Thr
 740 745 750

Asn Ser Lys Thr Glu Phe Ile Tyr Ala Asp Cys Pro Leu Ala Leu Phe
 755 760 765
 Ser Lys Leu Val Leu Cys Cys Ile His Glu Gly Gly Thr Leu Cys Phe
 770 775 780
 Pro Ala Gly Ser Asn Gly Ser Tyr Val Ser Ala Ala Lys Phe Val Lys
 785 790 795 800

 Ala Asn Ile Ala Tyr Ile Pro Thr Ser Pro Glu Glu Gly Phe Lys Leu
 805 810 815
 Thr Gln Lys Thr Val Glu Ser Phe Leu Lys Thr Val Asn Lys Pro Trp
 820 825 830
 Ile Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Val Asn Pro Thr Gly Gln Leu Tyr Leu
 835 840 845
 Asn Glu Glu Ile Lys Asn Ile Leu Ser Val Cys Ala Lys Phe Gly Ala
 850 855 860
 Arg Val Ile Ile Asp Thr Ser Phe Ser Gly Val Glu Phe Asn Ser Lys

 865 870 875 880
 Gly Trp Asp Gly Trp Asn Leu Glu Asp Thr Leu Ala Lys Leu Arg Ser
 885 890 895
 Gln Asn Gln Ser Phe Cys Val Thr Leu Leu Gly Gly Leu Tyr Leu Lys
 900 905 910
 Met Leu Thr Ala Gly Ile Asn Phe Gly Phe Leu Leu Leu Asp His Pro
 915 920 925
 Ala Leu Ile Asp Ala Phe His Ser Phe Pro Gly Leu Ser Lys Pro His
 930 935 940

 Ser Thr Ile Lys Tyr Gln Val Lys Lys Leu Leu Asp Gln Arg Glu Arg
 945 950 955 960
 Thr Ala Glu Leu Ser Asn Ala Val Ser Gln Gln Glu Asn Ile Leu Ala
 965 970 975
 Ser Arg Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Thr Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990
 Val Leu Glu Ala His Ser Gly Ile Ser Val Val Ala Lys Pro Ser Thr
 995 1000 1005

Tyr Leu Gly Lys Thr Val Lys Thr Ser Ser Asp Ser Ser Ser Trp Glu

1010 1015 1020
 Gly Lys Leu Asp Asp Thr Asn Ile Arg Glu Ala Met Leu Lys Thr Thr
 1025 1030 1035 1040
 Gly Leu Cys Ile Asn Ser Ser Ser Trp Thr Gly Ile Pro Gly Tyr Cys
 1045 1050 1055
 Arg Phe Thr Ile Ala Leu Glu Asp Gly Asp Phe Glu Arg Ala Leu Thr
 1060 1065 1070
 Cys Ile Val Lys Phe Arg Asp Met Val Gly Lys
 1075 1080

<210> 52
 <211> 1070
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence of MMT from Arabidopsis lyrata subsp
 <400> 52

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

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

115 120 125
 Ile Ala Ile Ala Ala Lys Trp Leu Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ile Asn Pro Arg Ala Val Lys Ile Ser Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Asp Asp Ile Gly Glu Pro Val Tyr Asp Glu Glu Lys Lys Thr
 165 170 175
 Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr Glu Ser Asp Leu Leu Gly Tyr Cys
 180 185 190

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

 260 265 270
 Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly Val Cys Arg Arg Leu Phe Glu Arg
 275 280 285
 Arg Gly Val Arg Val Thr Gln Met Trp Gln Thr Lys Ile Leu Gln Ala
 290 295 300
 Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu Val Glu Ile Glu Arg Ser Ser Pro
 305 310 315 320
 His Arg Phe Glu Phe Phe Met Gly Leu Ser Gly Asp Gln Pro Ile Cys
 325 330 335

 Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Gly Arg Ile Ser His
 340 345 350
 Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln Ile Arg Gln Pro Asn Leu Val Lys
 355 360 365
 Ile Ile Phe Asp Phe Leu Lys Asn Gly Phe Gln Glu Ile Ser Asn Ser

370 375 380
 Leu Asp Leu Ser Phe Glu Asp Glu Thr Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro
 385 390 395 400
 Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Val Leu Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Pro

 405 410 415
 Phe Glu Pro Pro Ala Gly Ser Lys Arg Phe Cys Ser Leu Ile Ala Gly
 420 425 430
 Phe Met Arg Thr Tyr His Arg Ile Pro Ile Asn Gln Asp Asn Ile Val
 435 440 445
 Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala Ile Glu Ser Ala Phe Arg Leu Phe
 450 455 460
 Ser Pro Arg Leu Ala Ile Val Asp Glu His Leu Thr Arg Gln Leu Pro
 465 470 475 480

 Arg Ser Trp Leu Thr Ser Leu Ala Ile Glu Asn Thr Ser Met Glu Lys
 485 490 495
 Ser Asp Asp Gln Ile Thr Val Ile Glu Ser Pro His Gln Ser Asp Leu
 500 505 510
 Met Ile Glu Leu Ile Lys Lys Leu Lys Pro Gln Val Val Val Thr Gly
 515 520 525
 Met Ala Pro Phe Glu Val Ile Thr Ser Ser Ser Phe Val His Leu Leu
 530 535 540
 Glu Val Thr Arg Glu Ile Gly Cys Arg Leu Phe Leu Asp Ile Ser Asp

 545 550 555 560
 His Phe Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Ser Asn Gly Val Leu Lys Tyr
 565 570 575
 Leu Ala Glu Asn Gln Leu Pro Ser His Val Ala Ile Ile Cys Gly Leu
 580 585 590
 Val Lys Asn Lys Val Tyr Ser Asp Leu Glu Val Ala Phe Val Ile Thr
 595 600 605
 Glu Val Asp Ala Ile Ala Lys Ala Leu Ser Lys Thr Val Glu Val Leu
 610 615 620

Glu Gly His Thr Ala Ile Ile Ser Gln Tyr Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe
 625 630 635 640
 His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Leu Ala Asp Arg His Ala Pro Ala Glu
 645 650 655
 Arg Glu Ser Glu Lys Thr Lys Ser Glu Glu Ile Ile Gly Phe Ser Ser
 660 665 670
 Ser Ala Val Ser Ile Leu Lys Asp Ala Glu Leu Ser Val Thr Glu Ile
 675 680 685
 Asp Glu Thr Ser Leu Ile His Met Asp Val Asp Gln Ser Phe Leu Pro

 690 695 700
 Ile Pro Gln Ser Val Lys Ala Ala Ile Phe Glu Ser Phe Val Arg Gln
 705 710 715 720
 Asn Ile Ser Glu Ala Glu Val Asp Ile Asn Pro Ser Ile Lys Gln Phe
 725 730 735
 Val Trp Ser Asn Tyr Gly Phe Pro Thr Lys Ser Ser Thr Gly Phe Val
 740 745 750
 Tyr Ala Asp Gly Ser Leu Ala Leu Phe Asn Lys Leu Val Ile Cys Cys
 755 760 765

 Ala Gln Glu Gly Gly Thr Phe Cys Leu Pro Ala Gly Thr Asn Gly Asn
 770 775 780
 Tyr Val Ala Ala Ala Lys Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Asn Ile Pro
 785 790 795 800
 Thr Glu Ser Ser Asp Gly Phe Lys Leu Thr Glu Lys Thr Leu Thr Asn
 805 810 815
 Ala Leu Glu Thr Val Lys Lys Pro Trp Val Cys Ile Ser Gly Pro Thr
 820 825 830
 Val Ser Pro Thr Gly Leu Val Tyr Ser Asn Glu Glu Met Asp Ile Leu

 835 840 845
 Leu Ser Thr Cys Ala Lys Phe Gly Ala Lys Val Ile Ile Asp Thr Ser
 850 855 860
 Phe Ser Gly Leu Glu Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Asp Leu Lys Ser Ala
 865 870 875 880

Leu Ser Arg Leu Asp Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly Cys Leu
 885 890 895
 Ser Leu Asn Leu Leu Ser Gly Ala Ile Lys Leu Gly Phe Leu Val Leu
 900 905 910

 Asp Gln Ser Leu Ile Asp Ala Phe His Thr Leu Pro Gly Leu Ser Lys
 915 920 925
 Pro His Ser Thr Val Lys Tyr Ala Ala Lys Lys Met Leu Ala Leu Lys
 930 935 940
 Glu Glu Lys Ala Ser Asp Phe Leu Asp Ala Val Ser Glu Thr Ile Lys
 945 950 955 960
 Thr Leu Glu Gly Arg Ser Lys Arg Phe Lys Glu Val Leu Lys Asn Ser
 965 970 975
 Gly Trp Glu Val Ile Gln Pro Ser Ala Gly Ile Ser Met Val Ala Lys

 980 985 990
 Pro Lys Ala Tyr Leu Asn Lys Thr Val Lys Leu Lys Ala Gly Glu Gly
 995 1000 1005
 Gln Glu Val Val Glu Leu Thr Asp Ser Asn Met Arg Asp Val Phe Leu
 1010 1015 1020
 Ser His Thr Gly Val Cys Leu Asn Ser Gly Ser Trp Thr Gly Ile Pro
 1025 1030 1035 1040
 Gly Tyr Cys Arg Phe Ser Phe Ala Leu Glu Asp Ser Glu Phe Asp Lys
 1045 1050 1055

 Ala Ile Glu Ser Ile Ala Gln Phe Lys Ser Val Leu Ala Asn
 1060 1065 1070
 <210> 53
 <211> 1091
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence of MMT from Zea mays
 <400> 53
 Met Ala Ala Leu Ala Gly Glu Asp Lys Asp Val Asp Ala Phe Leu Ala
 1 5 10 15

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

260 265 270
 Ile Lys Pro Ser Gly Ile Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly
 275 280 285
 Gln Gly Val Cys Glu Arg Leu Phe Arg Arg Arg Gly Phe Arg Ile Thr
 290 295 300
 Lys Leu Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Xaa Ala Asp Thr Asp Ile Ser
 305 310 315 320

 Ala Leu Val Glu Xaa Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe
 325 330 335
 Met Asp Leu Val Gly Asx Gln Pro Ile Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala
 340 345 350
 Tyr Met Lys Ser Gly Gly His Ile Ser His Ala Leu Ser Val Tyr Ser
 355 360 365
 Cys Gln Leu Arg Gln Pro Asn Gln Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu
 370 375 380
 Lys Asp Gly Phe His Glu Val Ser Ser Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asp

 385 390 395 400
 Asp Asp Ser Val Ala Glu Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala
 405 410 415
 Ser Phe Leu Lys Glu Asn Lys Ser Asn Pro Cys Glu Pro Pro Ala Gly
 420 425 430
 Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Val Ala Gly Phe Met Lys Ser Tyr His
 435 440 445
 His Ile Pro Leu Thr Pro Asp Asn Val Val Val Phe Pro Ser Arg Ser
 450 455 460

 Val Ala Ile Glu Asn Ala Leu Gln Leu Phe Ser Pro Ala Leu Ala Ile
 465 470 475 480
 Val Asp Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser
 485 490 495
 Leu Ala Ile Glu Gly Arg Ala Asp Cys Asn His Ala Asp Gly Thr Val
 500 505 510
 Thr Val Ile Glu Ala Pro Arg Gln Ser Asp Leu Leu Ile Glu Leu Ile

515 520 525
Arg Lys Leu Gln Pro Gln Val Val Val Thr Gly Met Ala Gln Phe Glu

530 535 540
Ala Ile Thr Ser Ala Ala Phe Glu Asn Leu Leu Asn Val Thr Lys Asp
545 550 555 560

Val Gly Ser Arg Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu His Leu Glu Leu Ser
565 570 575

Ser Leu Pro Ser Ser Asn Gly Val Leu Lys Tyr Leu Ala Gly Lys Thr
580 585 590

Leu Pro Ser His Ala Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val
595 600 605

Tyr Ser Asp Leu Glu Val Ala Phe Ala Ile Ser Glu Asp Ala Ala Val
610 615 620

Tyr Lys Ala Leu Ser Gln Thr Ile Glu Leu Leu Glu Gly His Thr Ser
625 630 635 640

Leu Ile Ser Gln His Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala
645 650 655

Phe Gln Ile Ala Asp Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Gln Pro Ala Glu
660 665 670

Val Ile Pro Gln Gln Met Ile Gly Phe Ser Asp Pro Ala Val Ser Thr

675 680 685
Leu Lys Ala Thr Glu Phe Phe Val Pro Gly Ser Ala Glu Ser Ser Ile

690 695 700
Ile His Met Asp Leu Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val

705 710 715 720
Asn Ala Ser Val Phe Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser

725 730 735
Glu Thr Asp Val Arg Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr

740 745 750

Gly Leu Ser Ala Ala Gly Cys Ala Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Ser
755 760 765

Val Ala Leu Phe Asn Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly
770 775 780

Thr Leu Leu Phe Pro Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Ser Ala Ala
785 790 795 800

Lys Phe Val Asn Ala Ser Thr Val Thr Ile Pro Thr Asn Pro Ser Ser
805 810 815

Gly Phe Arg Ile Glu Pro Lys Val Leu Ala Asp Thr Leu Lys Asn Val
820 825 830

Ser Arg Pro Trp Val Tyr Val Cys Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly
835 840 845

Phe Leu Tyr Ser Asp Ser Asp Ile Arg Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala
850 855 860

Glu Tyr Gly Ala Arg Val Val Ile Asp Thr Ser Phe Ser Gly Leu Glu
865 870 875 880

Tyr Glu Thr Asp Gly Trp Arg Gln Trp Asn Leu Ala Gly Cys Leu Ser
885 890 895

Ser Leu Lys Arg Ser Glu Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu
900 905 910

Leu Ser Phe Ala Leu Thr Ala Gly Gly His Asp Phe Gly Phe Val Ile
915 920 925

Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ala Glu Thr Phe His Ser Phe Ser Ser Leu
930 935 940

Ser Arg Pro His Thr Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Lys Lys Leu Leu Gly
945 950 955 960

Leu Lys Asn Gln Lys Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Val Glu Gln
965 970 975

Lys Glu Glu Leu Lys Asn Arg Ala Asn Gln Leu Ile Gln Thr Leu Glu
980 985 990

Ser Cys Gly Trp Glu Ala Ala Ile Gly Cys Gly Gly Ile Ser Met Leu
995 1000 1005

Ala Lys Pro Thr Ala Tyr Met Gly Lys Ala Phe Lys Ala Ala Gly Phe
1010 1015 1020

Asp Gly Glu Leu Asp Ala Ser Asn Ile Arg Glu Ala Ile Leu Arg Ala
1025 1030 1035 1040

Thr Gly Leu Cys Ile Asn Ser Ser Ser Trp Thr Gly Ile Pro Gly Tyr
1045 1050 1055

Cys Arg Phe Ser Phe Ala Leu Glu Arg Gly Glu Phe Glu Arg Ala Met
1060 1065 1070

Gly Cys Ile Ala Arg Phe Lys Glu Leu Val Leu Gly Gly Ala Gln Met
1075 1080 1085

Asn Gly Ala
1090

<210> 54

<211> 1080

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of MMT from Anthurium amnicola

<400> 54

Gly Gly Val Ile Met Glu Glu Val Glu Gly Phe Leu Glu Glu Cys Gly
1 5 10 15

Arg Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Ala Ala Phe Lys Ser Leu Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Asp Asp Pro Ser Ala Arg Ser Gly Ala Arg Glu Phe Leu Ala Arg
35 40 45

Ile Arg Arg Arg Phe Pro Thr Arg Asp Ser Ala Asp Asp Cys Phe Arg
50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Gln Lys Arg Lys Lys Leu Thr Met Leu Glu Ile Pro Ser Ile Phe
85 90 95

Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Ile Asn Arg His
100 105 110

Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu Gly Cys Gly
115 120 125

Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Ser Pro Leu Lys
 130 135 140

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

 210 215 220
 Met Ile Thr Glu Asn Ala Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser Leu Ser Asn
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly Leu Gly Leu
 245 250 255
 Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ala Val Ile Lys Pro Met Gly
 260 265 270
 Ile Met Ile Phe Asn Ile Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly Val Cys Arg
 275 280 285

 Arg Leu Phe Glu Arg Arg Gly Phe His Ile Thr Lys Leu Trp Gln Thr
 290 295 300
 Lys Val Leu Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu Val Glu Ile
 305 310 315 320
 Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Gly Arg Val Gly
 325 330 335
 Asp Gln Pro Ile Cys Ala Arg Thr Ala Leu Ala Tyr Val Lys Ser Gly
 340 345 350
 Gly Arg Ile Ser His Ser Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln Leu Arg Gln

 355 360 365
 Pro Asn Gln Val Lys Ile Ile Phe Asp Phe Leu Lys Asn Gly Phe Gln

370 375 380
 Glu Ile Ser Ser Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asp Asp Asp Ser Val Ala
 385 390 395 400
 Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Ala Leu Lys Asn
 405 410 415
 Tyr Ser Phe Phe Ser Tyr Glu Pro Pro Ala Gly Ser Met Arg Phe Arg
 420 425 430

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

 500 505 510
 Pro Arg Gln Ser Asp Leu Ile Ile Glu Leu Ile Lys Lys Leu Arg Pro
 515 520 525
 Gln Val Val Ile Thr Gly Ile Ala His Phe Glu Ala Val Thr Ser Ser
 530 535 540
 Ala Phe Glu His Leu Leu Ala Ala Thr Gln Glu Ile Gly Ser Arg Leu
 545 550 555 560
 Phe Leu Asp Ile Ser Asp His Leu Glu Leu Ser Ser Leu Pro Arg Ser
 565 570 575

 Asn Gly Ala Leu Lys Tyr Leu Ala Glu Asn Val Leu Pro Pro His Ala
 580 585 590
 Ala Ile Leu Cys Gly Leu Val Lys Asn Gln Val Tyr Ser Asp Leu Glu
 595 600 605
 Val Ala Phe Val Ile Ser Glu Glu Gln Thr Ile Ile Asn Ala Leu Ser
 610 615 620
 Gly Thr Val Glu Leu Leu Val Gly His Thr Ala Pro Phe Ser Gln Tyr

625 630 635 640
 Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Pro Asp

 645 650 655
 Arg His Pro Pro Ala Glu Arg Ala Ser Val Asp Gln Lys Ser Ala Asn
 660 665 670
 Val Ile Gly Phe Ala Ser Ser Ala Ile Ser Ala Leu Asn Asp Ala Glu
 675 680 685
 Leu Ser Ile Thr Glu Pro Lys Asp Ser Ser Ile Ile His Met Asp Val
 690 695 700
 Asp Gln Ser Phe Leu Ser Ile Pro Ser Ala Val Lys Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720

 Glu Ser Phe Ala Arg Gln Asn Met Val Glu Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735
 Ser Gly Ile Gln Gln Leu Val Leu Asn Arg Tyr Gly Phe Pro Ile Asp
 740 745 750
 Asn Ser Ser Glu Ile Val Tyr Gly Asp Ser Pro Arg Ser Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Ile Leu Cys Cys Ile Gln Glu Glu Gly Thr Leu Cys Phe Pro
 770 775 780
 Ala Gly Thr Asn Gly Asn Tyr Ile Ser Ala Ala Lys Phe Met Lys Ala

 785 790 795 800
 Asn Met Met Ile Met Pro Thr Leu Phe Glu Glu Gly Phe Lys Leu Ser
 805 810 815
 Arg Lys Met Leu Ile Thr Met Leu Lys Ser Val Asn Arg Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Val Ser Gly Pro Thr Val Asn Pro Thr Gly Leu Leu Tyr Asp Asn
 835 840 845
 Glu Glu Ile Gln Asp Ile Leu Ser Val Cys Ala Glu Val Gly Ala Arg
 850 855 860

 Val Ile Ile Asp Thr Ser Phe Ser Gly Leu Glu Phe Ser Val Glu Gly
 865 870 875 880

Trp Glu Lys Trp Asn Leu Gln Asn Ser Leu Ser Gly Met Lys Arg Leu
885 890 895
Asp Ser Pro Phe Cys Ile Ser Leu Leu Gly Gly Leu Ser Leu Glu Leu
900 905 910
Leu Thr Gly Gly Leu Glu Phe Gly Tyr Leu Ile Met Asp Glu Pro Asn
915 920 925
Ile Ile His Ala Phe Tyr Thr Phe Pro Gly Leu Ser Arg Pro His Ser

930 935 940
Thr Ala Lys Tyr Ala Ile Lys Lys Leu Leu Gly Leu Lys Glu Gln Thr
945 950 955 960
Ala Gly Glu Leu Ser Glu Glu Ile Val Thr His Lys Glu Ile Leu Lys
965 970 975
Asn Arg Ser Glu Cys Leu Met Gln Thr Leu Lys Ser Cys Gly Trp Asp
980 985 990
Thr Ile Gly Cys Asn Gly Gly Val Ser Leu Val Ala Lys Pro Ser Ala
995 1000 1005

Tyr Leu Gly Lys Thr Leu Lys Leu Glu Ala Leu Glu Met Thr Leu Asp
1010 1015 1020
Asp Phe Asn Ile Arg Glu Ala Val Leu Arg Ala Thr Gly Leu Cys Ile
1025 1030 1035 1040
Asn Ser Cys Ser Trp Thr Gly Ile Pro Ser His Cys Arg Phe Thr Phe
1045 1050 1055
Ala Leu Glu Asn Ala Lys Phe Glu His Ala Met Lys Cys Ile Val Arg
1060 1065 1070
Phe Lys Glu Leu Val Leu Gly Ser

1075 1080
<210> 55
<211> 385
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid sequence of MMT from Apostasia shenzhenica
<400> 55

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

Arg Leu Leu Gly Leu Lys Glu Gln Lys Ala Gln Gln Leu Met Asp Thr

260 265 270
 Ile Ala Glu His Lys Gln Ile Leu Arg Ser Arg Ser His Leu Leu Ala
 275 280 285
 Glu Met Leu Ser Lys Cys Gly Trp Asp Val Ile Ser Ser Arg Gly Gly
 290 295 300
 Val Ser Met Val Ala Lys Pro Ser Ala Tyr Leu Gly Lys Thr Val Lys
 305 310 315 320
 Ile Ser Gly Phe Glu Ser Lys Leu Asp Gly Ser Asn Ile Arg Glu Ala
 325 330 335

Val Leu Arg Thr Thr Gly Leu Cys Ile Asn Ser Ser Ser Trp Thr Gly
 340 345 350
 Ile Pro Asp Tyr Cys Arg Phe Ser Phe Gly Leu Glu Ala Thr Glu Phe
 355 360 365
 Glu Arg Ser Leu Glu Cys Ile Ser His Phe Ala Asn Leu Val Leu Gln
 370 375 380

Ile

385

<210> 56

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of MMT from *Lygus hesperus*

<400

> 56

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

Thr Cys Trp Glu Phe Leu Leu Tyr Asp Lys Val Leu Gly Ile Lys Val

65 70 75 80
Val Leu Pro Leu Thr Glu Phe Thr Glu Leu Thr Arg Ile Glu Ser Ile
85 90 95
Asp Tyr Thr Phe Tyr Ser Trp Arg Leu Gly Arg Thr Ile Phe Leu Asp
100 105 110
Arg Glu Thr Val Glu Phe Ile Arg Asn Arg Leu His Arg His Met Pro
115 120 125
Lys Glu Trp Leu Arg Glu Glu Cys Asn Lys Ile Gly Asp Leu Leu Lys
130 135 140

Ile Thr Ser Ser Leu Lys Arg Glu Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Ile
145 150 155 160
Lys Gln Leu Gln Tyr Val Lys Ser Arg Arg Pro Cys Thr Ile Ser Asn
165 170 175
Asp Arg Phe Ser Phe Lys Ile Ile Asn Leu His Val Leu Val Asn Cys
180 185 190
Glu Val Thr Leu Asp Leu Lys Asn Ser His Lys Met Ser Asp Gly His
195 200 205
Ile Thr Val Lys His Ile Asn Gly Lys Leu Asp Leu Asp Thr Val Arg

210 215 220
Leu Val Phe Gln Ala Leu Pro Ser Ser Asp Asp Asp Leu Leu Tyr Arg
225 230 235 240
Phe Val Lys Cys Leu Asp Ser Glu Thr Ser Gln Phe Leu Ala Arg Glu
245 250 255