



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0093443
(43) 공개일자 2011년08월18일

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01) *C12N 15/56* (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0013496

(22) 출원일자 2010년02월12일

심사청구일자 2010년02월12일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김영완

서울특별시 송파구 삼전동 52-26번지 301호

스테판 지 위더스

캐나다 브이6티 1췌1 비시 밴쿠버 2036 메인 몰
디223 디파트먼트 오브 케미스트리

(74) 대리인

구현서

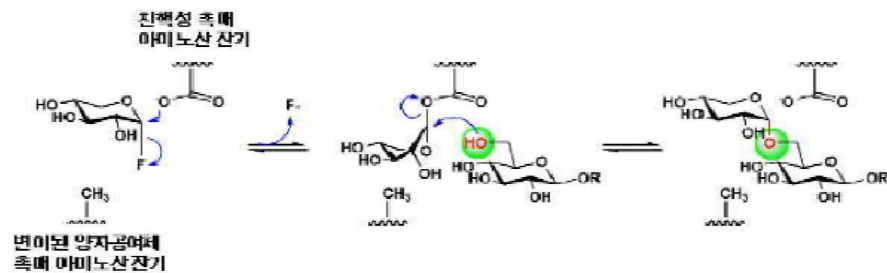
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 알파-자일로시테이즈의 양자공여/수용체 촉매기 변이 효소 및 이를 이용한 고효율 당전이 방법

(57) 요약

본 발명은 알파-자일로시테이즈의 양자공여체 촉매제 변이 효소 및 그 효소의 제조방법 및 그 효소의 응용에 관한 발명이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K000743

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 생체모방과 분자진화를 통한 맞춤형 당쇄 가공 생물 촉매 개발

기여율

주관기관 가천의과대학

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

천연 알파-자일로시테이즈의 양자공여/수용체 촉매기를 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기로 돌연변이시킨 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 천연 알파-자일로시테이즈는 서열번호 1 또는 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드 또는 그 기능적 변이체인 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기는 알라닌, 세린 또는 글라이신인 것을 특징으로 하는 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 알파-자일로시테이즈의 양자공여/수용체 촉매기는 아스파테이트인 것을 특징으로 하는 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 돌연변이 알파-자일로시테이즈 효소는 서열번호 3 또는 4에 기재된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드 또는 그 기능적 변이체인 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 돌연변이 효소는 천연 알파-자일로시테이즈에 비해 알파 자일로실 플로라이드에 대한 가수분해활성이 1/10 내지 1/1000,000 배 감소된 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항의 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소를 코딩하는 유전자.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 5 또는 6에 기재된 유전자인 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소를 코딩하는 유전자.

청구항 9

알파-자일로시테이즈의 양자공여체 촉매 아미노산잔기를 특정위치변이법, 무작위변이법, 또는 천연적인 미생물 유전체의 변이 중에서 선택된 방법을 통해 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기로 돌연변이된 제 1항의 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소의 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기는 알라닌, 세린 또는 글라이신인 것을 특징으로 제 1항의 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소의 제조 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소는 재조합 미생물을 이용하여 생산되는 것을 특징으로 제 1항의 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소의 제조 방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소를 당전이 반응 촉매제로 사용하고, 당 공여체를 포함하는 당전이 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 당공여체는 알파-자일로실 플로라이드인 것을 특징으로 하는 당전이 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 방법은 당수용체를 더욱 포함하는 당전이 방법.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 당수용체는 포도당, 만노오스(mannose), 또는 이들의 2-수산기(hydroxyl group)가 다른 반응기로 치환된 유사체를 비환원성 말단에 가지는 올리고당 및 배당체인 것을 특징으로 하는 당전이 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 당수용체는 4-니트로페닐 베타 글루코사이드, 4-니트로페닐 베타 만노코사이드, 4-니트로페닐 2-데옥시 2-아지도-베타 글루코사이드, 4-니트로페닐 베타 셀로바이오사이드, 및 4-니트로페닐 2-데옥시 2-플로로-베타 셀로바이오사이드로 구성된 군으로부터 선택된 화합물인 것을 특징으로 하는 당전이 방법.

청구항 17

제 12항에 있어서, 상기 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소는 담체에 고정화되거나 세포 표면에 발현시킨 후 얻어지는 것을 특징으로 하는 당전이 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기 변이 효소 및 그 효소의 제조방법 및 그 효소의 응용에 관한 발명이다.

배경 기술

[0002] 생체 내에서 다양한 생리학적 반응을 매개하는 기능을 수행하는 탄수화물은 질병 예방 및 치료로서 인식되고 있다. 이러한 탄수화물은 지금까지 유기합성을 통해 이루어졌으나, 반응조건상의 장점과 기질특이성 등의 장점에 문에 효소를 이용하여 올리고당을 합성하는 방법이 최근 많은 주목을 받고 있다. 효소를 이용한 올리고당 합성 기술은 탄수화물 분해효소가 지니는 당전이 활성을 이용하거나 뉴클레오타이드 당을 기질로 사용하는 당전이효소(glycosyltransferase)를 이용하는 방법이 있다.

[0003] 일반적으로 당전이 효소는, 생체 내에 있어서 당단백질, 당지질 등의 당쇄(糖鎖)의 생합성에 관여하는 효소이다. 그 반응 생성물인 당단백질이나 당지질 등의 당쇄는, 분화나 발생에 있어서의 세포 간 및 세포-세포 외 매트릭스 사이의 시그널 전달이나 복합당질의 택(tack)으로서 기능하는 중요한 분자인 것 등이 밝혀져 있다.

[0004] 탄수화물 분해효소(glycosidase) 중 존속성 탄수화물 분해효소(retaining glycosidase)는 카르복실기를 가지는 두 개의 아미노산 잔기를 각각 친핵성 촉매기(nucleophile catalyst)와 양자공여/수용체 촉매기(proton-donor/acceptor catalyst)로 사용하여 당쇄 가수분해 반응을 촉매한다. 상기 존속성 탄수화물 분해효소들은 각 효소의 친핵성 촉매기를 이용하여 기질 내 당쇄결합을 분해하고, 친핵성 촉매기와 기질의 일부가 원래 기질과 반대의 아노머(anomer)결합을 통해 공유결합된 당-효소 중간체를 생성한다. 이 후, 양자공여/수용체 촉매기의 작용에 의해 당-효소 중간체에 있는 당을 물로 전이하는 가수분해반응 또는 물 이외의 다른 당 수용체의 수산기로 전이하는 당전이 반응을 통해 반응산물의 아노머가 원래 기질의 것과 같아지면서 반응이 완료된다(Acc Chem Res, 2000, 33(1):11-18).

[0005] 그러나 상기 존속성 탄수화물 분해효소를 이용한 당전이반응의 경우, 생성된 당전이산물이 다시 효소에 의해 가수분해되므로 시간적으로 반응을 조절하여야하며 얻어지는 당전이 산물의 수율 또한 일반적으로 낮다. 또한 당 수용체가 가지는 여러 수산기로 당전이가 가능하며, 생성된 당전이산물이 다시 당수용체로 사용될 수 있어 한 개 이상의 당전이 산물이 생산되므로 원하는 물질의 분리 및 정제 공정이 추가로 요구되므로 생산경비가 증가하

는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유전자조작기술을 이용한 단백질공학기술이 적용된 바 있다.

[0006] 첫 번째 예로 지속성 탄수화물 분해효소의 친핵성 촉매기를 비활성 아미노산잔기로 변이시키면 당-효소 중간체를 형성할 수 없어 가수분해활성을 나타내지 못한다. 그러나 원래 기질과 반대의 위치이성질체 형태의 불소당(fluoride sugar)을 기질로 사용하여 당-효소 중간체의 유사체를 제공하면, 효소에 남아있는 양자공여체 촉매기의 반응에 의해 당전이 반응은 성공적으로 진행된다. 이때 상기 친핵성 촉매기가 변이된 탄수화물 분해효소 변이체들은 가수분해활성을 상실하였으므로 당전이산물을 가수분해하지 못하고 반응액 내에 산물을 축적한다. 이와 같이 지속성 탄수화물 분해효소의 친핵성 촉매기를 특정위치변이법(site-directed mutagenesis)로 변이시키고, 원래 기질과 반대의 위치이성질체 형태의 불소당을 당공여체로 사용하여 당전이반응만을 수행하는 가공효소를 글라이코신다아제(glycosynthase)라고 명명한다 (J Am Chem Soc 1998, 120:5583-5584). 아그로박테리움(Agrobacterium sp.)에서 유래한 베타-글라이코시다아제의 친핵성 촉매기인 358번째 글루탐이트 잔기(Glu358)를 알라닌(alanine)으로 변형시킨 글라이코신다아제(glycosynthase)가 최초로 보고된 이후, 다양한 효소들에 동일한 전략이 적용된 바 있다 (Curr Opin Chem Biol. 2006, 10(5):509-519). 그러나 기존의 글라이코신다아제들은 대부분이 베타-글라이코시다아제에서 유래하여 베타-당쇄만을 합성하는 효소들이며, 알파-당쇄를 합성할 수 있는 알파-글라이코시다아제의 경우는 Schizosaccharomyces pombe 알파-글라이코시다아제의 친핵성 촉매기를 변이시킨 효소가 유일한 예이다 (Biosci Biotechnol Biochem. 2002, 66(4):928-933). 그러나 상기 알파-글라이코시다아제는 알파-아노머 불소당에 비해 합성이 어렵고 안정성이 떨어지는 베타-아노머 불소당을 당공여체로 사용해야 하는 어려움을 지닌다.

[0007] 두 번째 방법으로는 지시적 진화(directed evolution)을 통해 친핵성 및 양자공여/수용체 촉매기를 보유하지만 가수분해활성은 현저히 줄어들고 당전이 활성은 유지 혹은 향상된 돌연변이체를 개발함으로써 당전이 산물의 수율을 증대한 연구가 보고된 바 있다 (J Biol Chem. 2005, 280(44):37088-37097). 그러나 이 경우 역시 당전이 산물에 대한 가수분해 활성을 완전히 제거하진 못하였으며, 알파-글리코시테이즈에 대한 적용예가 보고된 바 없다.

[0008] 알파-자일로시다아제는 반응기질의 알파-당쇄결합(α -glycosidic linkage)를 분해하여 알파-아노머(α -anomer)를 가지는 산물을 생산하는 상기 존속성 탄수화물 분해효소에 속한다. 따라서 알파-자일로시다아제가 가지는 상기 당전이반응 활성을 이용하여 다양한 당전이산물의 생산이 보고된 바 있다(FEBS J. 2007, 274(23):6074-6084). 그러나 상기 존속성 탄수화물 분해효소를 이용한 당전이반응의 단점을 극복하지 못하고 낮은 수율로 두 개 이상의 부산물을 생성하는 문제점을 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 알파-자일로시다아제의 양자공여/수용체 촉매기를 돌연변이시키고, 고수율로 당전이 반응을 수행하는 알파-자일로시다아제 변이효소를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 알파-자일로시다아제 변이효소 생산방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 알파-자일로실 플로라이드(α -xylosyl fluoride)와 포도당, 만노오스(mannose), 및 이들의 2-수산기(hydroxyl group)가 다른 반응기로 치환된 유사체를 비환원성 말단에 가지는 올리고당 및 배당체들을 포함하는 기질에 상기 알파-자일로시다아제 변이효소를 반응시켜 자일로스가 전이된 당전이 산물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 천연 알파-자일로시테이즈의 양자공여/수용체 촉매기를 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기로 돌연변이시킨 알파-자일로시테이즈 돌연변이 효소 폴리펩타이드를 제공한다.

[0013] 본 발명의 명세서에 기재된 "폴리펩티드"라는 용어는 본 발명에 따른 폴리펩티드의 전체 길이를 지칭한다. 바람직한 구체예로서, 용어 "폴리펩티드"는 분리된 폴리펩티드 및 재조합 방법에 의해, 예컨대 샘플로부터 분리하고 정제하는 것에 의해, 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해 및 통상의 방법에 의한 단백질 합성에 의해 제조된 폴리펩티드를 포함하며, 상술한 방법은 모두 당해 분야의 업자에게 공지되어 있다. 바람직하게는, 전체 폴리펩

티드 또는 그의 일부는 메리필드(Merrifield) 수법과 같은 통상의 합성법에 의해 합성될 수 있다.

- [0014] 본 발명의 천연 알파-자일로시데이즈 폴리펩티드 서열은 서열번호 1 또는 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0015] 본 발명의 명세서에 기재된 폴리펩티드의 "천연 알파-자일로시데이즈 또는 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소의 기능적 변이체"는 서열 번호 1 또는 2 및/또는 서열번호 3 또는 4에 따른 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 대하여 서열 상동성, 특히 약 70%, 바람직하게는 약 80%, 특히 약 90%, 특히 약 95%, 가장 바람직하게는 약 98%의 서열동일성을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 기능적 변이체는 예컨대 사람 이외의 생물에서 기인한, 바람직하게는 비-인간 포유류, 예컨대 마우스, 래트, 원숭이 및 돼지로부터 기인한 본 발명에 따른 폴리펩티드에 대하여 상동인 폴리펩티드이다. 기능적 변이체의 다른 예는 상이한 개체, 한 생물의 상이한 기관 또는 상이한 발달 단계에 있는 유전자의 상이한 대립유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드이다. 기능적 변이체는 바람직하게는 또한 천연 산출 또는 합성 돌연변이, 특히 이들 서열에 의해 암호화되는 펩티드의 활성을 현저히 변화시키는 돌연변이를 포함한다. 또한, 이러한 변이체는 바람직하게는 암호화하는 유전자의 상이한 접합으로부터 생길 수도 있다.
- [0016] "기능적 변이체"는 본 발명에 따른 상응하는 폴리펩티드와 동일한 생물학적 작용을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 생물학적 작용은 기능적 에세이법으로 분석될 수 있다. 후보 폴리펩티드가 본 발명에 따른 폴리펩티드의 기능적 변이체인지 여부를 검사하기 위하여, 후보 폴리펩티드는 해당분야의 당업자에게 일반적으로 공지된 기능적 에세이법으로 분석할 수 있으며, 이러한 에세이법은 본 발명에 따른 상응하는 폴리펩티드의 생물학적 기능을 분석하는데 적합하다.
- [0017] 또한, 용어 "기능적 변이체"는 후보 기능적 변이체 폴리펩티드가 % 서열 동일성 수준에 대한 기능적 변이체의 기준을 충족하는 한 돌연변이된 유전자로부터 또는 차등적으로 접합된 유전자로부터 발현된 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 발현 분석은 해당분야의 당업자에게 일반적으로 공지된 방법에 의해 실시될 수 있다.
- [0018] 폴리펩티드의 "기능적 변이체"는 이들이 본 발명에 따른 상응하는 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 기능을 갖는 한, 약 7 내지 약 1000개 아미노산, 바람직하게는 10개 이상의 아미노산, 더욱 바람직하게는 20개 이상, 가장 바람직하게는 50개 이상, 예컨대 100개 이상, 예컨대 200개 이상, 예컨대 300개 이상, 예컨대 400개 이상, 예컨대 500개 이상, 예컨대 600개 이상의 아미노산 길이를 갖는 본 발명에 따른 폴리펩티드의 일부일 수 있다. 이들이 본 발명에 따른 상응하는 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 기능을 갖는 한, 약 1 내지 30, 바람직하게는 약 1 내지 15, 특히 약 1 내지 5개 아미노산 범위의 본 발명에 따른 폴리펩티드의 결실체도 또한 포함된다. 예컨대, 첫 번째 아미노산인 메티오닌은 폴리펩티드의 기능을 현저히 변경시키지 않고도 존재하지 않을 수 있다. 또한, 번역 후 변형, 예컨대 지질 앵커 또는 포스포릴 기는 변이체에 존재하거나 존재하지 않을 수 있다.
- [0019] "서열 동일성"은 폴리펩티드를 예컨대 BLASTP 2.0.1에 의해 결정할 경우 및 핵산을 예컨대 BLASTN 2.0.14에 의해 결정하는 경우(이때, 필터를 설치하고 BLOSUM은 62임; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402)에서 2개 서열의 동일 정도(% 동일성)를 지칭한다.
- [0020] 또한 본 발명은 본 발명의 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 명세서에 기재된 '알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소를 코딩하는 유전자'는 서열 5 또는 6에 따른 유전자 및/또는 그의 변이체를 지칭한다.
- [0022] 용어 "코딩하는 유전자"는 본 발명에 따른 분리가능한 생활성 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열 또는 그의 전구체에 관한 것이다. 폴리펩티드는 예컨대 본 발명의 당전이 활성과 같은 생물학적 기능이 실질적으로 유지되는 한 코딩 서열의 전체 길이 또는 그의 일부의 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [0023] 상기 기재된 유전자의 서열에서 예컨대 유전자 암호의 축퇴로 인하여 적은 변화가 존재할 수 있거나 또는 번역되지 않은 서열이 암호화된 폴리펩티드의 활성에 큰 영향을 주지 않고도 핵산의 5' 및/또는 3' 말단에 부착될 수 있다는 것은 공지되어 있다. 따라서 본 발명은 소위 천연 산출 핵산 및 상기 기재된 핵산의 인공적으로 생성된 "변이체"도 포함한다.
- [0024] 바람직하게는, 본 발명에 따른 유전자는 DNA 또는 RNA, 바람직하게는 DNA, 특히 이중쇄 DNA 이다. 특히 본 발명에 따른 유전자는 RNA 분자, 바람직하게는 단일쇄 또는 이중쇄 RNA 분자일 수 있다. 핵산의 서열은 1 이상의 인트론 및/또는 1개의 폴리A 서열을 더 포함할 수 있다.

- [0025] 본 발명에 따른 유전자는 당해 분야의 당업자에게 일반적으로 공지된 방법에 의해 제조할 수 있으며 이하에 기재되어 있다.
- [0026] 유전자의 "변이체"는 바람직하게는 80%, 특히 90%, 가장 바람직하게는 95%의 서열 동일성을 갖는 다른 종으로부터 얻은 상동체일 수 있다.
- [0027] 유전자의 "변이체"는 본 발명에 따른 상응하는 폴리펩티드와 유사한 활성을 갖는 한 약 8개 이상의 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 약 16개 이상의 뉴클레오타이드 길이, 특히 약 21개 이상의 뉴클레오타이드 길이, 보다 바람직하게는 약 30개 이상의 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게는 약 40개 이상의 뉴클레오타이드 길이, 가장 바람직하게는 약 50개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 본 발명에 따른 유전자의 일부일 수 있다. 이러한 활성은 상기에 기재한 기능적 에세이법을 이용하여 분석될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구체예로서, 유전자는 본 발명에 따른 유전자와 상보적인 서열을 갖는 유전자 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 유전자는 본 발명에 따른 유전자의 비-기능적 돌연변이성 변이체, 또는 그의 변이체를 포함한다.
- [0029] 본 발명에서 '알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기'란 알파-자일로시데이즈의 아미노산 잔기들 중 효소가 당쇄를 가수분해할 때 요구되는 양자의 공급과 수용의 기능을 수행하는 아미노산 잔기를 의미한다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에 있어서 상기 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기는 알라닌, 세린, 또는 글라이신인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기 촉매 아미노산잔기는 아스파테이트인 것이 바람직하고, 상기 알파-자일로시데이즈가 가지는 PVHWGGDC 아미노산 서열 내 아스파테이트인 것이 더욱 바람직하고, 가장 바람직하게는 서열번호 1에서 482번째 아스파테이트 또는 서열번호 2에서 481번째 아스파테이트이나 이에 한정되지 아니한다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 돌연변이 효소는 가수분해활성이 1/10 내지 1/1000,000 배 감소된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예인 표4의 내용에 변이체 활성이 1/10000배 감소함을 나타내었다. 또한 pNP xyloside에 대한 활성은 상실하였음을 동시에 보여주고 있다.
- [0034] 또한 본 발명은 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기를 특정위치변이법, 무작위변이법, 또는 천연적인 미생물 유전체의 변이 중에서 선택된 방법을 통해 아스파테이트 이외의 다른 아미노산 잔기로 돌연변이된 본 발명의 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소의 제조 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소는 재조합 미생물을 이용하여 생산되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0036] 또한 본 발명은 본 발명의 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소를 당전이 반응 촉매제를 사용하고, 바람직하게는 알파-자일로실 플로라이드를 당공여체로 사용하는 당전이 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 당수용체를 더욱 포함하는 것이 바람직하고, 상기 당수용체는 포도당, 만노오스(mannose), 및 이들의 2-수산기(hydroxyl group)가 다른 반응기로 치환된 유사체를 비환원성 말단에 가지는 올리고당 및 배당체들인 것이 바람직하며, 4-니트로페닐 베타 글루코사이드, 4-니트로페닐 베타 만노코사이드, 4-니트로페닐 2-데옥시 2-아지도-베타 글루코사이드, 4-니트로페닐 베타 셀로바이오사이드, 및 4-니트로페닐 2-데옥시 2-플로로-베타 셀로바이오사이드로 구성된 군으로부터 선택된 화합물인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0038] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 알파-자일로시데이즈 돌연변이 효소는 담체에 고정화되거나 세포 표면에 발현시킨 후 얻어지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0039] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0040] 알파-자일로시다아제 변이체 생산
- [0041] 알파-자일로시다아제를 클로닝하고 유전자 내로(예를 들어, 알파-자일로시다아제 유전자) 치환, 결실 또는 삽입을 도입하는 많은 방법이 당업계 잘 알려져 있다.일반적으로 유전자의 클로닝 및 상기 유전자 내로 돌연변이를 도입(무작위 및/부위 특이적)하는 표준 과정이 본 발명의 알파-자일로시다아제 변이체를 얻기 위해 사용될 수

있다. 적합한 기술의 추가적 설명을 위해 본원의 실시예 1 및 (Sambrook et al.(1989)Molecular cloning:A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab.,Cold Spring Harbor, NY;Ausubel, F.M. et al.,(eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley 및 Sons, 1995;Harwood, C.R.,및 Cutting, S.M.(eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley 및 Sons, 1990), 및 WO 96/34946를 참조.

[0042] 발현 벡터

[0043] 본 발명의 효소를 코딩하는 DNA 구조를 포함하는 재조합 발현 벡터는 용이하게 재조합 DNA 과정에 놓일 수 있는 임의의 벡터일 수 있다. 벡터의 선택은 종종 도입되는 숙주 세포에 의존적일 것이다. 따라서, 벡터는 자발적으로 복제하는 벡터일 수 있는데, 즉 벡터는 염색체 외 실체로서 존재하고, 그것의 복제는 예를 들어 플라스미드와 같은 염색체의 복제에 독립적이다. 택일적으로, 벡터는 숙주세포 내로 도입되어 부분적 또는 전체적으로 숙주세포 게놈 내로 통합되어 통합된 염색체와 함께 복제되는 것일 수도 있다. 벡터는 바람직하게는 본 발명의 효소를 코딩하는 DNA 서열이 DNA의 전사에 필요한 추가적 분절에 작동적으로 연결된 발현 벡터이다. 일반적으로, 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 양쪽 모두의 요소를 함유할 수 있다. 용어, "작동적으로 연결된"은 분절이 그것의 의도된 목적, 예를 들어 프로모터에서 전사가 개시되어 효소를 코딩하는 DNA 서열에서 수행하는 것과 같은 목적에 맞게 작용하도록 배열된 것을 가리킨다.

[0044] 프로모터는 선택의 숙주 세포 내에서 전사적 활성을 보이는 임의의 DNA 서열일 수 있고 숙주 세포에 상동 또는 비상동인 단백질을 코딩하는 유전자로부터 유도될 수 있다. 세균의 숙주 세포 내 사용을 위하여 적합한 프로모터의 예는 *Bacillus licheniformis* 말토제닉 아밀라제 유전자, *Bacillus subtilis* 알파-아밀라제 유전자, *Bacillus amyloliquefaciens* 알파-아밀라제 유전자, *Bacillus subtilis* 알카리 프로테아제 유전자, 또는 *Bacillus pumilus* xylosidase 유전자 유래 프로모터, 또는 파지 Lambda PR 또는 PL 프로모터, 파지 T7 프로모터 또는 *E. coli* lac, trp 또는 tac 프로모터를 포함한다. 본 발명의 효소를 코딩하는 DNA 서열은 또한, 필요하다면, 적당한 터미네이터에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0045] 본 발명의 재조합 벡터는 또한 벡터가 문제의 숙주 세포 내에서 복제하는 것을 가능하게 하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 선택가능한 마커를 포함할 수 있는데, 예를 들어 숙주 세포 내 결점을 보완하는 유전자 산물, 또는 예를 들어, 카나마이신, 클로람페니콜, 에리트로마이신, 테트라사이클린, 스펙티노마이신 등과 같은 항생제에 대한 내성, 또는 중금속 이나 제초제에 대한 내성을 코딩하는 유전자이다.

[0046] 본 발명의 효소를 숙주 세포의 분비 경로속으로 유도하기 위해, 분비 신호 서열(또한 리더 서열, 프리프로 서열 또는 프리 서열로서 알려짐)이 재조합 벡터 내에 제공될 수 있다. 분비 신호 서열은 올바른 판독 프레임 내의 효소를 코딩하는 DNA서열로 연결된다. 분비 신호 서열은 보통 효소를 코딩하는 DNA 서열에서 5'에 위치된다. 분비 신호 서열은 정상적으로 효소와 관련된 것 일 수 있고 또는 다른 분비 단백질을 코딩하는 유전자로부터 올 수 있다.

[0047] 본 효소, 프로모터 및 선택적으로 터미네이터 및/또는 분비 신호 서열, 각각에 대하여 코딩하는 DNA 서열을 리게이션거나, 적당한 PCR 증폭 계획에 의해 이들 서열을 모으고, 복제 또는 통합에 필요한 정보를 함유하는 적당한 벡터 속으로 그

[0048] 들을 삽입하는데 사용되는 과정은 당업계 숙련자에 잘 알려져 있다(예를 들어, Sambrook et al., 상기 인용 문헌 참조)

[0049] 숙주 세포

[0050] 숙주 세포 속으로 도입된 본 효소를 코딩하는 DNA 서열은 문제의 숙주에 상동 또는 비상동일 수 있다. 만약 숙주세포에 상동이면, 즉 숙주 세포에 의하여 천연적으로 생산되면, 그것은 일반적으로 그것의 천연적 환경보다는 다른 프로모터 서열이나 만약 적용가능하다면 다른 분비 신호 서열 및/또는 터미네이터 서열에 작동가능하게 연결될 것이다. 용어 "상동성"은 문제의 숙주 생체에 본래의 효소를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 것이 의도된다. 용어 "비상동"은 천연적으로 숙주 세포에 의해 발현되지 않은 DNA 서열을 포함하는 것이 의도된다. 따라서, DNA 서열은 다른 생체 유래일 수 있고, 또는 그것은 합성 서열일 수 있다.

[0051] 본 발명의 DNA 구조 또는 재조합 벡터가 도입되는 숙주 세포는 본 효소를 생산할 수 있는 임의의 세포일 수 있고 세균, 효모, 균류 및 식물을 포함하는 고등 진핵 세포를 포함한다.

[0052] 배양에서, 본 발명의 효소를 생산할 수 있는 미생물 숙주 세포의 예는, 균주 *Corynebacterium glutamicum*과 같은 균주, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B.*

amyloliquefaciens, B. coagulans, B. circulans, B. lautus, B. megaterium 또는 B. thuringiensis와 같은 Bacillus, 또는 S. lividans 또는 S. murinus와 같은 Streptomyces, 또는 Escherichia coli와 같은 그람-음성 세균이다.

[0053] 세균의 형질전환은 원형질체 형질전환, 전기 천공법, 접합에 의해, 또는 원래 알려진 방식으로 반응능 세포를 사용하여 수행할 수 있다(참고, Sambrook et al., 상기 문헌).

[0054] E. coli와 같은 세균 속에서 효소를 발현시킬 때, 효소는 전형적으로 불용성 과립으로서(봉입체로 알려짐) 세포 질 내에 보유되거나, 세균 분비 서열에 의해 원형질막주위 공간으로 유도될 수 있다. 전자의 경우에, 세포는 용해되어 과립이 회수되고 변성된 다음 효소는 변성제의 회식에 의하여 리폴딩된다. 후자의 경우, 효소는 예를 들어 초음파 처리 또는 삼투압 쇼크에 의해 세포를 파괴하여 원형질막주위 공간의 함유물을 방출하고 효소를 회수하여 원형질막주위 공간으로부터 회수될 수 있다.

[0055] Bacillus 또는 Streptomyces 균주와 같은 그람-양성 세균 내에서 효소를 발현시킬 때, 효소는 세포질 내에 보유될 수 있거나, 세균의 분비 서열에 의해 세포외 배지로 유도될 수 있다. 후자의 경우에, 효소는 아래 기술되는 바와 같이 배지로부터 회수될 수 있다.

[0056] 알파-자일로시다아제를 생산하는 방법

[0057] 본 발명은 본 발명에 따르는 분리된 효소를 생산하는 방법을 제공하는데, 효소를 코딩하는 DNA 서열을 이용하여 형질전환된 적합한 숙주 세포는 효소의 생성을 가능케하는 조건하에서 배양되고 결과의 효소는 세포내에 생산된다.

[0058] 효소를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터가 비상동 숙주 세포 속으로 형질전환될 때, 본 발명의 효소의 비상동 재조합체 생산을 가능케 할 수 있다. 이로써 상동성 불순물이 부존재하는 것을 특징으로 하는 고도로 정제된 알파-자일로시다아제를 제작할 수 있다.

[0059] 형질전환된 숙주 세포를 배양하는데 사용되는 배지는 문제의 숙주 세포를 성장시키는데 적합한 임의의 전통적 배지일 수 있다. 발현된 알파-자일로시다아제 및 변이효소는 세포질 내에 존재하며, 원심분리 또는 여과를 통해 배지에서 세포를 분리하고, lysozyme 또는 초음파 파쇄를 통해 조효소 액을 얻어낸 후, 황산 암모늄과 같은 염에 의하여 배지의 단백질 성분을 침전시키는 것을 포함하는 주지의 과정에 이어서, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피 과정에 의해 그것으로부터 회수될 수 있다.

[0060] 일반 분자생물학 방법

[0061] 본 발명의 명세서에서 달리 언급하지 않는다면 DNA 조작 및 형질전환은 분자 생물학의 표준 방법을 사용하여 수행된다(Sambrook et al.(1989) Molecular cloning : A laboratory manual, Cold Spring Harborlab., Cold Spring Harbor, N Y ; A usubel, F.M. et al.(eds.) "Current protocols in Molecular Biology". JohnWiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting,S. M. (eds.)"Molecular Biological Methods for Bacillus". JohnWiley and Sons, 1990).

[0062] DNA 조작을 위한 효소

[0063] 본 발명의 명세서에서 달리 언급하지 않는다면 DNA 조작을 위한 모든 효소, 예를 들어 제한 엔도뉴클레아제, 리가아제 등은 Fermentas에서, DNA polymerase는 Roche로부터 얻는다. DNA 조작을 위한 효소는 공급자의 설명서에 따라서 사용된다.

[0064] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0065] 본원 발명자는 지속성 탄수화물 분해효소에 속한 알파-자일로시다아제의 양자공여/수용체 촉매기가 변이된 가공 효소가 가수분해활성을 현저하게 저하되지만, 좋은 이탈기인 불소를 가지는 알파-자일로실 플로라이드를 당공여체로 사용하면, 상기 변이 효소들이 성공적으로 당전이 반응을 수행하여 포도당, 말토오스 및 이들의 2-수산기(hydroxyl group)이 다른 반응기로 치환된 유사체를 비환원성 말단에 가지는 올리고당 및 배당체들을 당수용체로 사용하여, 자일로스 한 분자를 당수용체의 비환원성 말단 6-수산기 위치에 알파-당쇄결합으로 위치선택적, 입체특이적으로 당전이시킴을 발견하였다. 특히 상기 효소반응을 통해 생성된 당전이산물의 비환원성 말단은 6-수산기를 가지지 않는 자일로스이어서 이차 당전이반응의 당수용체로 사용되지 않고, 반응액 내 유일한 당전이 산물로 축적되어 해당 당전이 산물을 용이하게 고순도로 제조할 수 있다는 것을 발견하여 본원 발명을 완성하였다.

발명의 효과

[0066] 이상 살펴본 바와 같이, 본원 발명은 지속성 탄수화물 분해효소에 속하는 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기에 대한 변이를 통해 가수분해 활성은 제거되었으나 당전이 활성을 유지하는 변이효소를 이용하여 포도당, 만노오스 및 이들의 2-수산기(hydroxyl group)이 다른 반응기로 치환된 유사체를 비환원성 말단에 가지는 올리고당 및 배당체들의 비환원성 말단 6-수산기 위치에 자일로스 한 분자를 알파-당쇄결합을 통해 전이시킴으로써 당전이산물을 고수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 지속성 탄수화물 분해효소에 속하는 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기인 aspartate를 alanine으로 변이시킨 후, 알파-자일로실 플로라이드를 당공여체로 포도당 비환원성 말단에 가지는 당 또는 배당체를 당수용체로 이용하면 일어나는 당전이 반응을 보여주는 모식도이다.

도 2는 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈 유전자를 증폭한 PCR 산물의 전기영동 사진이다.

도 3은 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈 유전자를 포함하는 pETYicI6xH의 제한효소 지도를 나타낸다.

도 4는 대장균에서 생산된 재조합 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈를 Ni-NTA chromatography를 통해 정제하는 과정 중 얻어지는 시료를 보여주는 SDS-PAGE 사진이다.

도 5는 pH에 따른 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈의 활성 변화를 보여주는 그림이다.

도 6은 온도에 따른 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈의 활성 변화를 보여주는 그림이다.

도 7은 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기인 aspartate를 alanine으로 변이시킨 변이체 유전자를 포함하는 pETYicI-D482A6xH 제한효소 지도를 나타낸다.

도 8은 알파-자일로실 플로라이드와 4-니트로페닐 베타 글루코사이드를 기질로 하여 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈 변이체를 이용한 당전이 반응 산물을 분석한 Thin layer chromatography 사진이다.

도 9는 E. coli K-12 알파-자일로시데이즈의 양자공여/수용체 촉매기인 ASp482를 임의의 아미노산 잔기로 치환한 변이체 라이브러리에서 선발한 변이체 조효소액을 이용하여 알파-자일로실 플로라이드와 4-니트로페닐 베타 글루코사이드를 기질로 하여 당전이 반응 후, 반응산물에 대한 thin layer chromatography 이후 자외선하에서 4-니트로페닐을 가지는 화합물을 분석한 결과 사진이다.

도 10은 Bacillus halodurans C-125의 양자공여/수용체 촉매기인 ASp481를 알리닌으로 치환한 변이체 효소를 이용하여 알파-자일로실 플로라이드와 4-니트로페닐 베타 글루코사이드를 기질로 하여 당전이 반응을 수행한 반응액을 분석한 질량 분석 스펙트럼과 산물의 구조식을 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0069] 실시예 1: E. coli K-12 유래 알파-자일로시다아제 유전자(yicI) 클로닝 및 알파-자일로시다아제(YicI) 생산

[0070] 1-1 E. coli 알파-자일로시다아제 유전자 증폭

[0071] E. coli K-12를 LB 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 50ml에 접종하여 37℃에서 배양하고 원심분리하여 균체를 회수하고 염색체 DNA를 분리하였다(Dubnau, D. and R. D. Abenson, 1971, J. Mol. Biol., 56, 209-221). 즉, 회수된 균체에 라이소자임을 처리하여 원형질체 세포로 만든 다음 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 넣어 세포를 완전히 파괴한 후 전체 반응액에 대해 농도가 1몰이 되도록 소듐 클로라이드를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 이것을 원심분리하여 상등액만을 취하고, 페놀:클로로포름:아이소아밀알콜의 혼합액(각 용액의 부피의 비 = 25:24:1)을 상등액과 동일한 부피로 첨가하여 액 중의 단백질 등 불순물을 제거하였다. 이 과정을 수회 반복하였다. 두 배 부피의 99%의 에탄올을 첨가하여 침전시키고, 이것을 유리막대로 감아서 분리하여 1/10xSSC 완충용액(3M 소듐 클로라이드, 0.3M 소듐 시트레이트)에 녹였다.

[0072] 상기 E. coli 알파-자일로시다아제(이하 YicI)을 암호화하는 유전자는 하기 표 1의 프라이머를 이용하여, 하기 표 2의 방법으로 PCR을 수행하여 YicI 유전자를 분리하였다.

[0073] 상기 YicI 유전자를 분리하기 위하여 정방향 프라이머 YicITOP (5'-CAG AAC TAA GGA ACG CAT ATG AAA ATT AGC-3' 서열번호 7) 및 역방향 프라이머 YicIEND (5'-ATC AAG CTC GAG CAA CGT AAT TGT CAG CGC-3', 서열번호 8)를 각각 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

	서열	서열번호
정방향 프라이머 YicITOP	5'-CAG AAC TAA GGA ACG CAT ATG AAA ATT AGC-3'	7
역방향 프라이머 YicIEND	5'-ATC AAG CTC GAG CAA CGT AAT TGT CAG CGC-3'	8

[0075] E. coli K-12 균주 염색체 DNA에 대해 상기 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 2.2 kb임을 확인하였다(도 2). 상기 PCR의 조건은 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

표 2

단계(STEP)	온도	반응시간
First(1st) denaturation	95 °C	5 min
Second(2st) denaturation	95 °C	1 min
Annealing	55 °C	30 sec
Extension	72 °C	1min 30sec
Cycle	go to denaturation	33 cycles
Final extension	72 °C	7 min

[0077] 1-2. E. coli 알파-자일로시다아제 유전자 클로닝

[0078] 형질전환을 위하여, 5 ml LB 액체 배지에 숙주 세포인 E. coli MC1016(New England Biolab(NEB, USA)를 접종하여 37°C에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0 ml을 새로운 LB 액체 배지 50 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하였다.

[0079] 상기 흡광도를 확인한 배양액 1.5 ml를 4°C에서 7000 x g의 조건으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 뒤, 0.75 ml의 형질전환용액I(50 mM CaCl₂)으로 현탁하고 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 이후 4°C에서 6000 x g의 조건으로 2분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 회수된 균체를 0.15 ml의 형질전환용액II(100 mM CaCl₂)로 현탁하여 얼음 속에서 30분간 방치하였다.

[0080] 상기 실시예 1-1에서 증폭한 YicI 유전자를 37°C에서 6시간 동안 제한효소 NdeI과 XhoI로 처리하고, 이를 동일한 제한 효소로 처리한 pET-29b 발현벡터(Novagen, 독일)와 라이게이션한 용액을 상기 형질전환용 E. coli MC1061(New England Biolab, 미국) 0.2 ml과 혼합하고, 1시간 방치한 후 42°C에서 2분간 열 충격을 주었다. 상기 열 충격을 준 혼합액에 0.8 ml의 LB 액체 배지를 혼합한 후, 37°C에서 1시간 배양시켰다. 상기 1시간 동안 배양한 배양액을 카나마이신(최종농도 20 µg/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

[0081] 1차 선별된 균주를 카나마이신이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37°C에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득하였다. 플라스미드 분리키트(Qiagen, USA)로 회수된 균체로부터 플라스미드를 분리하고 상기과 동일한 NdeI과 XhoI제한 효소를 이용하여 상기과 동일한 조건에서 절단하여, 약 2.2 kb의 크기의 YicI 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.

[0082] 상기 라이게이션을 통하여 하여 pETYicI6xH를 제조하였으며, 제조한 재조합 벡터 pETYicI6xH의 벡터의 개열지도를 도 3에 나타내었다. 상기 pETYicI6xH 벡터는 E. coli 알파-자일로시다아제(YicI) 유전자를 포함하며, 상기 알파-자일로시다아제 유전자의 3' 말단에 8개의 부가적인 아미노산 잔기(Leu-Glu-6His)를 포함하고 있다.

[0083] 1-3 형질전환체의 배양 및 YicI의 생산

[0084] 상기에서 제조한 pETYicI6xH 벡터를 E. coli BL21(DE3)에 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 형질전환시킨 후 카나마이신 내성여부를 확인하여 상기 벡터가 형질전환된 균주 즉, 형질전환체를 선별하였다 선별한 형질전환체는 카나마이신이 함유된 LB 액체 배지 2.5 L에 접종하고 37°C에서 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.6이 될 때

IPITG를 최종농도 0.5 mM로 첨가하여 37℃에서 5시간 배양하였다.

[0085] 1-4. 효소 정제

[0086] 상기에서 선별한 형질전환주를 배양한 후, 4℃에서 7,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 300 mM NaCl과 10 mM 이미다졸이 함유된 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 현탁한 후, 상기 현탁한 균체를 초음파 분쇄하였다. 상기 초음파 분쇄를 수행한 배양액을 10,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 상기 수득된 상등액은 Ni-NTA 친화 크로마토그래피에 주입하여, 정제하였다.

[0087] 재조합 벡터 pETYicI6xH로 형질전환시킨 E. coli BL21(DE3)에서 생산된 YicI의 정제단계별 시료의 전기영동 사진을 도 4에 나타내었다. 상기 도 4의 M은 사이즈 마커이고, 레인 1은 형질전환체를 초음파 분쇄하여 수득한 상등액이고, 레인 2는 상기 초음파 분쇄 후 수득한 상등액의 시료를 Ni-NTA 친화 크로마토그래피로 정제한 YicI 효소이다.

[0088] 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 YicI 효소(레인 2)는 Ni-NTA 친화 크로마토그래피 과정을 통하여 효율적으로 정제된 것을 확인할 수 있으며, SDS-PAGE상에서 상기 알파-자일로시다아제의 크기는 약 88 Da의 분자량을 나타내어 상기 YicI의 아미노산 서열로부터 유추된 이론적 분자량과 유사한 값을 나타내었다.

[0089] 실시예 2: E. coli K-12 유래 알파-자일로시다아제 (YicI)의 특성

[0090] 2-1 효소 역가

[0091] 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 용해된 5 mM 파라나이트로페닐 알파-자일로사이드 용액 450 μ l를 37℃에서 5분간 예열하고, 효소 50 μ l를 넣고 10분간 반응시킨다. 1M sodium bicarbonate 용액 500 μ l를 넣어 반응을 중지시킨 후, 405 nm 에서 흡광도를 측정하여 생성된 나이트로 페놀의 양을 측정한다. 효소를 넣지 않은 반응은 대조군으로 사용한다. 1 unit은 특정 반응조건하에서 1분 동안 나이트로 페놀 1 μ mol 을 형성하는데 필요한 효소의 양을 말한다.

[0092] 2-2 pH 특성

[0093] 본원 발명의 YicI의 최적 반응 pH를 결정하기 위해, 다양한 pH 범위의 완충액(pH 4, 5, 6 sodium acetate buffer; pH 6, 7, 8 sodium phosphate buffer; pH 8, 9 sodium borate buffer) 각각에 파라나이트로페닐 알파-자일로사이드를 첨가하여 5 mM 파라나이트로페닐 알파-자일로사이드 기질 용액을 제조하고, 실시예 1-4의 정제된 YicI 효소액을 이용하여 실시예 2-1의 방법으로 효소역가를 측정하고 최고 흡광도 값을 기준으로 상대적 활성을 측정하였다.

[0094] 도 5는 상기 YicI 효소의 pH에 따른 효소활성을 나타낸 것으로, pH 6.5에서 최적의 역가를 가지며 pH 5.0 내지 7.5에서 50 % 이상의 역가를 유지하였다.

[0095] 2-3. 온도 특성

[0096] 본원 발명의 E. coli 유래 알파-자일로시다아제의 최적 반응 온도를 결정하기 위해, 50 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)를 이용하여 5 mM 파라나이트로페닐 알파-자일로사이드 기질 용액을 제조하고, 20 내지 60℃의 다양한 온도범위로 기질 용액을 가열시킨 후, 실시예 2-1의 방법에 따라 효소활성을 측정한 후, 흡광도를 측정하여 상대적 효소활성을 측정하였다.

[0097] 도 6은 YicI 효소의 온도에 따른 효소활성을 나타낸 것으로, 50℃에서 최적의 역가를 가지며 40 내지 65℃에서 약 50% 이상의 역가를 유지하였다.

[0098] 실시예 3: E. coli 유래 알파-자일로시다아제 변이효소의 제조 및 생산

[0099] 3-1. YicI 양자공여체 돌연변이체 (YicI-D482A) 제작

[0100] 상기 YicI 효소의 양자공여체 촉매기인 Asp482를 알라닌으로 치환하기 위해 YicID482A-F (서열번호 9)를 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

	서열	서열번호
YicID482A-F	5-GTA CAC TGG GGT GGC GCG TGT TAC GC TAA CTA C-3	9

[0102] 상기 실시예 1-2의 재조합 벡터 pETYicI6xH에 대해 상기 YicID482A-F를 정방향 프라이머로, 재조합 벡터에 결합하는 T7 terminator 프라이머 (5-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3; 서열번호 10)역방향 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하여 PCR 산물(YicID482A-rear)을 획득하였다. 또한 상기 재조합 벡터 pETYicI6xH에 대해 상기 T7 promoter 프라이머 (5-TAATACGACTCACTATAGGG-3; 서열번호 11)를 정방향 프라이머로, 상기 YicID482A-rear을 역방향 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하여 본 발명이 제공하는 알파-자일로시데이즈 변이효소, 즉 YicI 효소의 양자공여체 촉매기가 Alanine으로 치환된 YicI-D482A를 암호화하는 유전자를 함유하는 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 약 2.2 kb임을 확인하였다. 상기 두 PCR의 조건은 상기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0103] 상기 YicI-D482A를 암호화하는 유전자를 함유하는 PCR 산물을 NdeI과 XhoI으로 절단한 후, 상기 실시예 1-2에서와 같이 pET29b에 라이게이션하여 재조합 벡터 pETYicI-D482A6xH를 제조하였으며, 상기 실시예 1-3 및 1-4에 따라 형질전환체 제조, 및 YicI-D482A를 생산하였다. 상기 재조합 벡터 pETYicI-D482A6xH의 벡터의 개열지도도 도 7에 나타내었다. 상기 pETYicI-D482A6xH 벡터는 상기 YicI 효소의 양자공여체 촉매기가 alanine으로 치환된 알파-자일로시다아제 변이효소와 효소의 C-말단에 8개의 추가적인 아미노산 잔기(Leu-Glu-6xHis)를 포함하는 유전자를 가지고 있다.

[0104] 3-2. YicI 양자공여체 돌연변이체 (YicI-D482A) 생산

[0105] 상기 제조한 pETYicI-D482A6xH 벡터를 상기 실시예 1-3의 방법으로 형질전환 후, 실시예 1-4의 방법에 따라 정제하였다.

[0106] 실시예 4. E. coli 유래 알파-자일로시다아제 변이효소 (YicI-D482A)의 가수분해 활성 측정

[0107] YicI-D482A의 가수분해활성을 측정하기 위해 1 mM 4-나이트로페닐 알파-자일로스와 알파-자일로실 플로라이드에 대한 효소 활성을 측정하였다. 4-나이트로페닐 알파-자일로스를 기질로 하여서는 상기 실시예 2-1에 따라 각 기질 농도당 반응속도를 측정하였다. 알파-자일로실 플로라이드의 경우 기질을 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 후 상기 실시예 2-1에 따라 반응시키면서, 효소반응에 의해 유리되는 불소의 양을 불소이온 측정기(Orion 96-09 combination fluoride ion electrode)를 이용하여 측정하여 효소 반응속도를 측정하였다. 상기 방법에 따라 얻어진 반응속도를 YicI 효소의 반응속도와 상대적으로 비교하여 하기 표 4에 정리하였다.

표 4

	YicI	YicI-D482A
4-나이트로페닐 알파-자일로스	100	0
알파-자일로실 플로라이드	100	3.7×10^{-2}

[0109] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 4-나이트로페닐 알파-자일로스는 전혀 분해하지 못하였으나, 알파-자일로실 플로라이드를 기질로 하여서는 wild type YicI 효소에 비해 3.7×10^{-4} 배의 낮은 가수분해 활성을 나타내었다.

[0110] 실시예 5: 알파-자일로실 플로라이드와 4-나이트로페닐-베타-글루코사이드를 이용한 YicI-D482A를 이용한 당전이 반응

[0111] 5-1. 알파-자일로실 플로라이드와 4-나이트로페닐-베타-글루코사이드(4-nitrophenyl-β-D-glucoside)를 이용한 당전이 반응 산물 생성

[0112] 당전이 반응을 수행하기 위해 0.2 mmole 알파-자일로실 플로라이드와 0.125 mmole의 4-나이트로페닐-베타-글루코사이드를 5 mL의 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 후, 상기 실시예 3-2에서 정제한 YicI-D482A를 넣고 37℃에서 반응을 진행하였고, 박막크로마토그래피(thin layer chromatography)방법을 통해 반응액을 분석하였다. 상기 반응의 TLC 결과를 도8에 나타내었다. 도 8에서 알 수 있듯이 당 수용체로 사용된 4-나이트로페닐-베타-글루코사이드가 모두 소비되었으며, 단 한 개의 당전이 산물만이 생성됨을 확인할 수 있다.

[0113] 5-2. 알파-자일로실 플로라이드와 4-나이트로페닐-베타-만노사이드(4-nitrophenyl-β-D-mannoside)를 이용한 당전이 반응산물 생성

[0114] 당전이 반응을 수행하기 위해 0.07 mmole 알파-자일로실 플로라이드와 0.05 mmole의 4-나이트로페닐-베타-글루

코사이드를 3 mL의 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 후, 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하여 반응산물이 형성됨을 확인하였다.

[0115] 5-3. 알파-자일로실 플로라이드와 4-나이트로페닐-2-데옥시-2-아자이드-베타-글루코사이드(4-nitrophenyl 2-deoxy-2-azido-β-D-glucoside)를 이용한 당전이 반응

[0116] 당전이 반응을 수행하기 위해 0.12 mmole 알파-자일로실 플로라이드와 0.06 mmole의 4-나이트로페닐-2-데옥시-2-아자이드-베타-글루코사이드를 3 mL의 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 후, 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하였다. 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하여 반응산물이 형성됨을 확인하였다.

[0117] 5-4. 알파-자일로실 플로라이드와 4-나이트로페닐-베타-셀로바이오사이드(4-nitrophenyl-β-D-cellobioside)를 이용한 당전이 반응

[0118] 당전이 반응을 수행하기 위해 0.27 mmole 알파-자일로실 플로라이드와 0.12 mmole의 4-나이트로페닐-베타-셀로바이오사이드를 5 mL의 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 후, 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하였다. 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하여 반응산물이 형성됨을 확인하였다.

[0119] 5-5. 알파-자일로실 플로라이드와 2,4-다이나이트로페닐-2-데옥시-2-플로로-베타-셀로바이오사이드(2,4-dinitrophenyl 2-deoxy-2-fluoro-β-D-cellobioside)를 이용한 당전이 반응

[0120] 당전이 반응을 수행하기 위해 8.68 μmole 알파-자일로실 플로라이드와 8.68 μmole의 2,4-다이나이트로페닐-2-데옥시-2-플로로-베타-셀로바이오사이드를 5 mL의 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 후, 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하였다. 상기 실시예 5-1에서와 같은 방법으로 반응을 진행하고 TLC로 분석하여 반응산물이 형성됨을 확인하였다.

[0121] 실시예 6: 당전이 반응산물 정제

[0122] 상기 실시예 5-1에서 5-5의 반응액을 C18 SEP PAK cartridge (Waters)에 주입한 후, 물로 세척하여 비 아틸성당을 제거하고, 에탄올로 당전이 산물을 용출하였다. 용출된 반응산물액을 감압농축기로 에탄올을 제거하였다. 잔존물을 2 mL의 피리딘과 동량의 무수 아세트산을 첨가하여 모든 수산기를 아세틸화 시킨 후, 용매를 제거하고 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 당전이 산물을 분석하였다. 다시 감압농축을 통해 용매를 완전히 제거한 후 얻어진 당전이 산물의 무게를 이용하여 반응에 사용된 당 수용체 대비 당전이 산물 생산 수율을 계산하였다. 생성된 산물의 당전이 수율을 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

실시예	당 공여체	당 수용체	수율 (%)
5-1	알파-자일로실 플로라이드	4-니트로페닐 베타 글루코사이드	96
5-2		4-니트로페닐 베타 만노코사이드	93
5-3		4-니트로페닐 2-데옥시 2-아지도-베타 글루코사이드	88
5-4		4-니트로페닐 베타 셀로바이오사이드	80
5-5		4-니트로페닐 2-데옥시 2-플로로-베타 셀로바이오사이드	90

[0124] 실시예 7: 당전이 산물의 구조분석

[0125] 상기 실시예 6에서 정제한 반응산물을 메탄올에 녹이고, acetic anhydride를 이용하여 모든 수산기를 아세틸화한 후, 감압농축을 통해 용매를 제거하였다. 잔존물을 Silica gel chromatography를 통해 아세틸화된 당전이 산물만을 분리하고, 당전이 산물을 클로로포름 (CDC13)에 녹인 후 엔엠알(400 MHz using a Bruker AV-400 spectrometer) 분석을 통해 구조를 결정하였다.

[0126] 7-1. 4-Nitrophenyl[(2,3,4-tri-O-acetyl-α-D-xylopyranosyl)-(1→6)-O-2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside. (상기 실시예 5-1 반응산물)

[0127] ¹H NMR (δ ppm, CDCl₃, 400MHz): 8.30 (m, 2H), 7.12 (m, 2H) (C₆H₄NO₂); 5.47 (t, 1H, J_{3',4'} 10.0 Hz, H-3),

5.31 (t, 1H, $J_{3,4}$ 8.8 Hz, H-3), 5.26 (t, 1H, $J_{2,3}$ 9.2Hz, H-2), 5.17 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.6 Hz, H-1), 5.00 (t, 1H, $J_{4,5}$ 10.0 Hz, H-4), 4.97 (d, 1H, $J_{1',2'}$ 3.2 Hz, H-1'), 4.88 (dt, 1H, $J_{4',5'a} = J_{4',5'b}$ 6.0 Hz, H-4'), 4.78 (dd, 1H, $J_{2',3'}$ 10.0 Hz, H-2'), 3.97(m, 1H, H-5), 3.78(dd, 1H, $J_{5,6a}$ 8.0 Hz, & $J_{6a,6b}$ 10.4 Hz, H-6a), 3.64(dd, 1H, $J_{5'a,5'b}$ 10.8 Hz, H-5'a), 3.45(dd, 1H, $J_{4',5'b}$ 6.0 Hz, H-5'b), 3.43 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 2.4 Hz, H-6b); 2.08-1.73 (6s, 18H, CH_3CO). ^{13}C NMR (δ ppm, CDCl_3 , 100 MHz): 170.16, 170.06, 170.03, 169.70, 169.40, 169.19 (CH_3CO); 161.24, 143.32, 126.22 (2C), 116.50 (2C) ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$); 98.14, 95.69, 73.36, 72.41, 70.97, 70.95, 68.99, 68.85, 68.72, 66.22, 58.41(sugar ring); 20.81, 20.74, 20.64, 20.61, 20.56, 20.52, 20.16 (CH_3CO). EISMS: Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{NO}_{22}+\text{Na}^+$:852.7. Found:852.7.

[0128] 7-2 4-Nitrophenyl [(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)-O-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-mannopyranoside.(상기 실시예 5-2 반응산물)

[0129] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): d 8.32 (m, 2 H, Ar-H), 7.16 (m, 2 H, Ar-H), 5.71 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 2.0 Hz, H-3), 5.52 (t, 1H, $J_{3',4'}$ 10.0 Hz, H-3'), 5.35 (d, 1H, $J_{1,2}$ 0.8 Hz, H-1), 5.20 (t, 1H, $J_{3,4}$ 9.0 Hz, H-4), 5.17 (dd, 1H, H-3), 5.02 (d, 1H, $J_{1',2'}$ 3.6 Hz, H-1'), 4.90 (ddd, 1H, H-4'), 4.81 (dd, 1H, $J_{2',3'}$ 10.4 Hz, H-2'), 3.96 (m, 1H, H-5), 3.91 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 8.4 Hz, H-6a), 3.68 (dd, 1H, $J_{4',5'a}$ 5.6 Hz & $J_{5'a,5'b}$ 10.8 Hz, H-5'a), 3.51 (t, 1H, $J_{4',5'b} = J_{5'a,5'b}$ 10.8 Hz, H-5'b), 3.46 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 1.2 Hz, $J_{6a,6b}$ 10.0 Hz, H-6), 2.25 (s, 3H, CH_3CO), 2.11 (s, 3H, CH_3CO), 2.10 (s, 3H, CH_3CO), 2.09 (s, 3H, CH_3CO), 2.03 (s, 3H, CH_3CO), 1.74 (s, 3H, CH_3CO). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz): d 170.42, 170.39, 170.23, 170.06, 169.95, 169.89 (CH_3CO); 161.36, 143.48, 126.43 (2C), 116.63 (2C) (Ar-C); 96.29 (C-1), 95.84 (C-1'), 74.13 (C-5), 71.28 (C-2'), 70.85 (C-3), 69.16, 69.13 (C-3' & 4'), 68.69 (C-2), 66.68 (C-6), 66.24 (C-4), 58.70 (C-5'); 21.00, 20.97 (2C), 20.87, 20.73, 20.37 (CH_3CO). EISMS: Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{NO}_{22}+\text{Na}^+$:852.7. Found:852.7.

[0130] 7-3 4-Nitrophenyl [(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)-2-deoxy-2-azido-O-3,4-di-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (상기 실시예 5-3 반응산물)

[0131] ^1H NMR (δ ppm, CDCl_3 , 400 MHz):d 8.35 (m, 2 H, Ar-H), 7.21 (m, 2 H, Ar-H), 5.51 (t, 1 H, $J_{2',3'} = J_{3',4'}$ 10.0 Hz, H-3'), 5.13 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9.6 Hz, $J_{3,4}$ 10.0 Hz, H-3), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.4 Hz, H-1), 5.01 (d, 1H, $J_{1',2'}$ 3.2 Hz, H-1'), 4.95 (t, 1H, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 4.90 (dd, 1H, H-4'), 4.80 (dd, 1H, H-2'), 3.96 (m, 1H, H-5), 3.83 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10.0 Hz, H-2), 3.80 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 8.0 Hz, $J_{6a,6b}$ 10.4 Hz, H-6a), 3.69 (dd, 1H, $J_{5'a,5'b}$ 10.4 Hz, H-5'a), 3.47 (t, 2H, $J_{5,6b}$ 10.4 Hz, $J_{4',5'b}$ 10.4 Hz, H-6b & H-5'b), 2.12 (s, 3H, CH_3CO), 2.09 (s+s, 6H, CH_3CO), 2.07 (s, 3H, CH_3CO), 1.77 (s, 3H, CH_3CO). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz): d 170.43, 170.28, 169.98 (2 C), 169.83 (CH_3CO); 161.25, 143.78, 126.56 (2C), 116.94 (2C) (Ar-C); 99.81 (C-1), 95.90 (C-1'), 73.62 (C-5), 72.32 (C-3), 71.21 (C-2'), 69.19, 69.12, 68.95 (C-3', 4' & 4), 66.40 (C-6), 63.73 (C-2), 58.68 (C-5'); 20.99, 20.91, 20.86 (2C), 20.44 (CH_3CO).

[0132] 7-4 4-Nitrophenyl [(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)-O-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (상기 실시예 5-4 반응산물)

[0133] ^1H NMR (δ ppm, CDCl_3 , 400MHz): 8.18 (m, 2H), 7.01 (m, 2H) ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$); 5.43 (t, 1H, $J_{3',4''}$ 9.6 Hz, H-3''), 5.29 (t, 1H, $J_{3',4'}$ 9.2 Hz, H-4'), 5.17 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.6 Hz, H-1), 5.14 (m, 2H, H-2 & H-3'), 5.03 (d, 1H, $J_{1'',2''}$ 4.0 Hz, H-1''), 4.98 (m, 2H, H-4'' & H-3), 4.86 (dd, 1H, $J_{2',3'}$ 9.6 Hz, H-2'), 4.78 (dd, 1H, $J_{2'',3''}$ 10.4 Hz, H-2''), 4.57 (d, 1H, $J_{1',2'}$ 7.6 Hz, H-1'), 4.52 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 2.0 Hz & $J_{6a,6b}$ 12.0 Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6.0 Hz, H-6b), 3.93~3.82 (m, 3H, H-5, H-5' & H-5''), 3.74 ~ 3.58 (m, 4H, H-4, H-5'', H-6'a & H-

6'b), 2.10 ~ 1.97 (8s, 27H, CH₃CO). ¹³CNMR (d ppm, CDCl₃, 100MHz): 170.25, 170.16 (2C), 169.93, 169.89, 169.52, 169.40 (2C), 169.09 (CH₃CO); 161.13, 143.24, 125.78 (2C), 116.55 (2C) (C₆H₄N₂); 99.97, 97.80, 96.22, 77.20, 75.25, 73.17, 73.11, 72.71, 72.33, 71.68, 71.12, 70.93 (2C), 69.27, 69.03, 68.93, 67.29 (sugar ring); 20.79, 20.73, 20.69 (2C), 20.65 (2C), 20.57, 20.52 (2C) (CH₃CO).

[0134] 7-5 2,4-Dinitrophenyl [(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)-O-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-fluoro-0-3,6-di-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (상기 실시예 5-5 반응산물)

[0135] ¹H NMR (δ ppm, 600 MHz, CDCl₃): 2.01, 2.04, 2.05, 2.06, 2.07, 2.08, 2.10, 2.17 (s, 24 H, 8 CH₃CO); 3.56 (dd, 1 H, J_{5,6} 2.7, J_{6'a,6'b} 11.1 Hz, H6'), 3.69 (ddd, 1 H, J_{5',6'} 2.4, J_{5',6'} 5.4, J_{4',5'} 10.2 Hz, H5), 3.74 (dd, 1 H, J_{5',6'} 5.5, J_{6'a,6'b} 10.8 Hz, H6'), 3.77 (dd, 1 H, J_{4'',5''} 6.0, J_{5''a,5''b} 11.1 Hz, H5''), 3.86 (dd, 1 H, J_{4'',5''} 6.0, J_{5''a,5''b} 10.2 Hz, H5''), 3.95 (ddd, 1 H, J_{5,6} 2.4, J_{5,6} 5.4, J_{4,5} 9.6 Hz, H5), 4.03 (t, 1 H, J_{3,4} = J_{4,5} 9.6 Hz, H4), 4.12 (dd, 1 H, J_{5,6} 4.8, J_{6a,6b} 12.6 Hz, H6), 4.59 (dd, 1 H, J_{5,6} 2.1, J_{6a,6b} 12.3 Hz, H6), 4.62 (d, 1 H, J_{1',2'} 7.8 Hz, H1'), 4.69 (dt, 1 H, J_{2,F} 49.2, J_{1,2} = J_{2,3} 7.5 Hz, H2), 4.82 (dd, 1 H, J_{1'',2''} 3.6, J_{2'',3''} 10.2 Hz, H2''), 4.89 (dd, 1 H, J_{1',2'} 7.8, J_{2',3'} 9.6 Hz, H2'), 5.00 (t, 1 H, J_{3',4'} = J_{4',5'} 10.2 Hz, H4'), 5.00 (sxt, 1 H, J_{4'',5''} = J_{4'',5''} 6.3, J_{3'',4''} 9.9 Hz, H4''), 5.07 (d, 1 H, J_{1'',2''} 3.0 Hz, H1''), 5.20 (t, 1 H, J_{2',3'} = J_{3',4'} 9.6 Hz, H3'), 5.44 (t, 1 H, J_{2,3} = J_{3,4} 9.6 Hz, H3), 5.46 (dd, 1 H, J_{1,2} 7.8, J_{1,F} 2.4 Hz, H1), 5.48 (t, 1 H, J_{2'',3''} = J_{3'',4''} 9.9 Hz, H3''), 7.39 (d, 1 H, J 9.6 Hz, DNP), 8.44 (dd, 1H, J 2.4, J 9.0 Hz, DNP), 8.75 (d, 1H, J 3.0 Hz, DNP). ¹³CNMR (150MHz, CDCl₃): 20.78, 20.86, 20.89, 20.95, 21.11, (8 CH₃CO); 59.09, 61.60, (C6, C6'); 67.15 (C5''), 69.09, 69.21, 69.38, 71.14, 71.90, 72.91, 73.47, 73.52, (C4, C5, C2', C3', C4', C5', C2'', C3'', C4''); 71.58 (C3, J_{3,F} 20.9 Hz), 88.62 (C2, J_{2,F} 191 Hz), 96.39 (C1''), 98.11 (C1, J_{1,F} 25.8 Hz), 99.97 (C1'), 117.69, 121.86, 128.87, 140.21, 142.25, 153.61 (DNP); 169.29, 169.49, 169.67, 170.16, 170.24, 170.43 (8 CH₃CO)

[0136] 실시예 8: YicI 양자공여/수용체 촉매기의 무작위 돌연변이

[0137] 8-1. YicI 양자공여체 돌연변이체 라이브러리(YicI-D482X) 제작

[0138] 상기 YicI 효소의 양자공여체 촉매기인 Asp482를 임의의 아미노산으로 치환하기 YicID482X-F (5-GTA CAC TGG GGT GGC NNN TGT TAC GC TAA CTA C-3, N은 임의의 염기서열, 서열번호 12)를 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 6과 같다.

표 6

	서열	서열번호
YicID482X-F	5-GTA CAC TGG GGT GGC NNN TGT TAC GC TAA CTA C-3	12

[0140] 상기 실시예 1-2의 제조합 벡터 pETYicI6xH에 대해 상기 YicID482X-F를 정방향 프라이머로 사용하여 상기 실시예 3-1의 방법으로 YicI 효소의 양자공여/수용체 촉매기가 임의의 아미노산으로 치환된 YicI 돌연변이체들(YicI-D482X, X는 임의의 아미노산을 의미함)의 유전자들을 획득하였다. 상기 PCR의 조건은 상기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0141] 상기 YicI-D482X를 암호화하는 유전자들을 함유하는 PCR 산물을 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 제조합 벡터 라이브러리인 pETYicI-D482X6xH를 제조하였으며, 상기 실시예 1-2에 따라 형질전환체를 제조하였다.

[0142] 8-2. 당전이 활성을 가지는 YicI 양자 공여/수용체의 선발

[0143] 상기 제조한 pETYicI-D482X6xH 벡터 라이브러리를 상기 실시예 1-2의 방법으로 형질전환 후, 형질전환체 98개를 각각 20 μ g/mL 가나마이신이 들어있는 0.2 mL LB 배지에 접종하였다. 상기 실시예 1-3의 방법으로 YicI 변이체

들을 생산한 후, lysozyme을 최종농도 1 mg/mL가 되도록 첨가하여 세포를 파괴하여 조효소액을 제조하였다. 각 조효소액을 0.1 mL의 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에 녹인 0.2 mmole 알파-자일로실 플로라이드와 0.1 mmole의 4-나이트로페닐-베타-글루코사이드 기질 용액과 1:1로 섞은 후, 37°C에서 12시간 반응을 진행하였고, 박막크로마토그래피(thin layer chromatography)방법을 통해 반응액을 분석하였다. 그림 9은 98개 조효소액 중 18개의 결과를 보여주는 TLC 데이터이다. 당전이 활성을 보이는 16개의 시료로부터 QUAGEN 플라스미드 분리 키트를 사용하여 YicI 변이효소를 암호화하는 유전자를 함유한 플라스미드 벡터를 분리하고, 염기서열을 결정하였다. 그 결과 형질전환체 A4, A7, C3, C6, C10, E10, E12, F1은 YicI의 양자 공여/수용체 촉매기인 아스파테이트가 알라닌으로, 형질전환체 C9, E2, E3, G1, H1은 세린으로, 형질전환체 E4, F6, F8은 글리신으로 치환되었음을 확인하였다. 상기 18개 돌연변이체가 가지는 돌연변이 아미노산을 표 7에 정리하였다.

표 7

돌연변이효소	A4	A5	A7	C3	C6	C9	C10	D2	E2	E3	E4	E10	E12	F1	F6	F8	G1	H4
양자 공여/수용체 촉매기 위치 아미노산 잔기	A	D	A	A	A	S	A	D	S	S	G	A	A	A	G	G	S	S

상기 표 7에 나타난 바와 같이 YicI 양자 공여/수용체 촉매기인 482번째 아스파테이트 잔기가 알라닌, 또는 세린, 또는 글리신으로 돌연변이된 효소들은 알파-자일로실 플로라이드를 당공여체로 사용하여 당전이 산물을 합성함을 알 수 있다.

실시예 9: *Bacillus halodurans* 알파-자일로시데이즈 변이체의 제조 및 당전이 활성 검출

9-1. *Bacillus halodurans* 알파-자일로시데이즈 변이체 (BHaX-D481A) 제작

B. halodurans C-125를 상기 실시예 1-1의 방법으로 배양 후, 염색체 DNA를 분리하였다. 상기 *B. halodurans* 알파-자일로시다아제(이하 BHaX)를 암호화하는 유전자를 분리하기 위해 정방향 프라이머 BHaXTOP (5'-TAG GGA ACA ACA TAT GAA ATT TTC AGA TGG-3' 서열번호 13) 및 역방향 프라이머 BHaXEND (5'-AAC CCT CGA GGA CGC CTA GGT GGA CAA CCA-3', 서열번호 14)를 각각 제작하였으며, 상기 표 2의 방법으로 PCR을 수행하여 BHaX 유전자를 분리하였다. 상기 프라이머 서열은 하기 표 8과 같다.

표 8

	서열	서열번호
정방향 프라이머 BHaXTOP	5'-TAGGGAACAACATATGAAATTTTCAGATGG-3'	13
역방향 프라이머 BHaXEND	5'-AACCTCGAGGACGCTAGGTGGACAACCA-3'	14

B. halodurans C-125 균주 염색체 DNA에 대해 상기 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 이용하여 상기 실시예 1에서와 같이 PCR을 실시하여 PCR 산물을 획득하였다.

상기 BHaX 효소의 양자공여/수용체 촉매기인 Asp481를 알라닌으로 치환하기 위해 BHaXD481A-F (5'-CCTGTTCACCTGGGGTGGAGCTTGTGCCGCAACT-3' 서열번호 15)를 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 9과 같다.

표 9

	서열	서열번호
정방향 프라이머 BHaXD481A-F	5'-CCTGTTCACCTGGGGTGGAGCTTGTGCCGCAACT-3'	15

상기 실시예 3-1에서 YicID482A-F 프라이머를 BHaXD481A-F로 대체하고 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 BHaX의 양자 공여/수용체인 아스파테이트가 알라닌으로 치환된 변이효소를 암호화하는 유전자를 포함한 pETBHaXD481A6xH를 제작하였다.

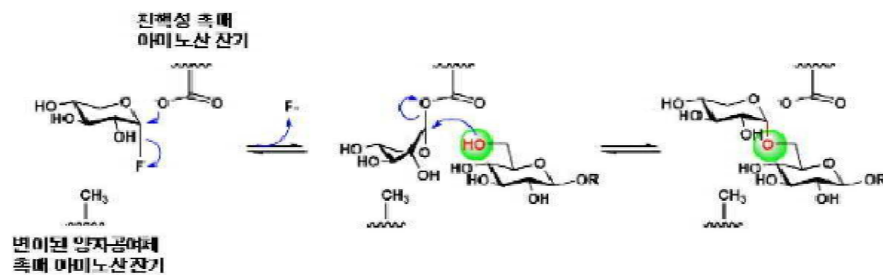
9-2. BHaX-D481A의 생산 및 당전이 반응

[0155]

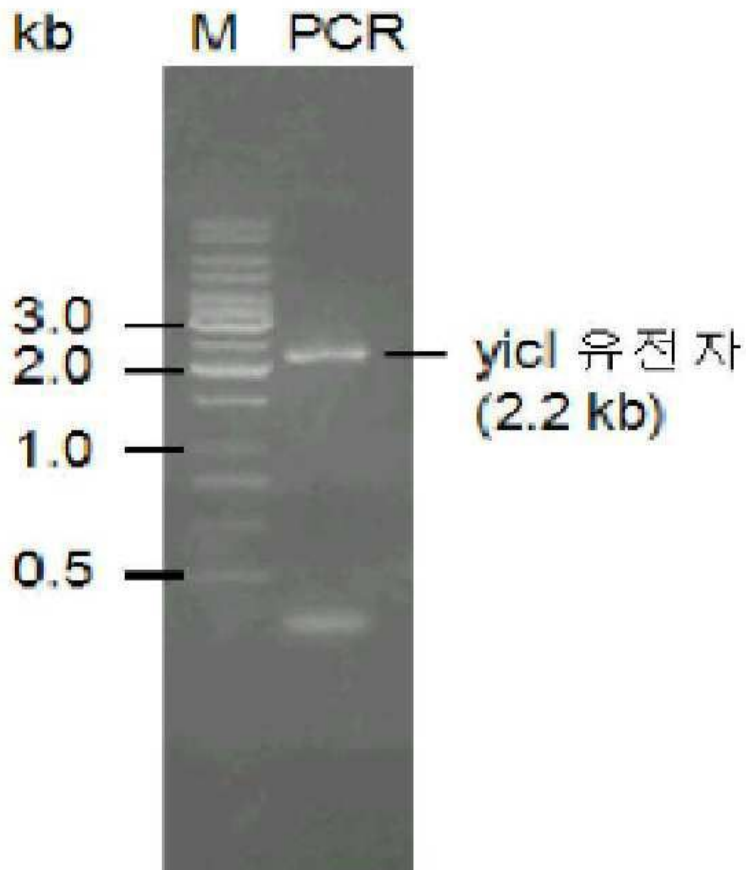
상기 제조한 pETBHaXD481A6xH 벡터를 상기 실시예 1-3의 방법으로 형질전환 후, 실시예 1-4의 방법에 따라 정제하였다. 정제된 BHaXD481A를 이용하여 상기 실시예 5-1에서와 같이 당전이 반응을 수행하였으며, 반응산물을 PE-Sciex API 300 triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, 캐나다)를 이용하여 분석하였고, 그림 10은 반응산물의 스펙트럼이다. 분석결과 상기 실시예 5-1에서 YicI-D482A에 의해 합성된 당전이 산물과 동일한 분자량 (분자량 = 433)을 가지는 산물이 소듐 염 ($M + Na^+$, 분자량 = 433 + 23), 포타슘 염 ($M + K^+$, 분자량 = 433 + 39), 및 이량체의 소듐 염 ($2M + Na^+$, 분자량 = 433 x 2 + 23) 형태로 검출되었다. 따라서 BHaX의 양자 공여/수용체 측매기에 대한 돌연변이를 통해 BHaXD481A 변이효소 역시 상기 YicI-D482A와 동일한 당전이 활성을 가짐을 확인하였다.

도면

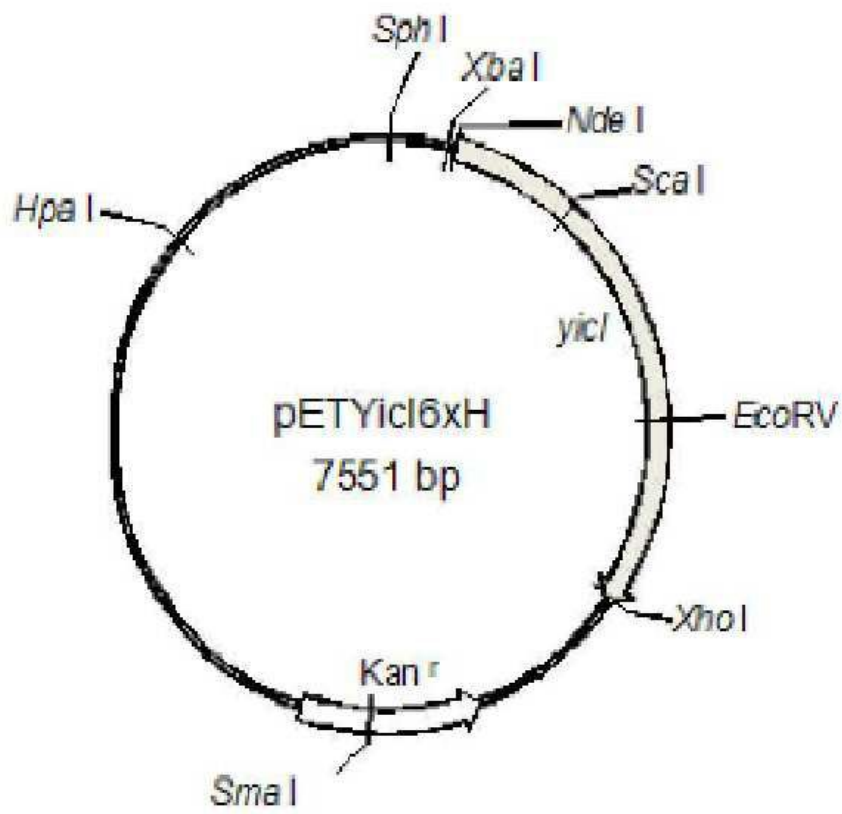
도면1



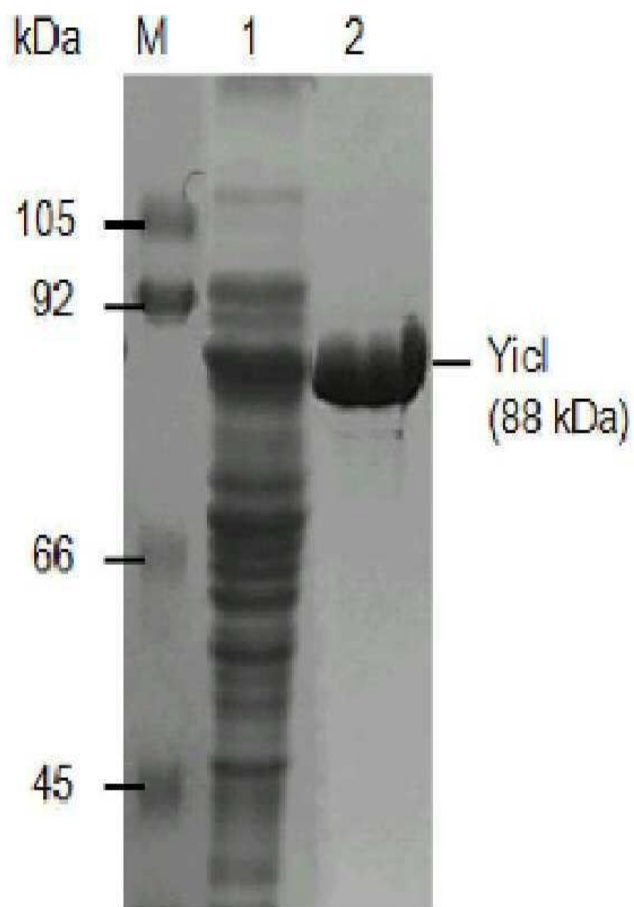
도면2



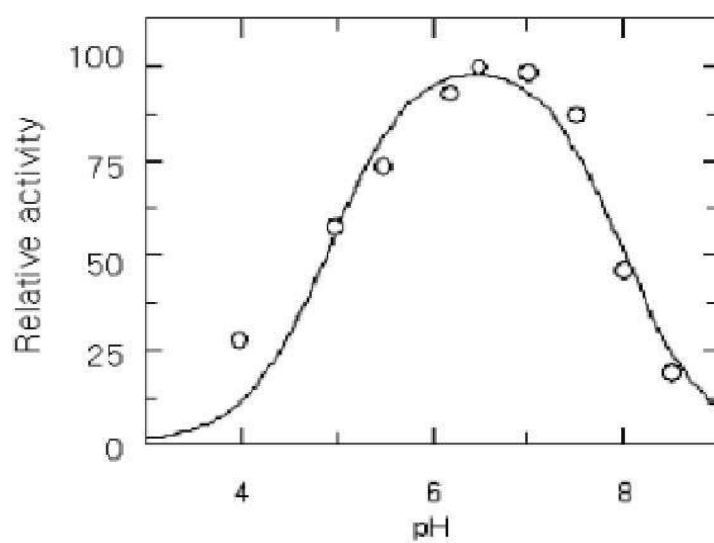
도면3



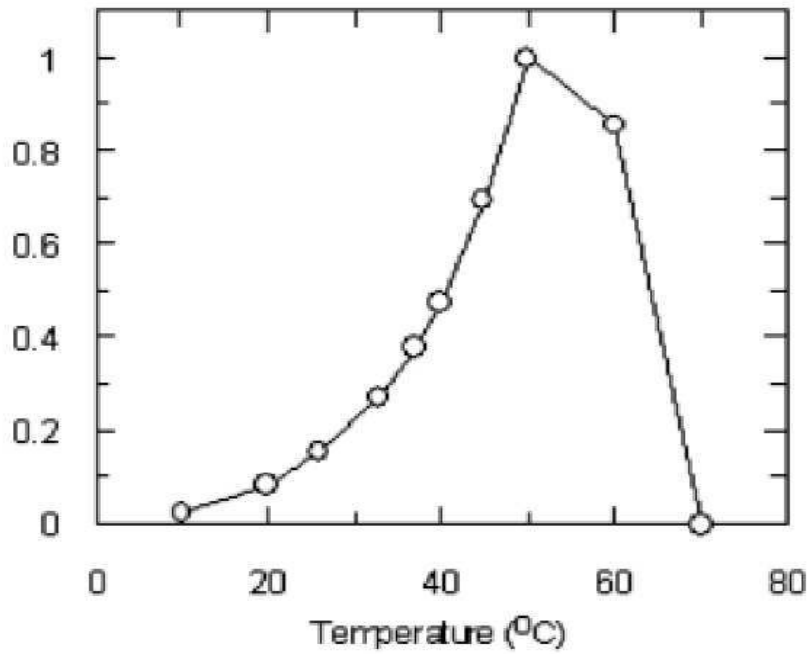
도면4



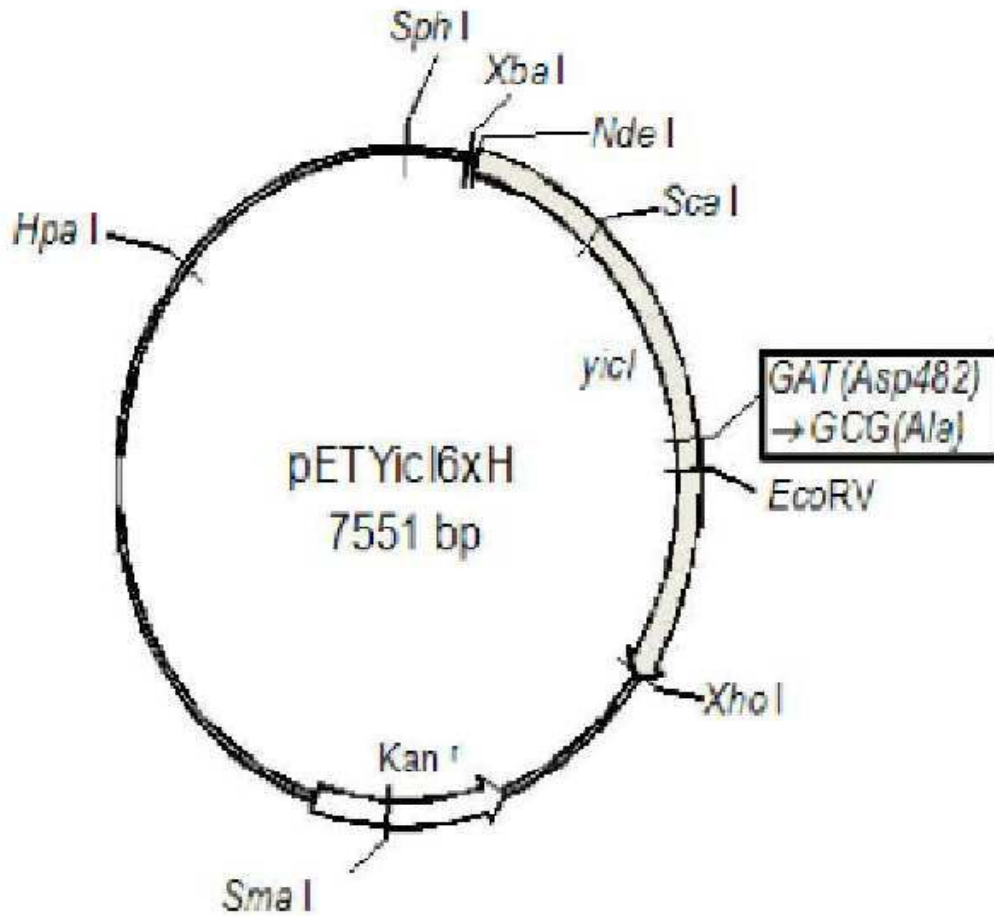
도면5



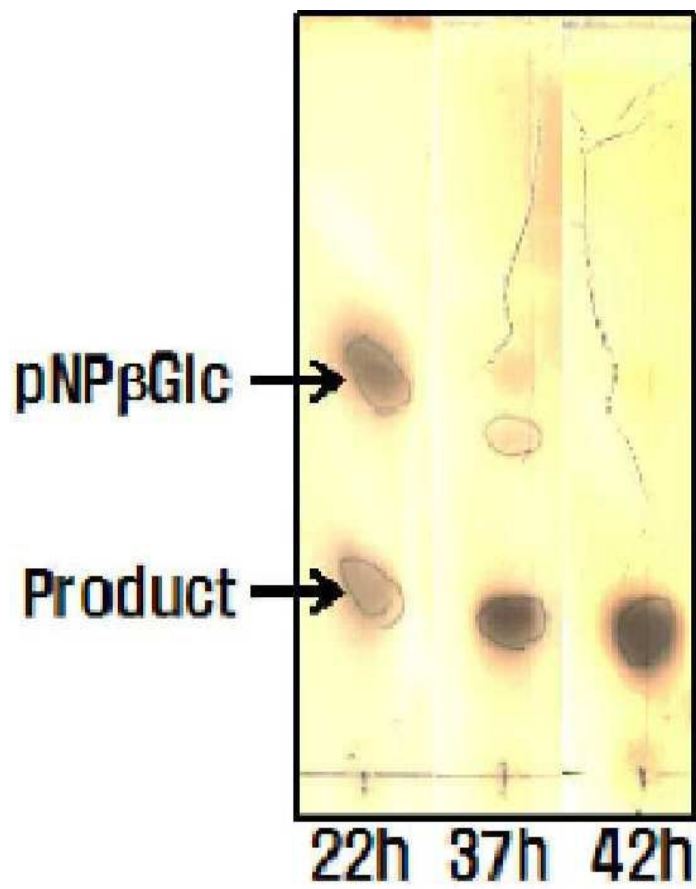
도면6



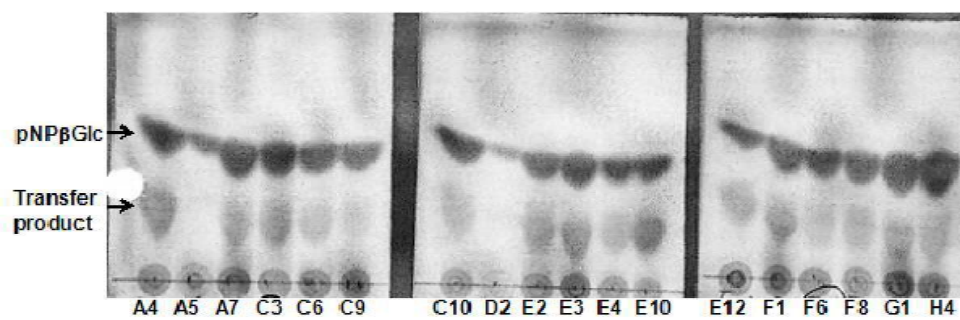
도면7



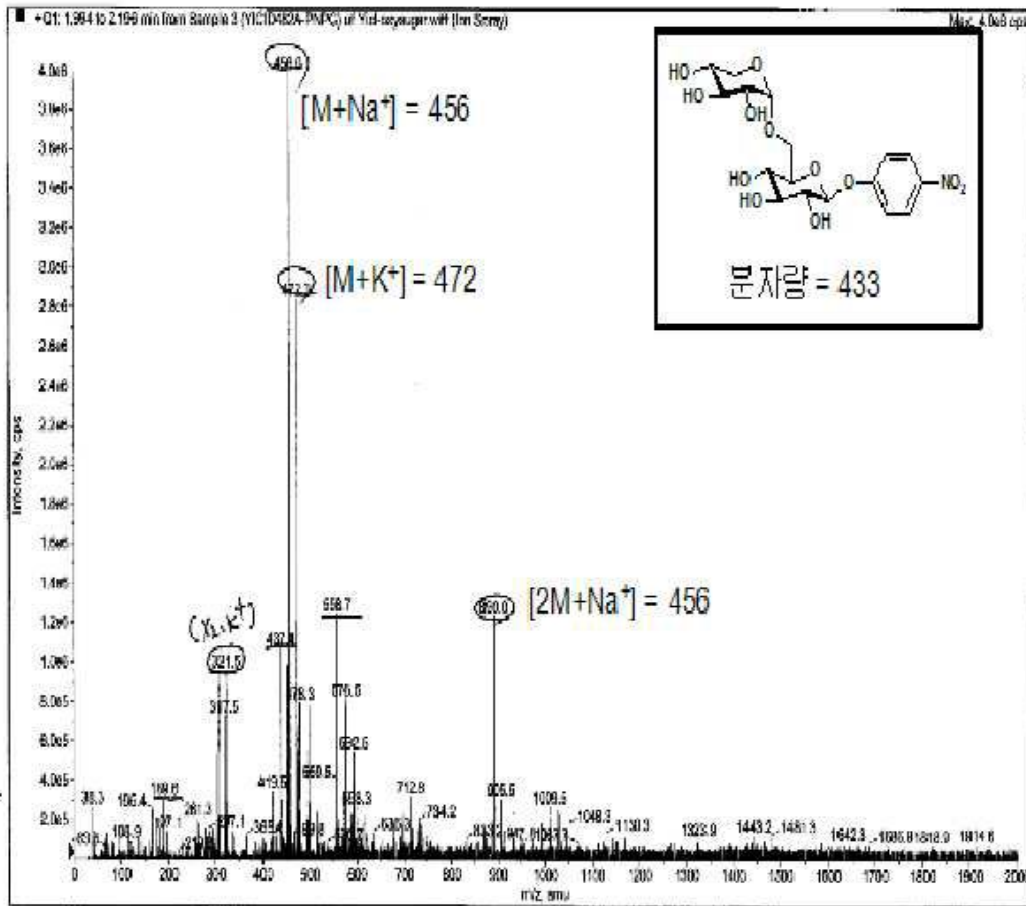
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 - <120> An alpha-Xylosidase mutants modified at their
proton-donor/acceptor catalyst and high efficiency
transglycosylation with the same
 - <160> 15
 - <170> Kopatent In 1.71
 - <210> 1
 - <211> 772
 - <212> PRT
 - <213> YicI
 - <400> 1
- Met Lys Ile Ser Asp Gly Asn Trp Leu Ile Gln Pro Gly Leu Asn Leu

1

5

10

15

Ile His Pro Leu Gln Val Phe Glu Val Glu Gln Gln Asp Asn Glu Met

20 25 30

Val Val Tyr Ala Ala Pro Arg Asp Val Arg Glu Arg Thr Trp Gln Leu

35 40 45

Asp Thr Pro Leu Phe Thr Leu Arg Phe Phe Ser Pro Gln Glu Gly Ile

50 55 60

Val Gly Val Arg Ile Glu His Phe Gln Gly Ala Leu Asn Asn Gly Pro

65 70 75 80

His Tyr Pro Leu Asn Ile Leu Gln Asp Val Lys Val Thr Ile Glu Asn

85 90 95

Thr Glu Arg Tyr Ala Glu Phe Lys Ser Gly Asn Leu Ser Ala Arg Val

100 105 110

Ser Lys Gly Glu Phe Trp Ser Leu Asp Phe Leu Arg Asn Gly Glu Arg

115 120 125

Ile Thr Gly Ser Gln Val Lys Asn Asn Gly Tyr Val Gln Asp Thr Asn

130 135 140

Asn Gln Arg Asn Tyr Met Phe Glu Arg Leu Asp Leu Gly Val Gly Glu

145 150 155 160

Thr Val Tyr Gly Leu Gly Glu Arg Phe Thr Ala Leu Val Arg Asn Gly

165 170 175

Gln Thr Val Glu Thr Trp Asn Arg Asp Gly Gly Thr Ser Thr Glu Gln

180 185 190

Ala Tyr Lys Asn Ile Pro Phe Tyr Met Thr Asn Arg Gly Tyr Gly Val

195 200 205

Leu Val Asn His Pro Gln Cys Val Ser Phe Glu Val Gly Ser Glu Lys

210 215 220

Val Ser Lys Val Gln Phe Ser Val Glu Ser Glu Tyr Leu Glu Tyr Phe

225 230 235 240

Val Ile Asp Gly Pro Thr Pro Lys Ala Val Leu Asp Arg Tyr Thr Arg

245 250 255

Phe Thr Gly Arg Pro Ala Leu Pro Pro Ala Trp Ser Phe Gly Leu Trp

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

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

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

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

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

Thr Ile Thr Leu

770

<210> 2

<211> 773

<212> PRT

<213> BHaX

<400> 2

Met Lys Phe Ser Asp Gly Gln Trp Leu Thr Arg Gln Glu Tyr Thr Ile

1 5 10 15

Ile Gly Ala Val Gln Val His Glu Ile Ile Gln Gly Glu Ala Ser Met

20 25 30

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

35 40 45

Asp Thr Pro Leu Leu Glu Ile Thr Phe Ser Ala Pro Arg Arg Glu Met

50 55 60

Ile Arg Val Gln Ile Asp His His Lys Gly Gly Arg Lys Arg Gly Pro

65 70 75 80

Val Phe Thr Thr Lys His Asp His Lys His Gln Ala Ser Phe Thr Glu

85 90 95

Thr Glu Thr Thr Ala Ile Leu Thr Ser Gly Asp Leu Ser Val Thr Val

100 105 110

His Lys Glu Gly Asp Trp Leu Ile Thr Phe Ser Tyr Gln Gly Lys Thr

115 120 125

Ile Thr Ser Ser Gly Ser Lys Ser Ile Ala His Ile Leu Ala Gln Asp

130 135 140

Gly Lys Ala Tyr Met Arg Glu Gln Leu Ser Leu Gln Pro Asp Glu Met

145 150 155 160

Ile Tyr Ala Leu Gly Glu Arg Phe Thr Pro Leu Ile Arg Asn Gly Gln

165 170 175

Val Val Asp Ile Trp Asn Lys Asp Gly Gly Thr Asn Thr Glu Gln Ser

180 185 190

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

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

 245 250 255
 Thr Gly Lys Pro Ala Leu Pro Pro Ala Trp Ser Phe Gly Leu Trp Leu
 260 265 270
 Ser Thr Ser Phe Thr Thr Asn Tyr Asp Glu Ala Thr Val Thr Gln Phe
 275 280 285
 Ile Asp Gly Met Asn Glu Arg Asp Leu Pro Val His Val Phe His Phe
 290 295 300
 Asp Cys Phe Trp Met Lys Glu Phe Glu Trp Cys Asn Phe Glu Trp Tyr
 305 310 315 320

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

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

450 Arg Ser Ala Thr Ala Gly Ser Gln Gln Phe Pro Val His Trp Gly Gly
 465 470 475 480
 Asp Cys Ala Ala Thr Tyr Ser Ser Met Ala Glu Ser Leu Arg Gly Gly
 485 490 495
 Leu Ser Leu Gly Met Ser Gly Phe Gly Tyr Trp Ser His Asp Ile Gly
 500 505 510
 Gly Phe Glu Ser Gln Ser Thr Ala Asp Leu Tyr Lys Arg Trp Thr Ala
 515 520 525
 Phe Gly Leu Leu Ser Ser His Ser Arg Leu His Gly Asn Lys Ser Tyr

 530 535 540
 Arg Val Pro Trp Val Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Asp Val Leu Arg Gln
 545 550 555 560
 Phe Thr Lys Trp Lys Cys Arg Leu Met Pro Tyr Leu Tyr Ala Lys Ala
 565 570 575
 Cys Glu Ala Arg Thr Thr Gly Leu Pro Leu Met Arg Ala Met Val Leu
 580 585 590
 Glu Phe Gln Asp Asp Pro Thr Cys Ala Phe Leu Asp Arg Gln Tyr Met
 595 600 605

 Leu Gly Asp Gln Leu Leu Val Ala Pro Ile Phe Asn Glu Glu Gly Leu
 610 615 620
 Ala His Tyr Tyr Val Pro Asp Gly Arg Trp Thr Asn Leu Leu Thr Gly
 625 630 635 640
 Lys Thr Val Glu Gly Gly Ser Trp Lys Lys Glu His His Asp His Leu
 645 650 655
 Ser Ile Pro Leu Leu Val Arg Pro Asn Ser Ile Val Pro Ile Gly Ser
 660 665 670
 Val Asp Asp Arg Pro Asp Tyr Asp Tyr Thr Asp Asn Val Ala Phe His

 675 680 685
 Val Phe Ala Leu Glu Asn Tyr Ala Thr Thr Ser Ile Tyr Thr Val Glu
 690 695 700

Gly Glu Glu Ala Leu Thr Leu Ser Ala Thr Arg Ser Thr Thr Thr Val
705 710 715 720
Thr Phe Asp Ile Ser Asp Gly Ser Lys Pro Trp Thr Val His Leu His
725 730 735
Asp Val Thr Glu Val Ser Ser Val Glu Gly Ala Asp Phe Glu Ile Ser
740 745 750

Asp Gly Ser Val Ile Leu His Pro Ile Leu Asp Val Lys Gln Val Val
755 760 765
Val His Leu Gly Val
770

<210> 3

<211> 772

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> YicI-D482A

<400> 3

Met Lys Ile Ser Asp Gly Asn Trp Leu Ile Gln Pro Gly Leu Asn Leu
1 5 10 15
Ile His Pro Leu Gln Val Phe Glu Val Glu Gln Gln Asp Asn Glu Met
20 25 30

Val Val Tyr Ala Ala Pro Arg Asp Val Arg Glu Arg Thr Trp Gln Leu
35 40 45

Asp Thr Pro Leu Phe Thr Leu Arg Phe Phe Ser Pro Gln Glu Gly Ile
50 55 60

Val Gly Val Arg Ile Glu His Phe Gln Gly Ala Leu Asn Asn Gly Pro
65 70 75 80

His Tyr Pro Leu Asn Ile Leu Gln Asp Val Lys Val Thr Ile Glu Asn
85 90 95

Thr Glu Arg Tyr Ala Glu Phe Lys Ser Gly Asn Leu Ser Ala Arg Val

100 105 110
Ser Lys Gly Glu Phe Trp Ser Leu Asp Phe Leu Arg Asn Gly Glu Arg
115 120 125

Ile Thr Gly Ser Gln Val Lys Asn Asn Gly Tyr Val Gln Asp Thr Asn
130 135 140
Asn Gln Arg Asn Tyr Met Phe Glu Arg Leu Asp Leu Gly Val Gly Glu
145 150 155 160
Thr Val Tyr Gly Leu Gly Glu Arg Phe Thr Ala Leu Val Arg Asn Gly
165 170 175
Gln Thr Val Glu Thr Trp Asn Arg Asp Gly Gly Thr Ser Thr Glu Gln
180 185 190
Ala Tyr Lys Asn Ile Pro Phe Tyr Met Thr Asn Arg Gly Tyr Gly Val
195 200 205
Leu Val Asn His Pro Gln Cys Val Ser Phe Glu Val Gly Ser Glu Lys
210 215 220
Val Ser Lys Val Gln Phe Ser Val Glu Ser Glu Tyr Leu Glu Tyr Phe
225 230 235 240
Val Ile Asp Gly Pro Thr Pro Lys Ala Val Leu Asp Arg Tyr Thr Arg
245 250 255
Phe Thr Gly Arg Pro Ala Leu Pro Pro Ala Trp Ser Phe Gly Leu Trp
260 265 270
Leu Thr Thr Ser Phe Thr Thr Asn Tyr Asp Glu Ala Thr Val Asn Ser
275 280 285
Phe Ile Asp Gly Met Ala Glu Arg Asn Leu Pro Leu His Val Phe His
290 295 300
Phe Asp Cys Phe Trp Met Lys Ala Phe Gln Trp Cys Asp Phe Glu Trp
305 310 315 320
Asp Pro Leu Thr Phe Pro Asp Pro Glu Gly Met Ile Arg Arg Leu Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Leu Lys Ile Cys Val Trp Ile Asn Pro Tyr Ile Gly Gln
340 345 350
Lys Ser Pro Val Phe Lys Glu Leu Gln Glu Lys Gly Tyr Leu Leu Lys
355 360 365
Arg Pro Asp Gly Ser Leu Trp Gln Trp Asp Lys Trp Gln Pro Gly Leu
370 375 380

Ala Ile Tyr Asp Phe Thr Asn Pro Asp Ala Cys Lys Trp Tyr Ala Asp

385 390 395 400

Lys Leu Lys Gly Leu Val Ala Met Gly Val Asp Cys Phe Lys Thr Asp

405 410 415

Phe Gly Glu Arg Ile Pro Thr Asp Val Gln Trp Phe Asp Gly Ser Asp

420 425 430

Pro Gln Lys Met His Asn His Tyr Ala Tyr Ile Tyr Asn Glu Leu Val

435 440 445

Trp Asn Val Leu Lys Asp Thr Val Gly Glu Glu Glu Ala Val Leu Phe

450 455 460

Ala Arg Ser Ala Ser Val Gly Ala Gln Lys Phe Pro Val His Trp Gly

465 470 475 480

Gly Ala Cys Tyr Ala Asn Tyr Glu Ser Met Ala Glu Ser Leu Arg Gly

485 490 495

Gly Leu Ser Ile Gly Leu Ser Gly Phe Gly Phe Trp Ser His Asp Ile

500 505 510

Gly Gly Phe Glu Asn Thr Ala Pro Ala His Val Tyr Lys Arg Trp Cys

515 520 525

Ala Phe Gly Leu Leu Ser Ser His Ser Arg Leu His Gly Ser Lys Ser

530 535 540

Tyr Arg Val Pro Trp Ala Tyr Asp Asp Glu Ser Cys Asp Val Val Arg

545 550 555 560

Phe Phe Thr Gln Leu Lys Cys Arg Met Met Pro Tyr Leu Tyr Arg Glu

565 570 575

Ala Ala Arg Ala Asn Ala Arg Gly Thr Pro Met Met Arg Ala Met Met

580 585 590

Met Glu Phe Pro Asp Asp Pro Ala Cys Asp Tyr Leu Asp Arg Gln Tyr

595 600 605

Met Leu Gly Asp Asn Val Met Val Ala Pro Val Phe Thr Glu Ala Gly

610 615 620

Asp Val Gln Phe Tyr Leu Pro Glu Gly Arg Trp Thr His Leu Trp His

625 630 635 640
 Asn Asp Glu Leu Asp Gly Ser Arg Trp His Lys Gln Gln His Gly Phe
 645 650 655
 Leu Ser Leu Pro Val Tyr Val Arg Asp Asn Thr Leu Leu Ala Leu Gly
 660 665 670
 Asn Asn Asp Gln Arg Pro Asp Tyr Val Trp His Glu Gly Thr Ala Phe

 675 680 685
 His Leu Phe Asn Leu Gln Asp Gly His Glu Ala Val Cys Glu Val Pro
 690 695 700
 Ala Ala Asp Gly Ser Val Ile Phe Thr Leu Lys Ala Ala Arg Thr Gly
 705 710 715 720
 Asn Thr Ile Thr Val Thr Gly Ala Gly Glu Ala Lys Asn Trp Thr Leu
 725 730 735
 Cys Leu Arg Asn Val Val Lys Val Asn Gly Leu Gln Asp Gly Ser Gln
 740 745 750

 Ala Glu Ser Glu Gln Gly Leu Val Val Lys Pro Gln Gly Asn Ala Leu
 755 760 765
 Thr Ile Thr Leu
 770
 <210> 4
 <211> 773
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BHax-D481A
 <400> 4
 Met Lys Phe Ser Asp Gly Gln Trp Leu Thr Arg Gln Glu Tyr Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Gly Ala Val Gln Val His Glu Ile Ile Gln Gly Glu Ala Ser Met
 20 25 30

 Thr Val Leu Ala Ser Pro Lys Pro Ile Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu
 35 40 45
 Asp Thr Pro Leu Leu Glu Ile Thr Phe Ser Ala Pro Arg Arg Glu Met

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

 100 105 110
 His Lys Glu Gly Asp Trp Leu Ile Thr Phe Ser Tyr Gln Gly Lys Thr
 115 120 125
 Ile Thr Ser Ser Gly Ser Lys Ser Ile Ala His Ile Leu Ala Gln Asp
 130 135 140
 Gly Lys Ala Tyr Met Arg Glu Gln Leu Ser Leu Gln Pro Asp Glu Met
 145 150 155 160
 Ile Tyr Ala Leu Gly Glu Arg Phe Thr Pro Leu Ile Arg Asn Gly Gln
 165 170 175

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

 245 250 255
 Thr Gly Lys Pro Ala Leu Pro Pro Ala Trp Ser Phe Gly Leu Trp Leu
 260 265 270
 Ser Thr Ser Phe Thr Thr Asn Tyr Asp Glu Ala Thr Val Thr Gln Phe
 275 280 285
 Ile Asp Gly Met Asn Glu Arg Asp Leu Pro Val His Val Phe His Phe
 290 295 300
 Asp Cys Phe Trp Met Lys Glu Phe Glu Trp Cys Asn Phe Glu Trp Tyr

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

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

 Arg Ser Ala Thr Ala Gly Ser Gln Gln Phe Pro Val His Trp Gly Gly
 465 470 475 480
 Ala Cys Ala Ala Thr Tyr Ser Ser Met Ala Glu Ser Leu Arg Gly Gly
 485 490 495
 Leu Ser Leu Gly Met Ser Gly Phe Gly Tyr Trp Ser His Asp Ile Gly
 500 505 510
 Gly Phe Glu Ser Gln Ser Thr Ala Asp Leu Tyr Lys Arg Trp Thr Ala
 515 520 525
 Phe Gly Leu Leu Ser Ser His Ser Arg Leu His Gly Asn Lys Ser Tyr

 530 535 540
 Arg Val Pro Trp Val Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Asp Val Leu Arg Gln
 545 550 555 560

Phe Thr Lys Trp Lys Cys Arg Leu Met Pro Tyr Leu Tyr Ala Lys Ala
 565 570 575
 Cys Glu Ala Arg Thr Thr Gly Leu Pro Leu Met Arg Ala Met Val Leu
 580 585 590
 Glu Phe Gln Asp Asp Pro Thr Cys Ala Phe Leu Asp Arg Gln Tyr Met
 595 600 605

 Leu Gly Asp Gln Leu Leu Val Ala Pro Ile Phe Asn Glu Glu Gly Leu
 610 615 620
 Ala His Tyr Tyr Val Pro Asp Gly Arg Trp Thr Asn Leu Leu Thr Gly
 625 630 635 640
 Lys Thr Val Glu Gly Gly Ser Trp Lys Lys Glu His His Asp His Leu
 645 650 655
 Ser Ile Pro Leu Leu Val Arg Pro Asn Ser Ile Val Pro Ile Gly Ser
 660 665 670
 Val Asp Asp Arg Pro Asp Tyr Asp Tyr Thr Asp Asn Val Ala Phe His
 675 680 685
 Val Phe Ala Leu Glu Asn Tyr Ala Thr Thr Ser Ile Tyr Thr Val Glu
 690 695 700
 Gly Glu Glu Ala Leu Thr Leu Ser Ala Thr Arg Ser Thr Thr Thr Val
 705 710 715 720
 Thr Phe Asp Ile Ser Asp Gly Ser Lys Pro Trp Thr Val His Leu His
 725 730 735
 Asp Val Thr Glu Val Ser Ser Val Glu Gly Ala Asp Phe Glu Ile Ser
 740 745 750

 Asp Gly Ser Val Ile Leu His Pro Ile Leu Asp Val Lys Gln Val Val
 755 760 765
 Val His Leu Gly Val
 770
 <210> 5
 <211> 2319
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> YicI-D482A

<400> 5

atgaaaatta gcgatggaac ctggttgatt caacctggcc tcaatttgat tcacccgctt	60
caggtgttcg aggttgaaca gcaggataat gaaatgggtg tctatgctgc cccccgtgat	120
gtgcgtgaac gtacctggca gcttgatacg cctttattha cgttgcgctt tttctcccca	180
caggaaggta ttgtcgggtg gcggattgag cattttcagg gggcgcgtgaa taacggtcct	240
cattatccgc tcaatathtt gcaggacgtg aaggtcacaac tcgaaaacac agaacgttat	300
gctgagttta aaagtggcaa cttaagcgcg cgtgtcagca aaggtgagtt ctggtcactg	360
gattttctgc gcaacggcga acgtattacc ggtagtcagg tgaaaaataa tggctacgtg	420
caggacacga ataataacg caattatatg tttagcgggc ttgatcttgg cgttggcgaa	480
acagtttacg gtctgggaga gcgctttact gccctggtgc gcaatggcca gacggtagag	540
acctggaacc gggacggcgg cacaagtact gaacaggcgt ataaaaatat cccgttctac	600
atgactaacc gtggttatgg ggtactggtc aatcatcccc agtgtgtctc ttttgaagtg	660
ggatcggaga aagtctccaa agtgcagttc agcgttgaga gtgaatatct cgaatacttt	720
gttatcgacg gcccgcgcc gaaagcggta ctgatcggtt ataccgctt tactggctgt	780
ccggcgtgc cggccgctg gtccttcggc ctgtggctaa ccacttcatt taccaccaac	840
tacgacgaag cgacggtaaa cagctttatc gatggtatgg cggaacgcaa tctgccgctg	900
catgttttcc actttgactg tttctggatg aaagccttcc agtgggtgcga ttttgagtgg	960
gacccgctga ctttcctga cccggaaggg atgatccgcc gcctgaaagc gaaaggactg	1020
aaaatctgcg tctggattaa cccctatac ggtcaaaaat cccccgtctt taaagagtta	1080
caagagaaag gctatttact caaacgccg gacggttcgc tatggcagtg ggataaatgg	1140
cagccaggtc tggcgattta tgactttacc aatccggatg cctgcaaag gtacgccgac	1200
aaactgaaag gtctggtcgc gatgggcgtt gattgcttta agaccgactt tggcgaacgt	1260
atcccaactg atgttcagtg gtttgacggt tccgatccgc agaaaatgca taaccattat	1320
gcgtacatct acaacgaact ggtgtggaac gtgctcaagg acaccgttgg tgaggaagaa	1380
gctgtcttgt ttgcccgtc ggcctccgtc ggtgcgcaga aattcccgtt acactggggt	1440
ggcgcgtgtt acgtaacta cgaatcaatg gcggaaagcc tgcgcggtgg tttgtctatt	1500
ggcctttcag gttttggctt ctggagccac gatatcggcg gctttgaaaa taccgtccg	1560
gcgcacgttt acaaacgctg gtgcgcgttt ggtttgtctt ccagccatag ccgtttacac	1620
ggtagcaaat cttatcgtgt gccgtgggcc tacgatgatg agtcctgtga tgtggtgcgc	1680
ttcttcacgc aactgaaatg ccgcatgatg ccgtatctgt atcgtgaagc tgcgcgtgcg	1740

aacgcgcggg gtacgccgat gatgcgggcc atgatgatgg agttcccga cgatccggct 1800
 tgtgattacc ttgaccgtca atacatgtta ggcgacaacg tgatggttgc gccggtgttc 1860

actgaagcgg gcgatgtgca gttctacctg ccggaaggte gctggacaca cctgtggcac 1920
 aacgatgaac tcgacggtag tcgctggcat aacagcagc acggcttcct gagtctgccc 1980
 gtttatgtgc gtgataaac tctactggcg ctgggcaaca acgatcaacg tcccattac 2040
 gtgtggcacg aaggcacggc attccacctc ttcaatctgc aagacgggca tgaagccgtc 2100
 tgtgaagtgc ccgtgctga cggatcgggtg atctttactt taaaagcagc acgtactggc 2160
 aacacgatta ctgtgactgg tgcgggcgag gcgaagaact ggacactgtg cctgcgcaat 2220
 gtgtgaaag taaatggctc gcaagacggt tcgcaggctg aaagttagca ggggctgggtg 2280

gtgaagcctc aagggaatgc gctgacaatt acgttgtaa 2319

<210> 6
 <211> 2322
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BHaX-D481A
 <400> 6

atgaaatfff cagatggta gtggctgaca cgacaagagt atacaattat aggagcgggt 60
 caagttcatg agatcataca aggggaagca tccatgacgg ttctagcctc gccgaaaccg 120
 attgtggatc ggtatggaca gcttgatacc ccgttactgg agatcacttt ttccgccctt 180
 aggcgagaga tgatccgct gcaaatcgat catcataaag gagggagaaa acgaggtccg 240
 gtttttacta ccaaacatga tcacaagcat caagcaagtt ttacagaaac ggagacgacg 300

gcaatcctca caagtggcga cctatccgtc accgtccata aagaaggatga ttggctcatt 360
 accttttctt atcaaggaaa aacgatcaca tcgagtgggt caaaaagcat cgccacatt 420
 ctgctcagg acggaaagcg ttatatgctg gacgagctta gtctccagcc agatgaaatg 480
 atttatgctt taggcgaacg gtttacacct ttgattcgaa acggtcaagt cgtcgacatt 540
 tggaataaag atggcggta gaacacggag caatcgtata aaaatgttcc cttttatctt 600
 tctaacaag ggtacggctg gttcgtgaac catccggagt ggggtgctgt cgaagtagga 660
 tctgaaagtg tctcgaagtc tcagtttagc gtcgaaggte atcgcttga ttactatgtg 720

atggctgggc cgtcgatgaa aaaagtcatt gaagcctaca ccgatttaac gggaaaacca 780
 gcattgccg cgccctggtc gttcggctct ttgctgtcca catcgtttac aacgaactat 840
 gatgaagcga ctgtcaccca atttattgat gggatgaatg aacgcgactt gcctgttcac 900

gtgtttcatt ttgattgctt ctggatgaag gaatttgaat ggtgtaattt tgaatggat 960
cggcgggtat ttccagagcc agaaaaatg ctacagcgct taaaagaaaa aggcttgaag 1020
ctatctgtct ggatcaaccc ttatattgcg caacgctctc cgctgtttca agaagcggt 1080
gcaaatggat acttactgaa aaaagaaaac ggtgatgtat ggcaatggga tttatggcaa 1140

ccagggatgg gcgtggttga ctttacgaac cctgacgctc ggatttgta tcaggaccac 1200
cttcgcagge ttctagaaat gggcgttgat tgttttaaaa ccgatttcgg tgaacggata 1260
ccgaccgatg tcgtgtatca cgatggctct gaccagaaa aaatgcataa ttactacacg 1320
ttctctata atcaaacgtt gtttgacgtc ttgaaacaag taaagggtaa tcatgaagcc 1380
gtcttatttg ctcgatcggc cacggctggc agtcaacaat tccctgttca ctgggggtgga 1440
gcttgtgccg caacttactc gtctatggcg gaaagcttac gagggggatt atctctcgg 1500
atgtctggtt ttggctactg ggtcacgac attggcggct ttgaaagcca atccactgct 1560

gacctttata agcgtctggc cgcctttggt ttattatcga gccatagtcg tctgcatgga 1620
aataaatcgt atcgagtcct gtgggtttat gatgaggaag ccaccgatgt tcttcgtcag 1680
tttacaaaat ggaaatgtcg cctcatgcca tacctttatg cgaaagcatg tgaagcaaga 1740
acgaccgggc tccactcat gcgtgcgatg gtgttagaat tccaagacga tccgacgtgt 1800
gcgtttttag atcgccaata catgctcggg gatcagttgc ttgtggctcc gatcttcaat 1860
gaagaagggc tcgtcatta ctacgttctt gatggctgtt ggacaaatct cttaacaggc 1920
aaaactgtgg aaggtggtag ctggaagaaa gagcatcacg accatctgag catcccttta 1980

ctcgttcgcc caaattcgat cgttccgatc ggctcggtgg atgaccgtcc agactatgac 2040
tatacagaca atgtggcatt ccacgtgttt gcccttgaaa attacgcgac aacatccatc 2100
tatacagtag agggagagga agcactcact ttatctgcga ctcgtccac cactacagtc 2160
acatttgata tatctgatgg aagcaagcct tggaccgtac atttacacga tgtcacagag 2220
gtgtctagcg ttgagggagc tgactttgaa attagcgatg gctctgtcat cctccaccct 2280
atccttgatg tgaacaggt ggttgtccac ctaggcgtct aa 2320

<210> 7
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 7
cagaactaag gaacgcatat gaaaattagc 30

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 atcaagctcg agcaacgtaa ttgtcagcgc 30
 <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 gtacactggg gtggcgcgtg ttacgctaac tac 33

 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 tatgctagtt attgctcag 19
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12

gtacactggg gtggcnntg ttacgtaac tac

33

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

tagggaacaa catatgaaat tttcagatgg

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

aaccctcgag gacgcctagg tggacaacca

30

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

cctgttcact ggggtggagc ttgtgccga act

33