(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0047041
(43) 공개일자 2015년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/36 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0126779
(22) 출원일자 2013년10월23일
심사청구일자 2013년10월23일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정영륜
경남 진주시 진주대로815번길 11, 102동 502호 (주약동, 주약현대아파트)
칸하지
파키스탄, 카버 푸크툰콰, 테실&디스트릭트, 미안담 주크타이 빌리지, 아왈라 칸의 아들
(74) 대리인
두호특허법인

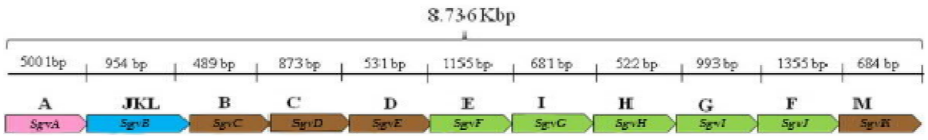
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **신규 니트릴라아제 및 이를 이용한 생기바마이신의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신규 니트릴라아제 및 이를 이용한 생기바마이신의 제조 방법에 관한 것으로서, 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T}에서 분리되고 시안기(RCN)를 가수 분해하여 아민기(RNH_2)로 전환시킬 수 있는 신규 니트릴라아제와, 이를 이용하여 약학적으로 유용한 생기바마이신을 안정적이고 경제적으로 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395031087
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 신규 효소의 분리 정제, 대량 생산 및 특성 조사
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교산학협력단
연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 시안기(RCN)를 아민기(RNH_2)로 변환시키는 단백질.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 토요카마이신을 생기바마이신으로 변환시키는 단백질.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^T 로부터 얻어진 단백질.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자에 의해 코딩된 단백질.

청구항 6

청구항 1의 단백질을 코딩하는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^T 로부터 분리된 것인 유전자.

청구항 8

토요카마이신과 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 단백질을 반응시키는 단계를 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, GMP 리덕타아제, 할로애시드 데할로게나아제, 포스포리보실-파이로포스페이트 트랜스퍼라아제, 아데닐로수시네이트 신타아제 및 아데닐로수시네이트 리아제의 존재 하에 7-데아자퓨린 코어를 상기 토요카마이신으로 변환하는 단계를 더 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 GMP 리덕타아제는 서열번호 3의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 할로애시드 데할로게나아제는 서열번호 4의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 포스포리보실-파이로포스페이트 트랜스퍼라아제는 서열번호 5의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 아데닐로수시네이트 신타아제는 서열번호 6의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 아데닐로수시네이트 리아제는 서열번호 7의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 15

청구항 9에 있어서, 6-피루보일테트라하이드로 프로테인 신타아제(PTPS), 라디칼 SAM 단백질군에 속하는 단백질 및 ExsB 단백질군에 속하는 단백질의 존재 하에 7,8-다이하이드로네오프테린 삼인산염(H2NTP)을 상기 7-데아자퓨린 코어로 변환하는 단계를 더 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 6-피루보일테트라하이드로 프로테인 신타아제(PTPS)는 서열번호 8의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 라디칼 SAM 단백질군에 속하는 단백질은 서열번호 9의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 상기 ExsB 단백질군에 속하는 단백질은 서열번호 10의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서, GTP사이클로하이드롤라아제I (GCH I)의 존재 하에 GTP를 상기 7,8-다이하이드로네오프테린 삼인산염(H2NTP)으로 변환하는 단계를 더 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 20

청구항 15에 있어서, 상기 GTP사이클로하이드롤라아제I (GCH I) 은 서열번호 11의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 21

청구항 8에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자군의 발현이 LuxR 전사조절인자에 의해 조절되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 LuxR 전사조절인자는 서열번호 12의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 신규 니트릴라아제 및 이를 이용한 아마이드 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생기바마이신(sangivamycin)과 토요카마이신(toyocamycin)은 스트렙토미세스에서 처음 분리된 피롤로피리미딘 화합물로, 항생, 항바이러스, 항진균, 항종양 특성을 보이는 것이 이미 공지되어 있다.

[0003] 스트렙토미세스 리모서스가 토요카마이신과 생기바마이신을 모두 생산하는 것에 관한 연구(Arch. Biochem. Biophys. 162, 614619)에서 이 두 화합물이 공통의 경로에서 생성될 수 있음이 처음 제시되었고, 스트렙토미세스 리모서스(ATCC 14673)의 토요카마이신과 생기바마이신 생합성 경로에 관한 연구(Chem. Biol. 15, 790-798)에서 *toyA, toyB, toyC, toyD, toyE, toyF, toyG, toyH, toyI, toyJ, toyK, toyL, toyM* 으로 지정된 유전자를 포함하여, 생합성 경로에 속한 전체 유전자 군이 밝혀졌다.

[0004] 후속 연구에 의해 상기 유전자 군에 속하는 유전자 중 *toyB, toyC, toyM* 는 큐오신 생합성에 필수적인 *queD, queE, queC*와 상동이고(J. Biol. Chem. 279, 62806285, Methods. Enzymol. 425, 153183), *toyD* 유전자는 GTP cyclohydrolase I (GCH I), GTP를 7,8-다이하이드로네오프테린 삼인산염(H2NTP)으로 전환시키는 작용을 촉매하는 아연 함유 단백질을 코딩하는 유전자와 상동이며(J. Antibiot. 10, 201204, Antimicrob. Agents. Chemother. (Bethesda). 161, 7779), GCH I 유전자에 더해 *queC, queD, queE* 유전자와 상동인 *toyM, toyB, toyC* 유전자가 7-데아자퓨린의 생합성 반응을 촉매하는 기능을 하는 것이 밝혀졌다(Bioorg. Chem. 43(2012), 1525, Biochemistry. 48, 38473852).

[0005] 생기바마이신 생합성 마지막 단계에서 토요카마이신이 생기바마이신으로 전환되는 경로는 두 개 내지 세 개의 서브유닛으로 구성된 금속 보조 인자에 의존하는 박테리아 효소인 니트릴 하이드라타아제를 코딩하는 *toyJ, toyK, toyL* 에 의해 촉매되는데, 니트릴 하이드라타아제는 촉매반응에 필수적인 단핵 금속 이온인 Fe3+ (Fe-NHase) 또는 Co3+ (Co-NHase)을 포함하는 구조로 니트릴의 아마이드 변형 작용의 촉매로 작용한다.

[0006] 니트릴 히드라타아제는 원핵생물인 프로테오박테리아, 악티노박테리아, 시아노박테리아, 피르미쿠테스 속에서 보고된 효소로, 시안기를 포함하는 니트릴을 카복시산과 암모니아로 가수분해하는 니트릴라아제(EC 3.5.5.1)와는 구별되는 효소이다. 니트릴라아제는 13개의 갈래(branch)로 나뉘어지는 니트릴 상과 단백질족에 속하며, α β β α 의 접힘 구조와 촉매활성을 갖는 활성 트라이어드 Glu-Lys-Cys 를 공유하는 것을 특징으로 하는 1군의 갈래(branch 1)에 속하는 것으로 분류되었다.

[0007] 시안화물 분해 효소는 촉매되는 반응과 가수분해 후의 생산물에 의해 시아나이드 다이하이드라타아제와 시아나이드 하이드라타아제의 두가지 타입으로 분류된다. 시아나이드 다이하이드라타아제는 대체적으로 변종 알칼리겐스 자일로속시단스 데니트리피칸 DF3, 바실러스 퍼밀러스 C1, 휴도모나스 수투체리 AK61 박테리아에서 분리된 효소 그룹으로 구성되며, 니트릴을 직접적으로 가수분해하여 카복시산과 암모니아로 전환시킨다. 시아나이드 하이드라타아제를 포함하는 두 번째 그룹은 니트릴을 아미다아제에 의해 카복시산으로 전환될 수 있는 아마이드로 가수분해한다. 시아나이드 하이드라타아제는 글로어세르코스포라 소르기, 후사리움 라테리티움을 포함하는 곰팡이로부터 분리된 것이 잘 알려져 있다. 이는 도 1에 나타내었으며, 도 1의 A는 시아나이드 다이하이드라타아제, B는 시아나이드 하이드라타아제이다.

[0008] 천연물이나 의약품을 합성하는 데 있어 효소를 사용하는 생물공정은 환경적 및 경제적인 면에서 효율적이며, 상기의 니트릴라아제 및 니트릴 하이드라타아제 또한 산업적으로 응용하기 위한 연구 및 산업적으로 응용한 예가 다수 보고되었다. 예를 들면, 다이니트릴을 니트릴라아제를 이용하여 입체선택적으로 가수분해하여 고지혈증 치료제인 아토르바스타틴의 합성에 있어 중요한 중간체인 (R)-4-시아노-3-하이드록시부타노익 애시드를 고수율, 고품질로 합성할 수 있음이 보고되었다(J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 9024-2025). 그러나 현재 산업적으로 사용되고 있는 니트릴라아제와 니트릴 하이드라타아제는 제한적인 기질 특이성과 낮은 거울상 선택성, 열불안정성의 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 특1991-0021479 (공개일자 1991.12.20)

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-320038호 (공개일자 2001.06.15)

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Harris, P.J., and Stone, B.A. 2008. Chemistry and molecular organization of plant

cell walls. Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for Bioenergy. 61-93.

(비특허문헌 0002) McCarty, R.M., and Bandarian, V. 2008. Deciphering deazapurine biosynthesis: pathway for pyrrolopyrimidine nucleosides toyocamycin and sangivamycin. Chem. Biol. 15, 790-798.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 시안 화합물의 시안기를 무독성의 아마이드로 가수분해하는 촉매 활성이 우수하고 안정적인 신규의 효소 및 그를 코딩하는 신규의 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 위 효소 또는 위 효소를 생산하는 세포를 이용하여 생기바마이신을 포함하는 아마이드 화합물을 제조하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질.

[0014] 2. 항목 1에 있어서, 시안기(RCN)를 아민기(RNH_2)로 변환시키는 단백질.

[0015] 3.항목 1에 있어서, 토요카마이신을 생기바마이신으로 변환시키는 단백질.

[0016] 4. 항목 1에 있어서, 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^T 로부터 얻어진 단백질.

[0017] 5. 항목 1에 있어서, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자에 의해 코딩된 단백질.

[0018] 6. 항목 1의 단백질을 코딩하는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자.

[0019] 7. 항목 6에 있어서, 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^T 로부터 분리된 것인 유전자.

[0020] 8. 토요카마이신과 항목 1 내지 5 중 어느 한 항의 단백질을 반응시키는 단계를 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

[0021] 9. 항목 8에 있어서, GMP 리덕타아제, 할로애시드 데할로게나아제, 포스포리보실-파이로포스페이트 트랜스퍼라아제, 아데닐로수시네이트 신타아제 및 아데닐로수시네이트 리아제의 존재 하에 7-데아자퓨린 코어를 상기 토요카마이신으로 변환하는 단계를 더 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

[0022] 10. 항목 9에 있어서, 상기 GMP 리덕타아제는 서열번호 3의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0023] 11. 항목 9에 있어서, 상기 할로애시드 데할로게나아제는 서열번호 4의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0024] 12. 항목 9에 있어서, 상기 포스포리보실-파이로포스페이트 트랜스퍼라아제는 서열번호 5의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0025] 13. 항목 9에 있어서, 상기 아데닐로수시네이트 신타아제는 서열번호 6의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0026] 14. 항목 9에 있어서, 상기 아데닐로수시네이트 리아제는 서열번호 7의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0027] 15. 항목 9에 있어서, 6-피루보일테트라하이드로 프로테인 신타아제(PTPS), 라디칼 SAM 단백질군에 속하는 단백질 및 ExsB 단백질군에 속하는 단백질의 존재 하에 7,8-다이하이드로네오프테린 삼인산염(H2NTP)을 상기 7-데아자퓨린 코어로 변환하는 단계를 더 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

[0028] 16. 항목 15에 있어서, 상기 6-피루보일테트라하이드로 프로테인 신타아제(PTPS)는 서열번호 8의 염기서열로 코

딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0029] 17. 항목 15에 있어서, 상기 라디칼 SAM 단백질군에 속하는 단백질은 서열번호 9의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0030] 18. 항목 15에 있어서, 상기 ExsB 단백질군에 속하는 단백질은 서열번호 10의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0031] 19. 항목 15에 있어서, GTP사이클로하이드롤라아제I (GCH I)의 존재 하에 GTP를 상기 7,8-다이하이드로네오프테린 삼인산염(H2NTP)으로 변환하는 단계를 더 포함하는 생기바마이신의 제조 방법.

[0032] 20. 항목 15에 있어서, 상기 GTP사이클로하이드롤라아제I (GCH I) 은 서열번호 11의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0033] 21. 항목 8에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 유전자군의 발현이 LuxR 전사조절인자에 의해 조절되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

[0034] 22. 항목 21에 있어서, 상기 LuxR 전사조절인자는 서열번호 12의 염기서열로 코딩되는 것인 생기바마이신의 제조 방법.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 신규 효소는 시안기를 아민기로 변환시키기 때문에 그 작용에 있어서는 니트릴 하이드라타아제(Nitrile hydratase)와 유사하지만 유전자 분석 결과 그 구조는 니트릴라아제에 속하므로 니트릴라아제로 분류될 수 있다.

[0036] 본 발명의 니트릴라아제는 시안 화합물의 시안기를 가수분해하여 아마이드를 안정적으로 생산할 수 있다.

[0037] 본 발명의 니트릴라아제는 위와 같은 가수분해 공정이 포함된 화합물의 제조 공정에 널리 사용될 수 있다.

[0038] 시안기를 가수분해하여 시안 화합물을 아마이드로 전환하는 공정은 특히 제약시 유기합성에 중요한 공정으로 알려져 있는데, 본 발명에 따른 니트릴라아제는 종래의 효소들에 비해 보다 위 공정을 안정적이고 경제적으로 수행할 수 있게 한다.

[0039] 본 발명의 니트릴라아제는 시안기에 선택적으로 작용하고, 넓은 범위의 온도 및 pH 조건에서도 높은 활성을 유지할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 제공하는 유전자의 DNA 염기서열을 유전공학적으로 응용하면 니트릴라아제 및 그를 생산하는 세포를 효율적으로 제조할 수 있다. 이와 같이 얻은 생산물은 아마이드 화합물의 산업적인 제조에 응용할 수 있다. 본 발명에서 제공하는 효소를 이용하여 생산된 아마이드 화합물 생기바마이신은 여러 진균 및 바이러스에 항생활성을 갖고 항종양활성을 가져 약학적으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 니트릴라아제에 의한 니트릴의 가수분해 반응을 나타낸 것이다.

도 2는 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 의 유전체 서열을 나타낸 것이다.

도 3은 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 에서 생기바마이신 생합성에 관여하는 유전자군을 나타낸 것이다.

도 4는 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 의 니트릴라아제 SgvB의 계통발생도를 나타낸 것이다.

도 5는 니트릴라아제 SgvB와 다른 니트릴라아제의 서열 상동성을 나타낸 것이다.

도 6은 니트릴라아제 SgvB에 의한 토요카마이신의 생기바마이신으로의 전환을 나타낸 것이다.

도 7은 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 의 조단백질의 니트릴라아제 활성에 pH와 온도가 미치는

영향을 나타낸 것이다.

도 8은 *sgvB* 유전자를 PCR 기법으로 증폭하여 벡터에 클로닝하는 것을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 발명은 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T}에서 분리되고 시안기(RCN)를 가수 분해하여 아민기(RNH_2)로 전환시킬 수 있는 신규 니트릴라아제와, 이를 이용하여 약학적으로 유용한 생기바마이신을 안정적이고 경제적으로 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다.

[0043] 이하, 본 발명에 대해 보다 상세히 설명한다.

[0044] 본 발명은 시안 화합물의 시안기를 무독성의 아마이드로 가수분해하는 활성을 갖는 니트릴라아제를 코딩하는 유전자 및 이 유전자로부터 전사된 효소를 제공한다.

[0045] 또한 본 발명은 위 효소를 이용하여 시안 화합물을 아마이드 화합물로 전환하는 방법 및 그로 인해 효과적으로 제조된 아마이드 화합물을 제공한다.

[0046] 본 발명은 시안 화합물의 시안기를 무독성의 아마이드로 가수분해하는 신규의 효소를 코딩하는 신규의 유전자를 포함하는 벡터 및 이러한 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0047] **실시예**

[0048] [실시예 1] 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 박테리아의 유전체 분석

[0049] 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 는 염생식물의 근권에서 분리된 신규한 박테리아로, 보트리티스 시네레아, 라이족토니아 솔라니, 콜레토트리쿰 코코데스, 후자리움 옥시스포룸, 보트리오스테리아 도치데아, 스클레로티니아 스클레오티오룸, 파이토프소라 캡시사이, 피시움 울티멈을 포함하는, 경제적으로 중요하게 다뤄지는 많은 진균에 대해 항진균 활성을 갖고 있다.

[0050] 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 박테리아의 전체 유전체 서열 시퀀싱 데이터는 ChunLab, Inc에서 일루미나 시퀀싱 테크닉(Illumina sequencing techinique)을 수행하여 얻은 후 ChunLab, Inc에서 개발한 미생물 유전체 분석 프로그램인 CLgenomics 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 의 유전체는 별도의 플라스미드를 갖지 않는 단일염색체로 이루어지며, 유전체의 자세한 구성은 표 1과 도 1에 나타내었다. 도 1에서 가장 바깥쪽의 두 개의 원은 각각 정방향과 역방향의 가닥을 나타내고, 다른 색으로 표현된 것은 COG 기능에 따라 다른 기능을 하는 카테고리를 나타낸다. 안쪽의 두 개의 원은 G+C 함량을 나타낸다.

[0051] [표 1]

이름	YC6258
유전체 크기	6,366,900 bp
G+C 함량비	48.92%
콘틱(contigs)의 수	118
스캐폴드(Scaffold)의 수	16
rRNA 유전자의 수	3
tRNA 유전자의 수	45
ORF 의 수	5971
단백질을 코딩하는 유전자의 수	3513

[0052]

[0053] [실시예 2] 생기바마이신 생산에 관여하는 유전자군의 확인

[0054] 생기바마이신의 생합성에 관여하는 유전자군의 확인은 CLgenomics 소프트웨어의 local BLAST 기능을 이용하여 스트렙토미세스 리모서스의 *toyF* 유전자 서열과 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 박테리아 유전체를 비교하여 상동하는 서열을 얻은 후 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 BLAST 서버의 BLASTX 기능을 이용하여 수행되었다. 그 결과 얻어진 11개의 ORF군은 도 3에 나타내었다.

[0055] 상기의 ORF군은 *sgvA, sgvB, sgvC, sgvD, sgvE, sgvF, sgvG sgvH, sgvI sgvJ, sgvK*로 구성되며, 이들 유전자는 각각 스트렙토미세스 리모서스에서 토요카마이신과 생기바마이신 생합성에 관여하는 *toyA, toy(J, K, L), toyB, toyC toyD, toyE, toyI, toyH, toyG, toyF, toyM* 유전자와 상동인 것으로 나타났다. 11개의 ORF와 스트렙토미세스 리모서스의 *toy* 유전자군 사이의 서열의 유사성 및 각각의 유전자가 코딩하는 단백질의 기능으로 예측되는 내용은 표 2에 나타내었다.

[0056] [표 2]

G.sunshinyii YC6258^T OFR[a]	스트렙토미세스 리모서스 *toy* 유전자군과의 상동성[b]		기능
	유전자	상동성 (%)	
sgvA	*toyA*	5	LuxR transcriptional regulator
sgvB	*toyJ*	14	Cyanide hydratase /nitrilase
	toyK	7	
	toyL	6	
sgvC	*toyB*	18	Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase
sgvD	*toyC*	19	Radical SAM
sgvE	*toyD*	17	GCH I
sgvF	*toyE*	26	GMP reductase
sgvG	*toyI*	23	Haloacid dehalogenase
sgvH	*toyH*	27	Phosphoribosyl-pyrophosphate transferase
sgvI	*toyG*	44	Adenylosuccinate synthetase
sgvJ	*toyF*	23	Adenylosuccinate lyase
sgvK	*toyM*	25	ExsB family

[a]*G.sunshinyii* YC6258^{T}의 상지바마이신 생합성에 관여하는 유전자군
[b]*S.rimosus*의 상지바마이신과 토요카마이신 생합성에 관여하는 유전자군

[0057]

[0058] 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^T 의 *sgvA, sgvB, sgvC, sgvD, sgvE, sgvF, sgvG sgvH, sgvI sgvJ, sgvK*와 스트렙토미세스 리모서스의 *toyA, toy(J, K, L), toyB, toyC toyD, toyE, toyI, toyH, toyG, toyF, toyM* 유전자 사이의 서열 상동성은 기재순으로 각각 5%, (14%, 7%, 6%), 18%, 19%, 17%, 26%, 23%, 27%, 44%, 23%, 25%인 것으로 나타났다.

[0059] *sgvA*는 상기의 유전자군의 발현을 조절하는 LuxR 전사조절프로테인을 코딩하고, *sgvB*는 니트릴라아제, sgv*C sgvD, sgvK*는 6-피루보일테트라하이드로 프로테인 신타아제(PTPS), 라디컬 SAM 단백질군에 속하는 단백질과 ExsB 단백질군에 속하는 단백질을 코딩하고, *sgvE*는 GTP를 7,8-다이하이드로네오프테린 삼인산(H_2NTP)으로 변환시키는 GTP사이클로하이드롤라아제I (GCH I)을, *sgvF, sgvG sgvH, sgvI sgvJ*는 각각 GMP 리덕타아제, 할로애시드 데할로게나아제, 포스포리보실-파이로포스페이트 트랜스퍼라아제, 아데닐로수시네이트 신타아제, 아데닐로수시네이트 리아제를 코딩할 것으로 예측되었다. 6-피루보일테트라하이드로 프로테인 신타아제(PTPS)와 GTP사이클로하이드롤라아제I (GCH I)는 7-데아자퓨린의 생합성 경로에 관여하며, GMP 리덕타아제, 할로애시드 데할로게나아제, 포스포리보실-파이로포스페이트 트랜스퍼라아제, 아데닐로수시네이트 신타아제, 아데닐로수시네이트 리아제는 7-데아자퓨린 코어를 토요카마이신으로 전환시킨다.

[0060] [실시예 3] SgvB의 계통발생도 분석

[0061] SgvB와 연관된 다른 니트릴라아제의 다중정렬은 ClustalX2.0 프로그램을 이용하여 수행하였고, 계통발생도 정리는 Mefa4 소프트웨어를 이용하였다. 연관된 니트릴라아제들의 염기서열은 GenBank 데이터베이스에서 얻었으며, 부츠트랩 값은 1,000번의 복제로 계산했다. 얻어진 계통발생도는 도 4에 나타내었다. SgvB의 서열은 니트릴라아제 AY487526과 53%의 유사도를 보여 가장 유사한 것으로 나타났으며, 그 다음으로 유사하게 나타난 것은 니트릴라아제 AY487450으로 서열 유사도는 51%였다. 이 두 니트릴라아제는 모두 미배양 유기체에서 분리되어 보고된 효소이다.

[0062] SgvB와 가까운 니트릴라아제들의 상동성을 분석한 결과, Glu-Lys-Cys 로 구성되는, 촉매활성을 보이는 활성 트라이어드가 확인되었으며, 이는 도 5에 나타내었다. 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^T 박테리아의 SgvB와 상동성을 분석한 아미노산 서열은 마리카울리스 마리스 MCS10 (gi|114569664), 게오바실루스 써모글루코시다시우스 C56-YS93 (gi|336235487), 로도코커스 로도크로스 (gi|134034945)의 니트릴라아제와 변종 지오바실

러스 Y4.1MC1 (gi|312111036) 의 하이드라타아제, 미배양 유기체의 니트릴라아제들(gi|40890257, gi|40890105, gi|40890171, gi|40890141)이다.

[0063] [실시예 4] 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 박테리아의 조단백질 분리

[0064] 조단백질의 분리를 위한 YC6258^{T} 박테리아는 $MgSO_4$(4 g/L), $MgCl_2$(2 g/L), 효모추출물 (2 g/L), 카사미노산 (5 g/L), 사카로오스 (1 g/L)를 포함하는 액체배지에서 28℃의 온도 하에 48시간동안 배양되었다. 수확한 박테리아 배양물을 6,000g 조건에서 20분간 원심분리하여 세포 펠렛을 얻고, pH 6.0의 50mM 인산완충액에 풀어준 후 얻음에 둔 상태로 초음파처리하여 세포를 용해했다. 세포용해물을 9,000g에서 15분간 원심분리한 후 조단백질이 포함된 상청액을 얻고, Bradford 법으로 농도를 측정했다.

[0065] [실시예 5] 분리한 조단백질의 니트릴라아제 활성 측정

[0066] 분리한 조단백질의 활성은 조단백질 20와 기질 토요카마이신을 최종 농도가 0.2mM이 되도록 첨가한 50mM pH6.0 조건의 인산완충액 1ml를 35℃에서 1시간 반응시킨 후 HPLC 분석하여 측정하였다. 대조군으로는 토요카마이신만을 포함하는 반응 완충액을 이용했다. 실험군은 1시간 동안 반응시킨 후 10의 3M HCL을 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후, 반응 혼합물을 0.2 필터를 이용하여 거르고 그 중 20를 C18 컬럼(5 , 4.6 mm × 150 mm)을 이용하여 HPLC분석하였다. 토요카마이신과 생기바마이신은 85% 0.1mM 트리에틸암모늄 아세테이트(pH6.8)와 15%의 메탄올 혼합물을 이용한 등용매용리(isocratic elution, 0.5mM/mn)에 의해 분리되었으며, 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0067] 도6은 단백질이 상기의 혼합물에 용리되며 나타나는 고유의 피크 타임을 보여주는 HPLC 분석 결과로, A는 생기바마이신과 토요카마이신이 혼합된 표준 화합물이고, B는 토요카마이신과 50mM 인산완충액(pH 6.0)을 35℃에서 1시간 배양한 대조군, C는 토요카마이신과 20조단백질을 50mM 인산완충액(pH 6.0)을 35℃에서 1시간 배양한 실험군을 나타낸다. 실험군의 기질 토요카마이신이 조단백질에 의해 생기바마이신으로 전환되는 것이 확인되었다.

[0068] [실시예 6] 분리한 조단백질 니트릴라아제 활성에 대한 pH와 온도의 영향 측정

[0069] 분리한 조단백질의 니트릴라아제 활성에 대한 pH의 영향은 35℃ 온도 하에 기질 토요카마이신을 첨가하고 pH 3.5 내지 9.0 사이의 조건에서 30분간 반응시켜 측정하였다. 효소 활성 측정을 위한 완충액은 pH 3.5내지 pH 6.0 조건에서는 0.1M McIlvaine 버퍼, pH 6.0 내지 pH 8.0 조건에서는 0.05M 인산완충액, pH 8.0 내지 pH 9.0 조건에서는 0.05M Tris-HCL 버퍼를 사용하였다. 분리한 조단백질의 니트릴라아제 활성에 대한 온도의 영향은 pH 6.5 에서 25℃ 내지 40℃사이의 온도 조건을 두고 기질 토요카마이신을 첨가하고 30분간 반응시켜 측정하였다.

[0070] pH 및 온도가 조단백질의 니트릴라아제 활성에 미치는 영향은 도 7에 나타내었다. pH 3.5에서 효소의 활성은 미미하게 나타나지만 상대적으로 pH 4.0에서는 거의 50%에 가까운 높은 활성을 보였다. pH 4.0 내지 9.0 사이에서는 100%의 활성을 보이는 것으로 나타났다. 20℃ 내지 40℃ 사이의 온도 조건에서 조단백질은 100%의 활성을 보였다.

[0071] [실시예 7] 니트릴라아제를 코딩하는 유전자의 PCR 증폭 및 클로닝

[0072] 니트릴라아제 SgvB를 코드하는 유전자는 기누엘라 순신이(*Gynuella sunshinyii*) YC6258^{T} 를 템플릿으로 하여 서열번호 13의 염기서열로 구성되는 정방향 프라이머와, 서열번호 14의 염기서열로 구성되는 역방향 프라이머를 이용한 PCR법으로 증폭하여 얻었다. PCR은 초기 열변성을 위해 94℃에서 4분 처리한 후, 94℃에서 50초, 64℃에서 30초, 72℃에서 1분 세트로 28 사이클 처리하고, 최종 신장을 위해 72℃에서 10분간 처리하는 온도조건으로 20볼륨으로 수행되었다. 954bp의 증폭된 유전자 DNA 산물은 Qiagen의 gel extraction 키트를 이용하여 겔 정제되었고, 정제된 *sgvB* DNA는 EcoRI, XhoI 제한효소로 처리한 후 같은 효소로 처리된 발현벡터 pGEX-5X-1와 연결하여 N-말단에 GST 프로테인으로 태깅된 재조합 단백질을 발현하는 pGE-SgvB 컨스트럭트를 얻었다. pGE-SgvB는 E.coli BL21(DE3)에 형질전환하고, 엠피실린(50)을 함유한 LB 한천배지를 이용하여 형질전환체를 선별하였다.

재조합 SgvB 나이트릴라아제의 발현은 프로테인의 분자량(34.9kDa)을 이용하여 확인하였다.

산업상 이용가능성

[0073] 본 발명에서 제공하는 신규의 니트릴라아제 효소 및 그를 코딩하는 유전자는 제약시 시안 화합물을 무독성의 아마이드 화합물로 전환시키는 공정에 이용될 수 있다. 본 발명에서 제공하는 효소가 공업적인 제조공정에 응용되면 약학적으로 유용한 화합물을 대량으로 그리고 안정적으로 생산할 수 있다.

수탁번호

[0074]

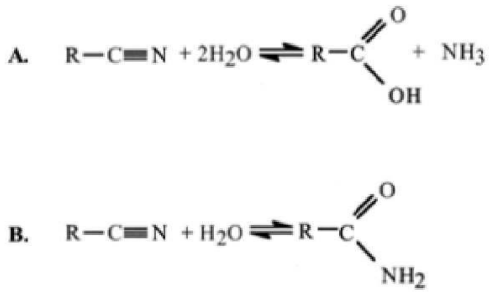
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11157P

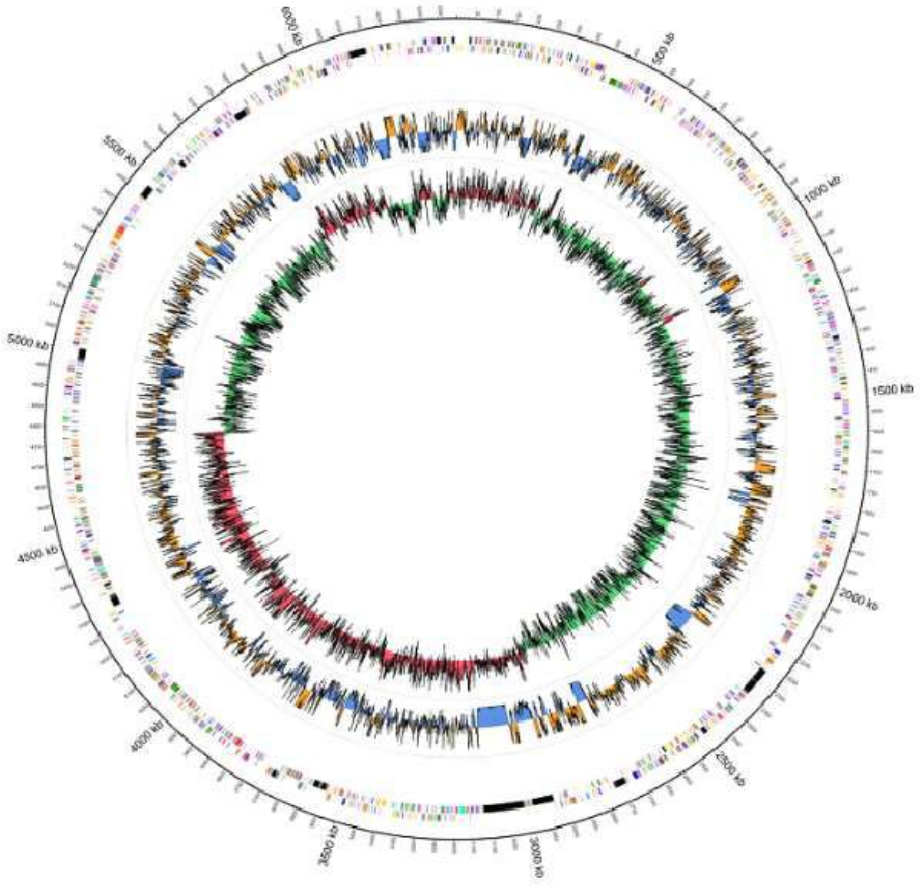
수탁일자 : 20101228

도면

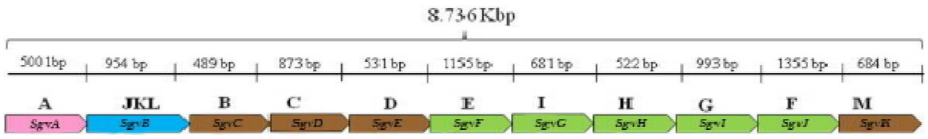
도면1



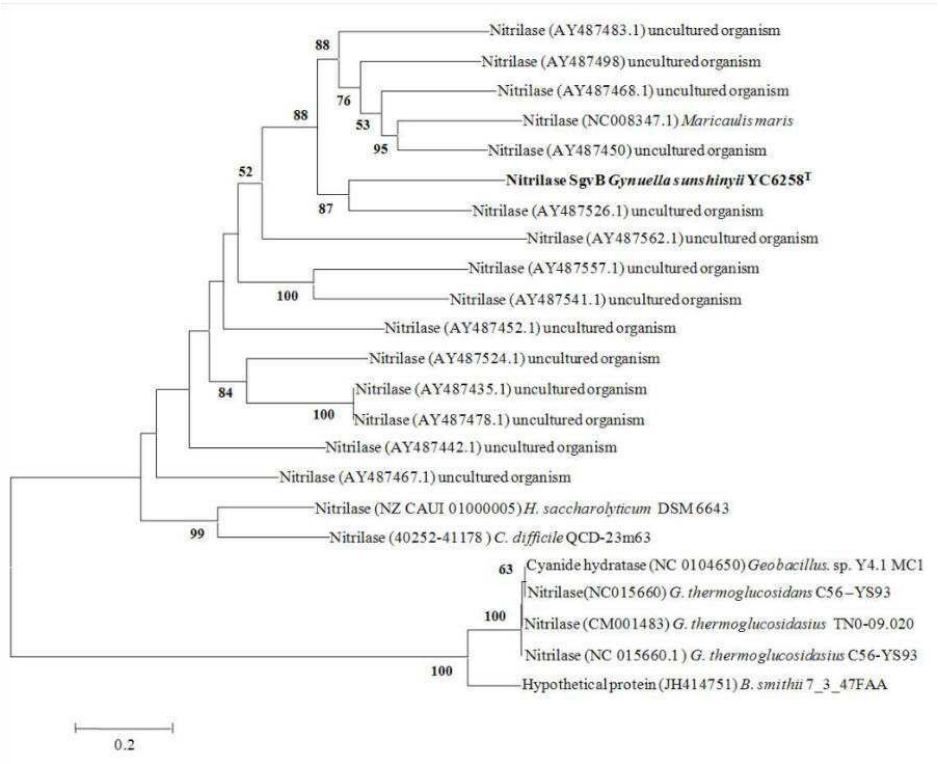
도면2


6000 kb
500 kb
1000 kb
1500 kb
2000 kb
2500 kb
3000 kb
3500 kb
4000 kb
4500 kb
5000 kb
5500 kb

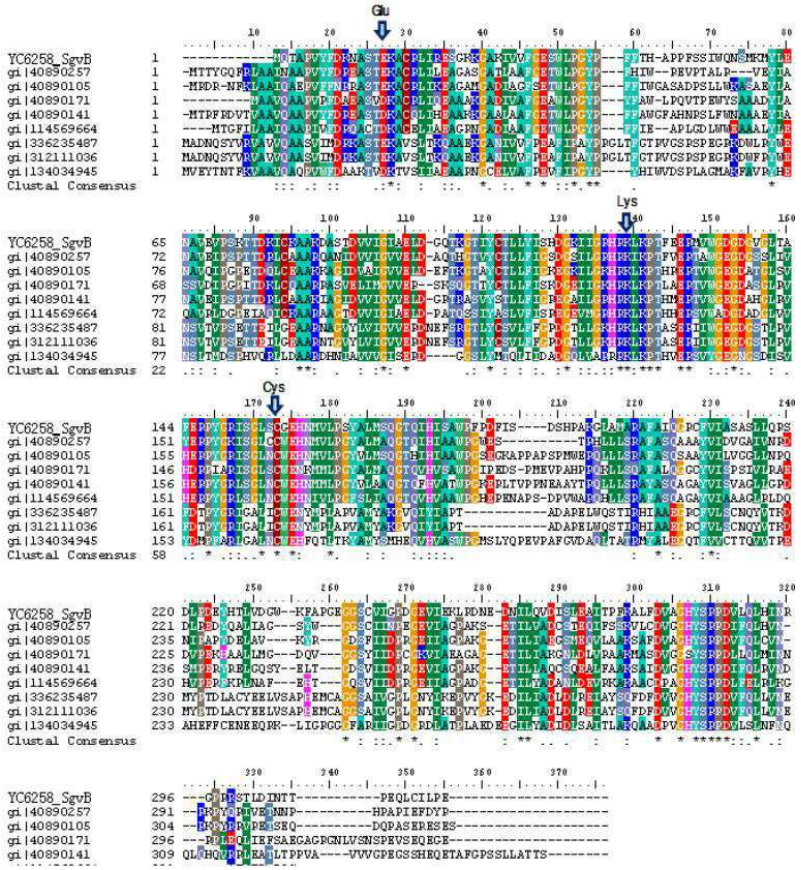
도면3


8.736Kbp
500 1bp
954 bp
489 bp
873 bp
531 bp
1155 bp
681 bp
522 bp
993 bp
1355 bp
684 bp
A
JKL
B
C
D
E
I
H
G
F
M
SgrvA
SgrvB
SgrvC
SgrvD
SgrvE
SgrvF
SgrvG
SgrvH
SgrvI
SgrvJ
SgrvK

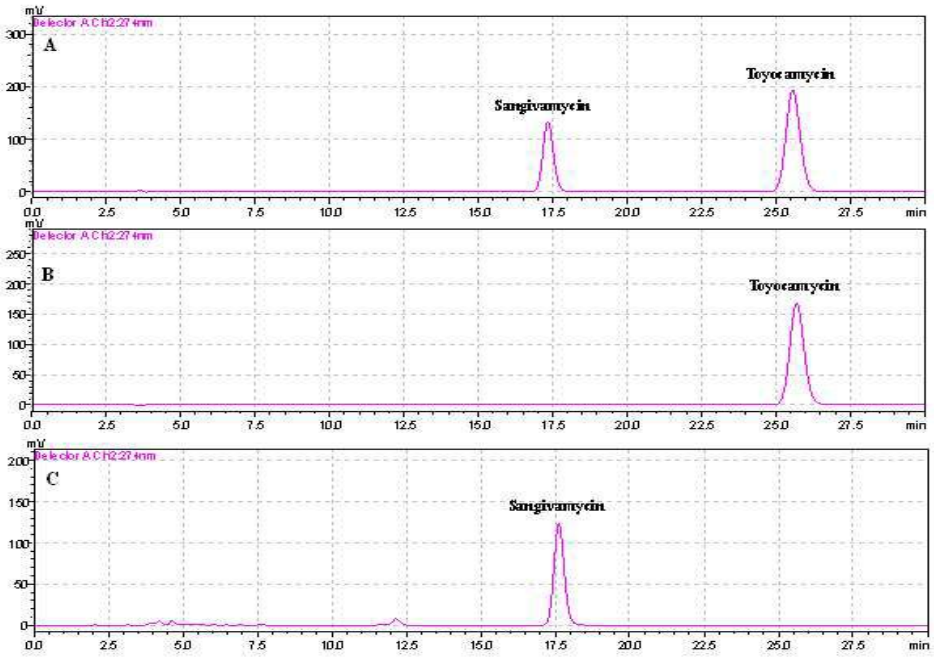
도면4


Nitrilase (AY487483.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487498) uncultured organism
Nitrilase (AY487468.1) uncultured organism
Nitrilase (NC008347.1) Maricaulis maris
Nitrilase (AY487450) uncultured organism
Nitrilase SgvB Gynuella sunshinyii YC6258T
Nitrilase (AY487526.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487562.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487557.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487541.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487452.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487524.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487435.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487478.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487442.1) uncultured organism
Nitrilase (AY487467.1) uncultured organism
Nitrilase (NZ CAUI 01000005) H. saccharolyticum DSM 6643
Nitrilase (40252-41178) C. difficile QCD-23m63
Cyanide hydratase (NC 0104650) Geobacillus. sp. Y4.1 MC1
Nitrilase(NC015660) G. thermoglucosidans C56 –YS93
Nitrilase (CM001483) G. thermoglucosidasius TN0-09.020
Nitrilase (NC 015660.1) G. thermoglucosidasius C56-YS93
Hypothetical protein (JH414751) B. smithii 7_3_47FAA
88
76
53
95
88
52
87
100
84
100
99
63
100
100
0.2

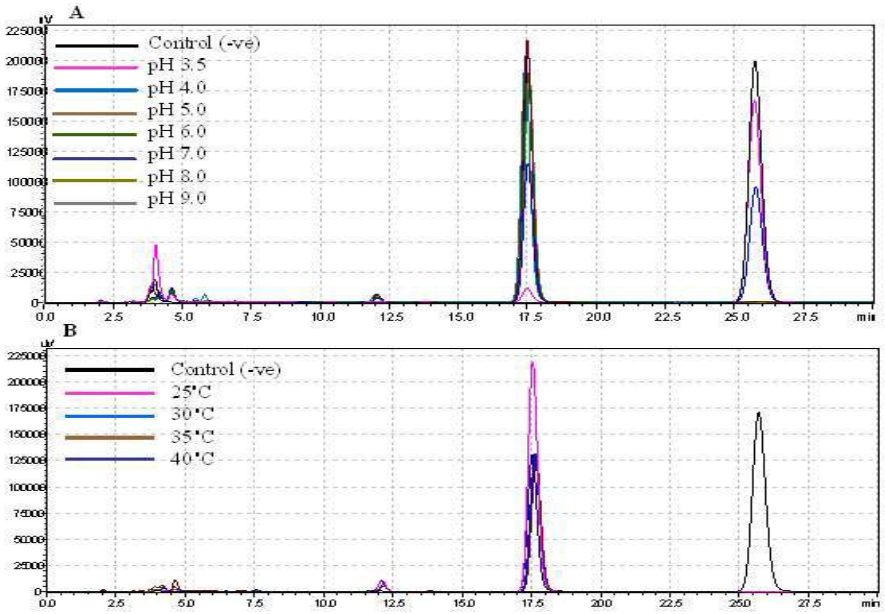
도면5


Glu
Lys
Cys
YC6258_SgvB
gi|40890257
gi|40890105
gi|40890171
gi|40890141
gi|114569664
gi|336235487
gi|312111036
gi|134034945
Clustal Consensus

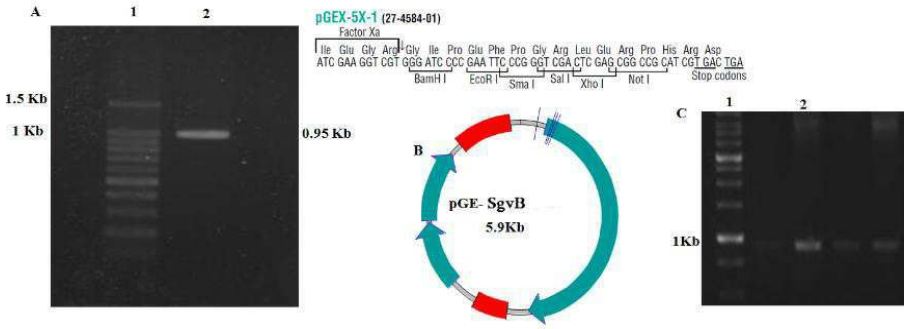
도면6


A
Sangivamycin
Toyocamycin
B
Toyocamycin
C
Sangivamycin
mV
min

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Gyeongsang National University

<120> Novel Nitrilase and Preparation method of Sangivamycin using the same

<130> P2013-272

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 1

Met Gln Thr Ala Pro Val Tyr Phe Asp Lys Asn Ala Ser Thr Glu Lys
1 5 10 15
Ala Cys Arg Leu Ile Arg Glu Ser Gly Lys Lys Gly Ala Lys Ile Val

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

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

165 170 175
Ile Ser Ala Trp Pro Phe Pro Asp Phe Ile Ser Asp Ser His Pro Ala
180 185 190
Lys Gly Leu Ala Met Ala Arg Ala Phe Ala Ile Gln Gly Arg Cys Phe
195 200 205
Val Ile Ala Ser Ala Ser Leu Leu Gln Arg Ser Asp Leu Pro Asp Glu
210 215 220
Tyr His Thr Leu Val Asp Gly Trp Lys Phe Ala Pro Gly Glu Gly Gly
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Pro Phe Lys Ala Leu Phe Asp Val Ala Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp

275 280 285

Val Leu Gln Leu His Ile Asn Arg Gly Pro Arg Arg Ser Thr Leu Asp

290 295 300

Ile Asn Thr Thr Pro Glu Gln Leu Cys Ile Leu Pro Glu

305 310 315

<210> 2

<211> 954

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 2

gtgcaaacgg cacctgttta cttcgataaa aatgcttcca cagagaaagc ctgtcgactg 60

atacgggaat caggaaaaaa aggcgcgaaa attgtcgtat ttggagaatc ctggttacca 120

ggttatccat ttttcaccca tgcaccacca ttttccagca tatggcaaaa ttctatgaaa 180

atgtacctgg aaaatgccgt ggaagtacca agcaagacaa cagataaaat ctgcaaagca 240

gccaaagatg cttccacgga tgtggtgatt ggtatcgctg aacttgatgg acaaaccaaa 300

ggtacgattt attgcactct gctttatatc agccacgatg gaaaaattat cggccgacat 360

cgtaagctca aaccaacatt cgaagaacgg atggtatggg gagatggtga tggagtaggg 420

cttacagcct tcgagcgacc ctacggtcgt atcagtggcc tttcatgtgg agagcataat 480

atggtattgc cgtcatatgc attgatgtcc caaggcactc agattcacat ttctgcctgg 540

ccatttccag actttatttc tgatagtcat ccagcgaagg gactggccat ggccagggca 600

ttcgccattc agggtcggtg ctttgtcatc gcatccgcaa gtctgttaca gcgatcagac 660

cttccagacg agtatcatac acttgtcgat ggttggaaat ttgcaccagg ggagggagga 720

agctgcgtaa tcggccctga tggagaagta atagagaagt tgcgcgacaa cgaagacaac 780

attttacagg tcgatatttc actggaagca ataacaccgt ttaaagcact atttgatgtc 840

gcaggacact actccaggcc cgatgtatta caactccata tcaatcgcgg tccccgtaga 900

tcaacgttgg atatcaatac aacaccagag cagctctgca tcctgcctga atga 954

<210> 3

<211> 1155

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 3

atgattccaa ccagaaaggg ttttgcgttt gacgacgtat tgctcgttcc caaaaaaact 60

catgtaacat caagaactga agtcagtata aagtctatgc tggttcgcga tataacggtt 120

aacaccccaa ttctatctgc caataccact tggtgtacgg aaagtgctat ggcgattgcc 180

atggccgctg ctggcggcct tggtgttatt catcgcatgt gttcaatttc atatcaaagt 240

gacgaaattc gtaaagtcaa gaacagcaaa atcgcgaata ccgagaatgc cttgcgggat 300

cgaaacggca ggcttctggt ggctgccgct atcggcacca atcatgatta cgcggaaaga 360

tccgtcagtc tggtggaagc gggagcagac attctggtca ttgatgtcgc tcacggtcac 420

tcccaacagg ccattgacgt tctcagggaa ctcaaacaac gttttccaga tatacggttt 480

attgccggta acgtcgcaac tgcagacgct accagggaat tgatcgaagc cggtgctgac 540

gctattaaag ttggaatcgg cccaggatca gtatgcacaa ccagaatcgt aaccggtgcc 600

ggtgttcctc aggtcacggc tatccacgag tgtgccactg cagcaagacc ttatggtatc 660

ccgacaattg cagacggcgg catcaagacc tggggcgata ttgcaaaagc gattgcagct 720

ggcgcggata ctgtcatgtt gggtggaatg ctggccggaa ccacagaaag cgcagcctcg 780

ctagtcgaaa aagatggaca gaaattcaag gtatctgacg gcttttccac tttgggtatg 840

aagcactatc gcgaagtaaa atccaatgtt caggcagaca agaaaaaacc ggacaactac 900

gcttctgaag gcattgagat ggtcacacca tatatcggag atgttacgcc tttgatagat 960

gaagcttctg ccgccctaag gtctgccctc agttattctg gtgcccgtaa tctgtctgag 1020

tttcatagcc aggcagagtt tatagaaata acccccttccg gatatcagga aagcaagcca 1080

cacatttatg atcgtcattt caatacatac caaaagtccg attacaaaga tggtatctat 1140

cggaatattc aataa 1155

<210> 4

<211> 681

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 4

atgtcaataa aactgctctt tctggatatg gaaggaacaa tatatgccaa acagcacgtc 60

aggatgtctg atggagagat cagcgatcac aatagtctgt ggtcgagatt aatgaaagag 120

ttgggtgaga atgctatcag cgacaacgaa aagaccatcg agaaatggga gaatggtgta 180

tataaaagct acctggaatg gtgtgatgaa agtgttcgca atcttgccag gcacggtctc 240

accaaagagc tttttcaaga aatcatgtac agcatcgatt ataacccgga ggtaaaagag 300

actatctccg aagtacatcg gcgtggtatc aaaaccgcaa tcatttccgg cggttttgcc 360

catcaaacca aaagagccca ggtagactta aagataaacc atgcatgctc tgctgtggaa 420

atattttggg acgaacaagg aaagccatct cattggaaca ttttcccatc cgacttcgaa 480

ggcaaagttg attacgtaaa attactatcc agagaatata aactctcact cacagaatgt 540

gcttttatcg gtgatggaaa aaacgatgta caaatagcaa aagaagtctc tgtttctttt 600

gcttatcaag ctcatgaaca actcaaaaaa aatgctactt atacaattga tcgattctca 660

gaaatattaa aatttatctg a 681

<210> 5

<211> 522

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 5

atgaaaccag aaccaatctg gaagagacaa cagcttttga aaatcagctg gtcagccttg 60

ggagagaaaa tacaatacct ctccgagcaa gtaggcaagc gtgatgatct acctgaagta 120

gtgattggaa tatccagggg tggattaata ttggcacagt gtctcgccca taccctggat 180

acaaaagagt gctactgcat cggaatcttc aggaacactt ctgaaaccaa atacagtcag 240

cgaggtcagc ctttttttaa atggggttta tctgcagata tcgtcaataa caagtctgtc 300

atcattgctg atgatatcgc cggagacggt ggcacactga aatccgccgc agaatatctt 360

atagaacttg gcgcagcatc tgtcacgacc tgcgttattg tcaaaaacaa aggttgcagg 420

aaagatcctg actatttcgc aactgaagtt gatgactggg ttgtgtttcc atgggaactg 480

ttaaatgaaa atgaacagac tcctgttacc actatcgctt aa 522

<210> 6

<211> 993

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 6

atgccatgca caatcatatc aggtgggcaa tggggtgatg agggtaaggg caagattgcc 60

agttacctgg ctctcagaga tcaaccaaat atactatgcc gcgcaggact tggtcctggt 120

gcgggccata cggtagaaca caatggaaac acttataaat taaggcagat tcccagcggt 180

tttatgaact gcgatgcaaa actactgata ggtgcgggcg cgcttattaa tcctgaagtc 240

ttattgggcg aagttgaaaa atactctctt aatggtcgat taagagttga tggtcgtgcc 300

accgtgatcg aacagaagca catcgaacag gatacccaac aggatcacct tactaaggtc 360

atccaaagta caggcagtgg ccatggtccc tgtttgatgg acagagcgtt acgaactgcc 420

aagatggttg cacaggttga cgctttacaa cctttggcga ttgatgttgc aacagaggtc 480

aacgcagctc ttgaacgtga tctctgtgtt cacatcgaag gaacaaacgg gttccagttg 540

tctgtcttat acggaaccta cccatatact gtgagcaaag attcaaccgc cagtactttt 600

gctgcagatg ttggtgtcgg gccgactcgg attaacgatg tggtattggt attcaaaacc 660

tttccaacca gagtaggtca tggaccattt cctcatgagc tgaacgataa cgaacataac 720

atccaggaat tcggaacggt gacaggtaga aaacgacgcg tgggacgctt cgatatggat 780

gcggctcttc aggcagcacg tataaattcc gccactcaga tcgctctttg ctttatggat 840

cgtatcgatc cagactgcac cggaaaaaca tttgagcaac ttaatcgtga agcaagatct 900

ttcatcgacc agctggaatc gatcacaaat atccctgtga cgctcattgg cactggcccc 960

aaaaccactg acattatcga tcgaacacaa taa 993

<210> 7

<211> 1353

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 7

atgaatataa acccgataga tgaaggtcgc tatggcagtc tggagatgag acgactgttt 60

agtaaaaagt ttaaatacca aacctatatt gaaatcgaaa aagaactcgt gattgcactg 120

ttcgaggcag gggaaattgc caggcatgat gttgatatca tcattcaaaa ggcggagcat 180

tacgacccgg acctgaaagc tatcagcgat attgagtctt ccactcgcca tgaagtggca 240

gccgtaataa aacatttttc ctctctctgt ggtgaagctg gaaaatatgt tcattttgga 300

gcaaccagta gtgacatcct tgataccacc actgcgatac aacttaagaa agccagcacg 360

ttgcttgaaa gactgctcac cgagttatgc gaattagcat gcaatcatgc attcgaacat 420

caagacttga tcatgatagg tcgtactcat ggtcaacagg cattacctat tacacttggg 480

tttaaatttg ccaattgggc tgatgaactg agcagacacc tgattcgttt taggcaaatc 540

aaaagtagat tatttgttgg taagttggca ggcgcggttg gcgcttcggc agctattgag 600

actgatgata taagtattga aagcagggtc atgcaaaggc tcggtatcac cgccggtaat 660

atctccactc agatagttca cagagaccga attgcggaat ttatttgttt ctcagcactg 720

cttgccagtt ctctggataa tatcgccaca gaaatcagaa atctccagag aaccgagatt 780

gatgagctgc gcgaaccatt cggactggca caccaaattg gtagttctac catgccgcac 840

aaacgaaatc ctgtactctg cgaaaatatt tgcagcttgg cgagattact cagaggcatg 900

gtcatcccgg cgatggaaaa catggtcagc tggcatgagc gtgatcttgc aaattcagcc 960

aatgaacgat ttatcattcc acaggcatgc ctgttactgg aagagatcct acaaaaagcc 1020

gtcactatct ttaaagatat tagtatcaac agagacagta tcgaacgaaa tctacgtgag 1080

ttcggtcaga aatatatggc agaggcggtt atgcttgaat taataaagca cggtgttgac 1140

cggcaagttg cctaccatga gctgaggtct ctttctcacc tccaagatag cgatgagttc 1200

gaaatgctcg ttaaaaataa cttactaata accaatacgt tatcaatttc gatcattgaa 1260

gagctattaa agcctaagaa ctacattggc cactgcgcag aaaaagcaat tttagtggca 1320

caaaatgttt tgaacgaaat aaaaaacggc taa 1353

<210> 8

<211> 489

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 8

ttgcacggcc atgaaggact ggtacatatt ttccttgaag gtgaaaacct gaccaaggga 60

atggttactg attttaaaca cctgggatgg ctcaaaactt ttctggatga ctcattggat 120

cacaaattta ttattgatcg tcatgacccg aattttcaga agattatgaa taccgcacat 180

ccgataagca gcactagcca gtcattcgta acagtggatg accaccagct gtcttttcaa 240

aacatcacca tacccggcag caacgatatt gtcgcctgtc gtctcaatac cgatactctg 300

gattcacctc tggagcaaga gttttatcaa agttttgtga ttgtggattt tgtgccaact 360

tcagaaaact taagcaagtg gatatttgat attgctaccg tccggatgga aaaactcggt 420

ataaaagtct cacaggtaga ttggtttgaa acgcctaaat cccgctcaac ctattacaga 480

tcagcctga 489

<210> 9

<211> 873

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 9

atgaaatacc aatggtctga gatttttta tcgattgagg gcgaggccaa atggtctggc 60

cacccaaccg tctatatccg ttttacccgt tgcaattttt cctgcaaagg ctttaacaat 120

ccagacaata ttgagcctgc ctccgaacgt gcgctgggat tttctccgca gcacatcaac 180

actatttcag aaataccgga aatctcaatt ggttgtgaca gcatctattc ctggcacaaa 240

gatttccggc atctctggca tcagggtgat gagcatgttc tggcggcaga agttaccaaa 300

gtacttcctt cttatggttg gaaatccaac accggccagg aagtgatatt aagcctcaca 360

ggtggcgagc ccaccttaca tgccaaaacc attcctcacc tgttatcgac accggaattt 420

aatcaggtaa agcatgtact gattgaaact aattgcagtg ttcccttgtc tgaaacgttt 480

atcacggcac tggatgactg ggccctgaat cgaaaaggcc gtattacctg gtcaaacagc 540

cccaaactca aagcaagcgg agaacctttt gacaaagcaa tcaggcccga aatcgcgtta 600

atgcaacgac gagtaactca ggatcgctgc attcagtatt tcaaatttgt ctgccgtaat 660

gatgatgact ttcaggaagt ccagtacgtt atggaacaat attaccgtgc gggcattccc 720

cgcaacgtag aagtctacat tatgcctatg gcgtgtactg aacagcagca aaaaaaagtt 780

atgcaggatg tcgcaatgaa atgcctggaa tatggattca tttactgtca tagaattcaa 840

aatactgtct tcgaaaatgc catcggcaaa taa 873

<210> 10

<211> 684

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 10

atgacaaaaa aaacaaaagc gctggttgtt ctttccggag gacaagacag caccacctgt 60

ctttattggg caaaagaaaa ttttgacgag gttctgtgta ttacctttga ctataaccaa 120

agacattcta ttgagcttga ctgtgcaaaa aaaatatctg aaatcgcagg agtcgagcag 180

gaagttatta gaatgggtga aatattcaaa ggcctcagtc ctttgacgga taaaacaaaa 240

tcagtcgaac aatatgaatc cgcagataca ttaccgggcg gtcttgaaaa cacgtttgta 300

ccaggtcgca acatgatgtt tttaacggtg gcagccaatc gtgcttacgt acatgaatgt 360

gacaccattg ttatcggcgt cagccaggaa gactacggcg gctacccgga ttgtcgcagc 420

gaatacatcg aacaaatgga aaaagcgatt gagtttgcac tggacaaaaa aattaaaata 480

gccactcctc ttatcaatct aaataaaaag caaactgttg agatggcaaa agaattttca 540

ggctgtatgg acgctctttc atattcacat acatgttata acggtgtttt ccctccatgt 600

ggaaaatgtc attcatgcct gctcagactt agaggtttcg aacaagcagg tgaaactgat 660

cccatatatc gcagagtaag ctga 684

<210> 11

<211> 531

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 11

atgctaaaca atcttgggga gaatgttgaa cgcgaagggc ttctggatac cccgaagcgc 60

tatgccaaag ccatgatgta tctcactcaa ggttataaag ccgacataaa agaagtaata 120

aatggcgctc tcttcagttc cacggccact ggagtagtgg tggtaaaaga catcgatttt 180

ttcagcatgt gtgaacacca catactgcca tttcacggaa aagttcatat tgcttacatc 240

ccgagcggta aagtactggg cctgtcaaaa ttcgcccgtg tcgtcgaagt atttgccaga 300

cgcttacaga ttcaggagca gttaaatgaa cagattgcag atgccattga ggacatcctg 360

gaacccaagg gggttatcgt ttctatcgaa gcagcacaca tgtgcatgtc catgcgtggc 420

gttcagaaaa ttggttcaaa aacactgacc accgttgcca gaggtgaact gaaagacgat 480

cagaagtgca acgagacact gtttaaattt tttaacagca gcgtcagcta a 531

<210> 12

<211> 501

<212> DNA

<213> Gynuella sunshinyii YC6258

<400> 12

atgaaagtat ttaaaccttt gctactgctt gctgctctgc ttggaatggg agggtatacg 60

caggcatctg gccagttaaa gccgtttggt gagtttggtt ttatcggtcc atatggcgtg 120

ggcattggtg ccggcgcgtt ttatgataag ccggagatga ttcaatacat taaaggattc 180

tggggcggtg ccgcattatt gttggatgat gaaactgata atggttatgg aaactacact 240

gaaagcgtgc tggattttca tggtggcatc tcttttgaca gccgccaaat tcctggtttg 300

gatcaggtgg aaaaattaac attatttaca ggtttatctg tagcctttcg cgattatgaa 360

caccaaggtg aaaatcggag ccggacaatg tttggaccag ttgttggtgc ggtgtatgaa 420

gtatcgcaac actggactct aggcggtatg ttgtccacta ctacgaatga tcccaggttg 480

atattcagct attccttcta a 501

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

atgaattcat gcaaacggca cctgtt 26

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

atctcgagtc attcaggcag gatgca 26