(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월05일
(11) 등록번호 10-2234586
(24) 등록일자 2021년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/80 (2006.01) *C07K 14/375* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12P 13/02* (2006.01)
C12P 17/00 (2006.01) *C12P 17/10* (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/80 (2013.01)
C07K 14/375 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0132158
(22) 출원일자 2019년10월23일
심사청구일자 2019년10월23일
(56) 선행기술조사문헌
Angelique C.W. Franken 등. BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS. Vol. 13, No. 6, 페이지 482-492 (2014.07.25.)*
C. Burns 등. Fungal Genetics and Biology. Vol. 42, 페이지 191-199 (2005.01.05.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
노현수
경상남도 진주시 신안들말길 17, 104동 103호(신안동, 주공1차아파트)
김민식
경상남도 진주시 평거로39번길 17, 107동 1405호 (평거동)
(74) 대리인
위병갑

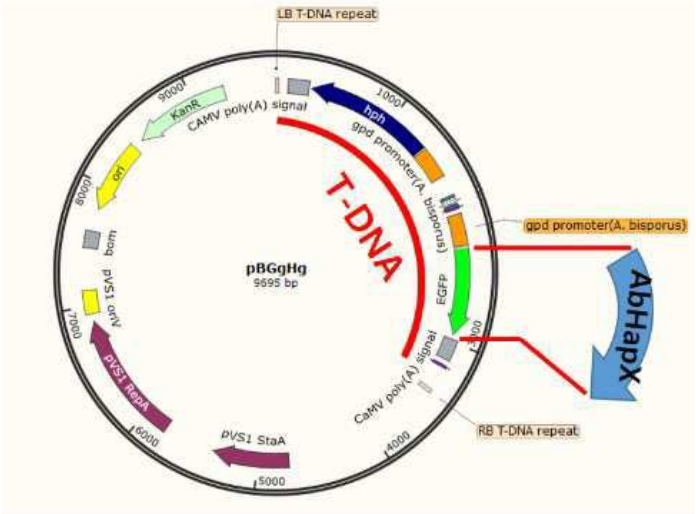
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **버섯에서 시데로포아를 생산하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 양송이버섯이 배지 중 철이온이 존재할 시, 시데로포아 생합성이 중단되는 문제를 해결하기 위하여, 철이온에 의하여 발현이 중단되는 시데로포아 생합성관련 전사인자인 HapX 유전자가 상시 발현 프로모터에 의하여 조절되는 형질전환체를 제작하였다. 그 결과 양송이버섯 형질전환체 T2 균주는 야생형 양송이버섯에 비하여 철 이온의 존재유무와 무관하게 10배 이상 시데로포아 생산능력이 향상되었다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 9/0008 (2013.01)
C12P 13/02 (2013.01)
C12P 17/00 (2013.01)
C12P 17/10 (2013.01)
C12P 17/182 (2013.01)
C12Y 102/01012 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01368102
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농업생명공학연구단
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 시데로포아를 대량생산하는 형질전환 양송이 구축
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상대학교(산학협력단)
연구기간 2018.02.01 ~ 2020.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

양송이버섯에서의 시데로포아 생산능이 강화된 신규 아가리쿠스 비스포루스 (Agaricus bisporus) 균주에서,

상기 균주는 배지에 철이온의 존재 유무와 관계없이 시데로포아를 생성하는 것을 특징으로 하고,

상기 균주는 철이온 (Fe3+) 결합능력이 증가된 것을 특징으로 하는, 양송이버섯에서의 시데로포아 생산능이 강화된 신규 아가리쿠스 비스포루스 (*Agaricus bisporus*) 균주 (수탁번호 KCTC18789P).

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 균주는 철이온 (Fe3+)의 존재 유무와 관계없이 6000 mAU 내지 6500 mAU의 시데로포아가 생산되는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 8

제5항의 균주로 부터 재배되는, 시데로포아 생산능이 강화된 양송이버섯.

청구항 9

삭제

청구항 10

제5항의 균주, 상기 균주의 파쇄액, 상기 균주의 배양상등액, 상기균주의 자실체 또는 이의 혼합물을 포함하는, 양송이버섯에서의 시데로포아 생산용 조성물.

청구항 11

제5항의 균주로 부터 양송이버섯을 재배하는 단계를 포함하는, 양송이버섯에서 시데로포아를 생산하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 버섯에서 시데로포아 (siderophore)를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 철이온 (Fe^{3+})은 생명체 내에서 단백질 혹은 유기성 저분자물질과 결합하여 각종 산화환원 반응에 관여하는 필수 미량영양소이다. 자연환경에서 철은 생명체가 흡수하기 어려운 조건으로 존재하기 때문에, 미생물들은 철의 효과적인 흡수방법의 하나로 시데로포아 (siderophore)를 세포외로 분비하여 철이온을 흡착한 후 다시 세포내로 흡수하는 방법으로 철을 확보하는 전략을 취한다. 시데로포아는 배위결합을 통하여 금속이온과 결합하는 저분자 유기물질로서, 구조적으로 카르복실레이트류 (carboxylates), 하이드록사메이트류 (hydroxamayes), 카테콜레이트류 (catecholates) 등으로 나뉜다 (Aznar and Dellagi (2015) J. Exp. Bot. 66, 3001-2010).

[0003] 한편, 시데로포아는 철이온의 흡착 기능은 다양한 분야에 응용되고 있다. 병원성 미생물의 경우 철이온의 이용 능력이 병원성에 영향을 미치는데, *Pseudomonas spp.*가 생산하는 시데로포아인 desferol은 의약품으로 개발되어 병원성 미생물의 병원성을 약화시키기 위해 이용되고 있다 (Visca et al. The Dual Personality of Iron Chelators: Growth Inhibitors or Promoters? Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:2432-2433). 또한, 항생제의 흡수를 방해하여 항생제 내성을 나타내는 경우 항생제를 시데로포아 결합체 형태로 처리하여 항생제 흡수를 촉진시켜 항생제 내성 미생물을 제어하려는 시도도 이루어 지고 있다. 뿐만 아니라, 시데로포아는 철이온 이외의 다른 중금속과의 결합능력이 있어서 이를 이용하여 오염수의 중금속 제거에 사용하려는 시도가 이루어 지고 있다 (Saha et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environ Sci Pollut Res Int. 2016;23:3984-3999).

[0004] 최근 연구결과에 따르면, 유산균인 *Lactobacillus casei* 가 생산하는 시데로포아인 ferrichrome이 쥐 모델시스템에서 대장암을 효과적으로 막아주는 결과가 보고되었다 (Konishi et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. Nature communications 2016;7:12365). 이는 그 동안 유산균이 대장암에 효과를 보여주는, 중요한 역할을 수행하는 물질이 시데로포아일 가능성을 의미한다. 시데로포아는 미생물의 종류에 따라서 다양한 구조를 가지고 있으며, 일부 주요 시데로포아의 경우 구조적인 복잡성으로 인하여 화학적 합성은 매우 어렵다.

[0005] 곰팡이류에서 시데로포아는 하이드록사메이트류 시데로포아인 페리크롬 (ferrichrome)과 퓨사리닌 (fusarinine)이 주종으로, 이들은 비 리보좀 펩타이드 생합성 효소 복합체 (nonribosomal peptide synthetase assembly, NRPS)의 활성을 통하여 생합성된다. Aspergillus fumigatus를 모델로 하는 생합성 경로에 따르면, 하이드록사메이트류 시데로포아는 비단백질성 아미노산인 L-오르니틴 (L-ornithine)을 전구체로 하여 생합성 된다. L-오르니틴은 SidA 유전자가 코딩하는 ornithine-N5-monooxygenase에 의하여 N5-hydroxyornithine 으로 전환되고, N5-hydroxyornithine 는 N-acyltransferase류 효소 SidF 및 SidL 활성에 의하여 각각 N5-acylation되고, 이들이 SidD, SidC NRPS 활성을 통하여 각각 fusarinine C와 ferrichrome이 생합성된다. 버섯류 중에서는 양송이버섯에서 Aspergillus 등 자낭균에서와 마찬가지로 ferrichrome 과 fusarinine 등 하이드록사메이트류 시데로포아의 존재가 밝혀졌다 (Eng-Wilmot et al. 1992).

[0006] 상기한 문헌 연구를 통하여 자낭균에서 Sid 유전자와 전사인자들이 시데로포아의 생합성에 관여하는 것으로 밝혀졌으나, 담자균인 식용버섯에서는 관련 연구가 전무하다.

[0007] 따라서, 본 발명은 식용버섯인 양송이버섯에서 시데로포아를 고농도 생산하기 위하여, 담자균내에 시데로포아 생합성에 관여하는 유전자들을 발굴하였고, 이들 중 시데로포아 생합성을 결정하는 유전자를 결정하였으며, 이를 통하여 HapX 유전자의 동종 유전자 (homologous gene), AbHapX가 시데로포아 생합성에 결정적인 조절인자임을 밝혔다. 한편, 양송이버섯 AbHapX는 철의 결핍조건에서만 발현되므로 배지 중 철이온이 존재하는 경우 HapX의 발현이 억제되었다. 때문에 버섯균의 배양을 통한 시데로포아의 생산을 위해서는 철이온이 결핍된 최소배지를 사용해야한다. 반면 최소배지를 사용하는 경우 버섯균의 성장이 극히 저해되어 목표하는 시데로포아의 고농

도 생산을 달성하기 힘들게 된다.

[0008] 이러한 문제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 HapX 유전자 상시발현을 통하여 철이온의 존재시에도 시데로포아가 과량생산되는 형질전환체를 통하여 시데로포아 과량생산을 시도하였고, 통상적인 복합영양배지 조건에서도 시데로포아를 대량생산하는 버섯형질전환체를 제작하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 통상적인 복합영양배지 조건에서도 시데로포아를 대량생산하는 버섯형질전환체를 제공하는 것을 목적으로 하며, 이를 통하여 시데로포아를 대량 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "GPD 프로모터"는 서열번호 3으로 표시되고, "AbHapX 유전자"는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 'GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터'가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 균주를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "벡터가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 균주"는 아그로박테리움 투메파키엔스 AGL-1 (*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1) 균주인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC18789P된, 시데로포아 생산능이 강화된 신규 아가리쿠스 비스포루스 (*Agaricus bisporus*) 균주를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "아가리쿠스 비스포루스 균주"는 철이온 (Fe^{3+}) 결합능력이 증가한 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "아가리쿠스 비스포루스 균주"는 철이온 (Fe^{3+})의 존재 유무와 관계없이 6000 mAU 내지 6500 mAU의 시데로포아가 생산되는 것을 특징으로으로 할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 'GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터'가 형질도입된 '시데로포아 생산능이 강화된 아그로박테리움 투메파키엔스 AGL-1 (*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1) 균주'가 도입된 시데로포아 생산능이 강화된 양송이버섯을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 'GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터'를 포함하는 시데로포아 생산용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC18789P된, 시데로포아 생산능이 강화된 신규 아가리쿠스 비스포루스 (*Agaricus bisporus*) 균주, 상기 균주의 파쇄액, 상기 균주의 배양상등액, 상기균주의 자실체 또는 이의 혼합물을 포함하는 시데로포아 생산용 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 AbHapX 유전자를 과발현 시키는 단계를 포함하는 버섯에서 시데로포아를 생산하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "버섯"은 양송이버섯인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "AbHapX 유전자를 과발현 시키는 단계"는 'GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터' 또는 'GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모

터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 균주' 를 이용한 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 양송이버섯이 배지 중 철이온이 존재할 시, 시데로포아 생합성이 중단되는 문제를 해결하기 위하여, 철이온에 의하여 발현이 중단되는 시데로포아 생합성관련 전사인자인 HapX 유전자가 상시 발현 프로모터에 의하여 조절되는 형질전환체를 제작하였다. 이를 통한 양송이버섯 형질전환체 균주는 야생형 양송이버섯에 비하여 철 이온의 존재유무와 관계없이 시데로포아를 10배 이상 생산하는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 AbHapX 단백질 서열내에서 HapX가 가지는 bZip 전사인자 도메인과, 효모 Hap4 결합 단백질 결합 도메인이 존재함을 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 AbHapX가 담자균의 HapX와 같은 그룹으로 묶임을 곰팡이들의 HapX 단백질의 분류도로 확인한 도이다 (양송이버섯 AbHapX의 위치는 화살표로 표시).

도 3은 본 발명의 양송이버섯 재조합 벡터 pBGgHg2-hapX를 벡터맵으로 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 양송이버섯 형질전환체의 제작과정을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 양송이버섯 형질전환체의 DNA 마커를 분석한 도이다.

도 6은 본 발명의 양송이버섯 형질전환체의 RT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 양송이버섯 형질전환체의 b-tubulin 대비 AbHapX, AbSidD 유전자 발현량을 분석한 도이다.

도 8은 본 발명의 양송이버섯 형질전환체의 안정성 확인한 도이다.

도 9는 본 발명의 양송이버섯 형질전환체가 생산하는 시데로포아를 HPLC로 분석한 도이다.

도 10은 본 발명의 양송이버섯 형질전환체를 크롬 아주롤 S (Chrome azurol S; CAS)를 이용하여 시데로포아 철 이온 결합능력을 검증한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GPD 프로모터는 서열번호 3으로 표시되고, 상기 AbHapX 유전자는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 또한, 본 발명은 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 벡터가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 균주는 아그로박테리움 투메파키엔스 AGL-1 (*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1) 균주인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC18789P된, 시데로포아 생산능이 강화된 신규 아가리쿠스 비스포루스 (*Agaricus bisporus*) 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 아가리쿠스 비스포루스 균주는 철이온 (Fe^{3+}) 결합능력이 증가한 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 아가리쿠스 비스포루스 균주는 철이온 (Fe^{3+})의 존재 유무와 관계없이 6000 mAU 내지 6500 mAU의 시데로포아가 생산되는 것을 특징으로으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 본 발명은 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게

연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 아그로박테리움 투메파키엔스 AGL-1 (*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1) 균주가 도입된 시데로포아 생산능이 강화된 양송이버섯을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0033] 또한, 본 발명은 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터를 포함하는 시데로포아 생산용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0034] 또한, 본 발명은 기탁번호 KCTC18789P된, 시데로포아 생산능이 강화된 신규 아가리쿠스 비스포루스 (*Agaricus bisporus*) 균주, 상기 균주의 파쇄액, 상기 균주의 배양상등액, 상기균주의 자실체 또는 이의 혼합물을 포함하는 시데로포아 생산용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0035] 마지막으로, 본 발명은 AbHapX 유전자를 과발현 시키는 단계를 포함하는 버섯에서 시데로포아를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 버섯은 양송이버섯인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 AbHapX 유전자를 과발현 시키는 단계는 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터 또는 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터가 형질도입된 시데로포아 생산능이 강화된 균주를 이용한 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0040] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0041] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0043] 일 측면에서, 본 발명은 GPD (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 AbHapX 유전자를 포함하는 시데로포아 (siderophore) 생산능이 강화된 재조합 벡터를 제공한다.

[0044] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0045] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된 (operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결 (functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0046] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al.(2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시

로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0050] **준비예 1. 버섯균의 배양조건**

[0051] 농가로부터 수집한 야생형 양송이버섯균 3종을 다양한 퇴비 추출물을 수집하여 건조시킨 후 50 g/L 로 추출하고 배양하며 성장특성을 조사하였다. 하기 표 1의 배지조성으로 고체평판배지에서 각 균주를 접종한 후, 25℃ 에서 2주간 배양하고 배양된 균사체의 지름을 측정하였다. 그 결과, 양송이버섯 NH 균주가 톱밥 추출물 3번 배지에서 가장 우수한 성장을 보였다.

표 1

[0052]

배지	조성	균주별 성장 (cm)		
		NH	HO	TM
PDA	PDA 24 g/L	1.2±0.1	1.4±0.1	1.1±0.1
톱밥 1	PDA 24 g/L, 톱밥1 추출물 20%	2.2±0.2	2.0±0.2	2.4±0.1
톱밥 2	PDA 24 g/L, 톱밥2 추출물 20%	2.3±0.2	2.4±0.2	2.2±0.1
톱밥 3	PDA 24 g/L, 톱밥3 추출물 20%	2.5±0.2	2.4±0.2	2.4±0.2
볏짚	PDA 24 g/L, 볏짚 추출물 20%	2.2±0.2	2.3±0.1	2.3±0.2
왕겨	PDA 24 g/L, 왕겨 추출물 20%	2.1±0.1	2.0±0.2	2.0±0.1
밀짚	PDA 24 g/L, 밀짚 추출물 20%	1.7±0.2	1.5±0.2	2.4±0.1

[0054] **준비예 2. AbHapX 및 Pgpd (GDP 프로모터)유전자의 확보**

[0055] 상기 준비예 1의 양송이버섯 NH 균주로 부터 AbHapX 유전자를 확보하기 위하여, 버섯균을 potato-dextrose 액체배지 (PDB)에 2주간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균사체를 확보하고, 균사체로부터 염색체 DNA를 추출하였다.

[0056] 분리된 염색체 DNA 에서 AbHapX 유전자를 얻기 위하여, 기존 곰팡이균 유래 HapX 유전자의 염기서열을 비교 분석하여 HapX 유전자의 양말단에 해당하는 염기서열을 확보하고 이를 바탕으로 프라이머 세트 (표2)를 제작하였다.

표 2

[0057]

용도	서열번호	프라이머 이름	서열 (5' to 3')
AbHapX 제작	1	hapX-F	GAATTCATTTAAATCATGTCCGCAGCACTCCTAC
	2	hapX-R	GAATTCGGGCCCATTTGGGGAACGTCAGTCGT

[0058] 제작된 프라이머와 상기 추출한 염색체 DNA 를 이용하여 통상적인 PCR 방법으로 양송이버섯 NH 균주의 HapX 유전자를 증폭하였고 염기서열을 결정하였다. 양송이버섯 AbHapX 유전자는 총 4750bp의 길이를 가지고 있으며 (서열번호 4), 유전자내에 12개의 인트론이 포함되어 있었다. HapX 유전자의 상시발현을 위하여 하우스 키핑 (house-keeping) 유전자인 GDP (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)의 발현을 조절하는 GDP 프로모터 (서열번호 3; Pgpd)를 사용하기로 하고, GPD 염기서열의 upstream 264 bp를 상기한 AbHapX 유전자 확보과정과 유사한 방법으로 PCR 로 확보하였다.

[0060] **준비예 3. AbHapX 유전자의 분석**

[0061] 확보된 AbHapX유전자가 코딩하는 단백질 서열을 단백질 번역툴 (https://web.expasy.org/translate/)을 이용하여 분석하여 1258개의 아미노산으로 이루어진 단백질 서열을 확보하였다 (서열번호 5).

[0062] 본 단백질이 HapX 단백질인지를 확인하기 위하여, Motif Scan (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 프로그램으로 단백질 서열내에서 HapX가 가지는 bZip 전사인자 도메인과, 효모 Hap4 결합 단백질 결합 도메인이 존재함을 도 1과 같이 확인하였다. 또한, 서열이 알려진 곰팡이 HapX와 비교한 결과에서도 AbHapX가 담자균의 HapX와 같은 그룹으로 묶임을 도 2와 같이 확인하였다. 상기와 같은 결과들은 AbHapX 가 양

송이버섯의 HapX 임을 알려주는 것임을 알 수 있다.

[0064] **실시예 1. 재조합 벡터 제작 및 *Agrobacterium tumefaciens* 형질전환체 제작**

[0065] Binary vector인 pBGgHg로부터 eGFP 유전자를 제거하고, GPD promoter에 의하여 조절되는 AbHapX 유전자를 삽입하여 도 3과 같은 재조합 벡터 (pBGgHg2-hapX)를 제작하였다.

[0066] 제작된 pBGgHg2-hapX를 *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 균주에 도입하였다. 이를 위하여 *A. tumefaciens* AGL-1 균주를 10 mL LB 배지에 접종하고 28℃에서 OD_{600nm} 값이 0.5~0.8이 될 때까지 배양하고, 배양액을 13000rpm으로 10분간 원심분리하여 세균을 분리하였다. 분리된 세균을 1X TE 버퍼에 현탁하여 세척 후 다시 원심분리하였다. 분리된 *A. tumefaciens* AGL-1 균을 2 mL 10% LB 배지에 재현탁하고, 250 μL씩 분주하고 액체질소에 급속 냉동 후 -70℃에 보관하였다.

[0067] pBGgHg2-hapX의 도입을 위하여 상기 제작된 Competent cell 에 100 ng/μL의 pBGgHg2-hapX 벡터 10 μL를 첨가하고 혼합하여 37℃ 에서 5분간 열처리 하였다. 이후, 1 mL LB 배지를 첨가하고 2시간 동안 28℃에서 배양하고, 원심분리하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 200 μL의 LB 배지에 현탁하고 kanamycin 50 mg/L 포함된 LB agar배지에 도말하여 28℃에서 2일간 배양하여 pBGgHg2-hapX로 형질전환된 *A. tumefaciens* AGL-1 균을 확보하였다.

[0069] **실시예 2. 양송이버섯 형질전환체 제작**

[0070] 양송이버섯 NH 균주에 AbHapX 유전자를 도입하기 위하여 상기 형질전환된 *A. tumefaciens* AGL-1 균주을 100 mL LB 배지에서 OD_{600nm}값이 0.8이 될 때까지 28℃에서 배양하였다. 배양액을 5000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전된 균을 200 μM Acetosyringone이 포함된 100 mL AB-IM 배지 (Glucose 2 g/L, Glycerol 5 mL/L, NH_4Cl 1g/L, $MgSO_4$ 0.3 g/L, KCl 0.15 g/L, $CaCl_2$ 0.01 g/L, $FeSO_4$ 0.0025 g/L, 0.5M MES buffer(pH5.3) 80mL/L)에 현탁하고 6시간동안 25℃에서 배양하였다.

[0071] 양송이버섯의 주름 조직을 1 mm 크기로 자르고, pBGgHg2-hapX로 형질전환된 *A. tumefaciens* AGL-1 배양액과 섞고 15분간 배양하였다. 배양한 주름 조직을 멸균한 3MM paper를 올린 AB-IM agar 배지 (Glucose 2 g/L, Glycerol 5 mL/L, NH_4Cl 1g/L, $MgSO_4$ 0.3 g/L, KCl 0.15 g/L, $CaCl_2$ 0.01 g/L, $FeSO_4$ 0.0025 g/L, 0.5M MES buffer(pH5.3) 80 mL/L, Agar 16 g/L, Kanamycin 50 mg/L) 위에 일정한 간격으로 올린 후 3일간 25℃에서 배양하였다.

[0072] 배양이 끝난 양송이버섯의 주름 조직을 1차 선택 배지 (PDB 24 g/L, Compost extract 200 mL/L, Agar 16 g/L, HygromycinB 30 mg/L, Cefotaxime 150 mg/L, Ampicillin 100 mg/L, Kanamycin 100 mg/L, Chloramphenicol 25 mg/L, Gentamycin 100 mg/L)로 옮긴 후 25℃에서 10일간 배양하였다. 1차 선택 배지에서 균사가 자라 나오는 조직을 2차 선택 배지 (PDB 24 g/L, Compost extract 200 mL/L, Agar 16 g/L, HygromycinB 50 mg/L)로 옮겨 다시 25℃에서 10일간 배양하였다. 균사가 뻗어 나와 배지에 정착하는 조직의 균사를 분리하여 새로운 2차 선택 배지로 계대배양하여 형질전환체를 분리하였다 (도 4 참조).

[0074] **실시예 3. 형질전환체의 확인**

[0075] 상기한 *Agrobacterium* 을 이용한 형질전환법을 통하여 만들어진 형질전환체의 성공적인 형질전환여부를 삽입된 Pgpd-AbHapX유전자, 벡터 쪽 hph 유전자, 버섯의 ITS유전자 마커의 존재유무로 확인하였다. 그 결과, 도 5에서와 같이 총 172개의 시료 중 42개의 시료에서 성공적인 형질전환을 나타내는 세가지 마커가 검출되어 총 24.4%의 형질전환 성공률을 보였다.

[0076] 확인된 형질전환체들이 AbHapX 유전자를 발현하는지를 확인하기 위하여 T1, T2, T3, T4 네개의 양송이버섯 형질전환체와 야생형 양송이버섯을 각각 $FeCl_3$ 0.1 mM 이 포함되거나 포함되지 않은 최소액체배지에서 1주일간 배양한 후, total RNA를 추출하였다. 상기 추출된 RNA를 RT-PCR 분석을 통하여 시데로포아 생합성 유전자의 mRNA 발현을 분석하였다. 그 결과, 도 6에서와 같이 야생형의 경우 철이온이 없을 경우에만 AbHapX 유전자가 발현되었으나, 네개의 형질전환체에서는 철이온의 존재 유무와 상관없이 모두 AbHapX가 발현되었다.

[0077] 또한 도 7에서와 같이 T1, T2 및 T3 에서는 시데로포아 생합성의 최종단계인 NRPS 효소유전자를 coding하는 AbSidD 유전자가 AbHapX 의 발현과 유사한 패턴으로 발현됨을 확인하였다.

[0079] **실시예 4. 형질전환체의 안정성 분석**

[0080] 형질전환체가 도입된 유전자를 안정적으로 유지하는지 알아보기 위하여, 항생제 (hygromycin)가 없는 PDA배지에서 각 형질전환체를 연속적으로 20회 계대배양하였다. 배양 결과, 계대배양 회수가 증가하더라도 균사의 성장능력에는 변화가 없었으며, 균사체 콜로니모양에서도 변화가 없었다. 또한, 도 8에서와 같이 20세대 후 염색체 DNA 상 AbHapX 및 hph 유전자가 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 상기와 같은 결과는 AbHapX유전자가 양송이버섯 유전체에 성공적으로 삽입되었음을 증명하는 것이다.

[0082] **실시예 5. 시데로포아의 생산 확인**

[0083] 형질전환체의 시데로포아 생산능을 상기한 액체배지에서 배양하며 상등액내 시데로포아 농도를 HPLC 로 분석하여 검증하였다. HPLC 분석에는 C18 column을 사용하였다. 도 9에서 나타낸 것과 같이 야생형 양송이버섯은 철이온 존재하에서 배양하였을 때, 배양액내 시데로포아는 관찰되지않았고, 철이온 없을 때에만 600 mAU의 시데로포아가 생산되었다. 반면, 형질전환체 T1에서는 철이온의 존재 유무와 관계없이 6000 mAU 이상의 시데로포아가 생산되어 형질전환체의 시데로포아 생산능이 철이온에 상관없이 10배이상 향상되는 결과를 보였다.

[0085] **실시예 6. 시데로포아의 철 결합능 확인**

[0086] 형질전환체의 시데로포아 생산능력을 크롬 아주롤 S (Chrome azurol S; CAS)를 이용한 철이온 결합능력으로 조사하였다. CAS와 철이온이 결합한 CAS-철이온 복합체 (CAS-Fe^{3+})는 650 nm 근처에서 강력한 흡광능력을 보인다. 반면, 철이온이 없는 CAS는 650 nm 흡광이 줄어들기 때문에, 흡광도의 변화를 관찰하면 시데로포아의 생산을 검증할 수 있다.

[0087] 본 발명에서는 야생형 및 형질전환체 T2를 복합배지에서 1주일간 배양한 후, 철이온과 결합한 CAS 시약 (0.75 ml)에 배양액(0.25 ml)을 첨가하여 흡광도를 조사하였다.

[0088] 도 10에서 나타난 것과 같이 야생형 배양액의 경우, CAS-철이온 복합체의 흡광도는 변화가 없었는데, 이는 야생형 양송이버섯은 CAS-Fe^{3+} 에서 철이온을 뺏는 시데로포아가 생산되지 않음을 나타낸다. 반면, 형질전환체 T2에서는 650 nm의 흡광도가 급격히 감소하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 형질전환체가 만드는 시데로포아가 실제로 철이온과 결합하는 활성을 가진 시데로포아임을 나타내는 것이다.

[0090] 본 발명자는 상기 실시예에서 확인한 것과 같이 양송이버섯 형질전환체 T2 균주가 야생형 양송이버섯에 비하여 철 이온의 존재유무와 무관하게 10배 이상 시데로포아 생산능력의 향상 및 철이온 결합능력의 우수함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0092] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다.

[0093] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0095]

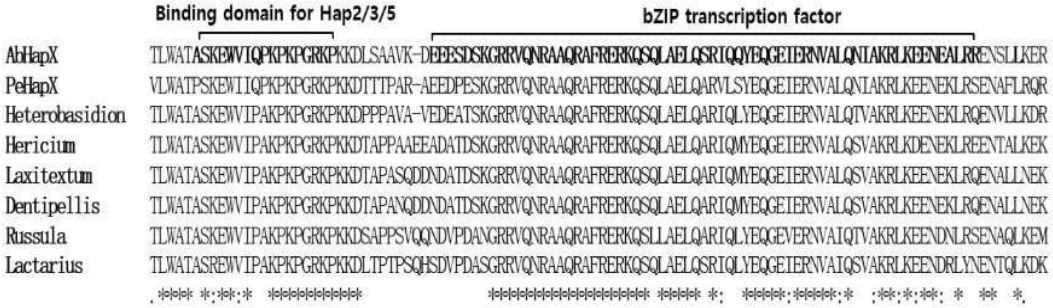
기탁기관명 : 생물자원센터

수탁번호 : KCTC18789P

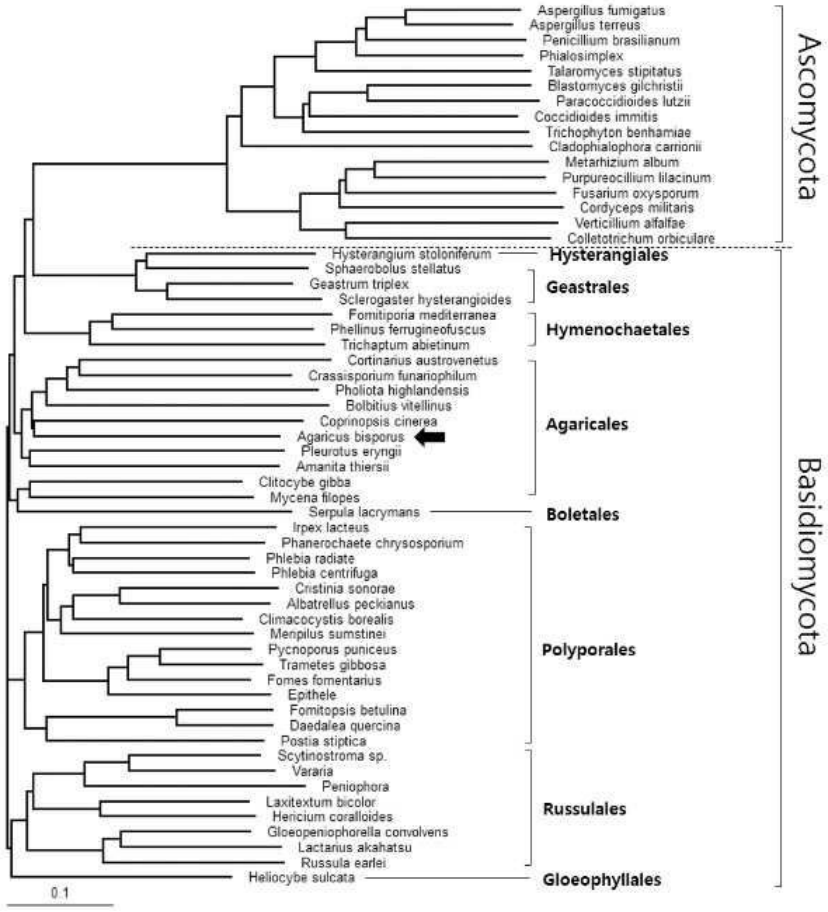
수탁일자 : 20191018

도면

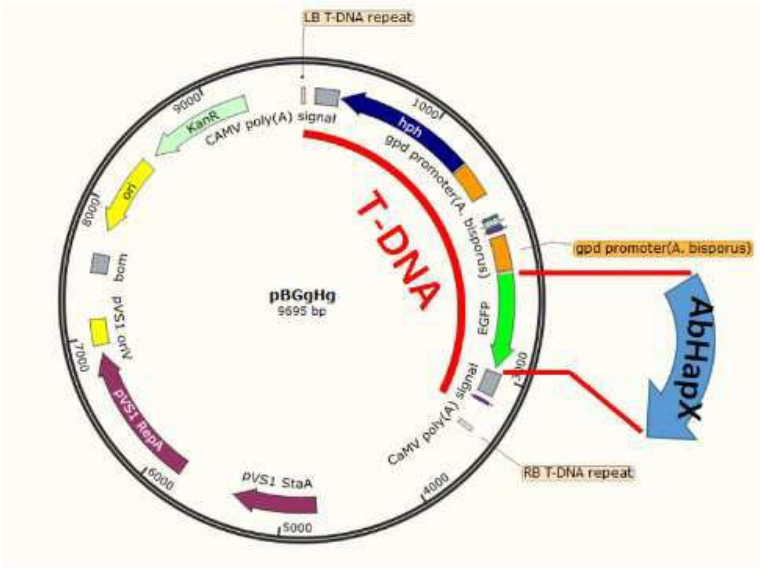
도면1


Binding domain for Hap2/3/5
bZIP transcription factor
AbHapX
PeHapX
Heterobasidion
Hericium
Laxitextum
Dentipellis
Russula
Lactarius

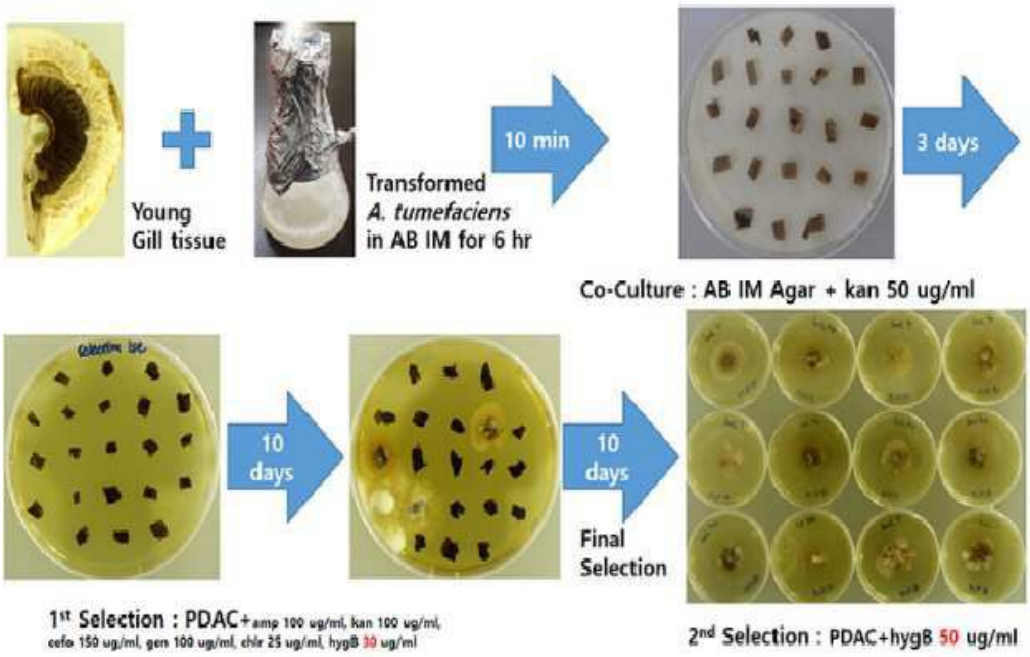
도면2


Aspergillus fumigatus
Aspergillus terreus
Penicillium brasilianum
Phialosimplex
Talaromyces stipitatus
Blastomyces gilchristii
Paracoccidioides lutzii
Coccidioides immitis
Trichophyton benhamiae
Cladophialophora carrionii
Metarhizium album
Purpureocillium lilacinum
Fusarium oxysporum
Cordyceps militaris
Verticillium alfalfae
Colletotrichum orbiculare
Ascomycota
Hysterangium stoloniferum
Hysterangiales
Sphaerobolus stellatus
Geastrum triplex
Sclerogaster hysterangioides
Geastrales
Fomitiporia mediterranea
Phellinus ferrugineofuscus
Trichaptum abietinum
Hymenochaetales
Cortinarius austrovenetus
Crassisporium funariophilum
Pholiota highlandensis
Bolbitius vitellinus
Coprinopsis cinerea
Agaricus bisporus
Pleurotus eryngii
Amanita thiersii
Agaricales
Clitocybe gibba
Mycena filopes
Serpula lacrymans
Boletales
Irpex lacteus
Phanerochaete chrysosporium
Phlebia radiata
Phlebia centrifuga
Cristinia sonorae
Albatrellus peckianus
Climacocystis borealis
Menpilus sumstinei
Pycnoporus puniceus
Trametes gibbosa
Fomes fomentarius
Epithele
Fomitopsis betulina
Daedalea quercina
Postia stiptica
Polyporales
Scytinostroma sp.
Vararia
Peniophora
Laxitextum bicolor
Hericium coralloides
Gloeopeniophorella convolvens
Lactarius akahatsu
Russula earlei
Russulales
Heliocybe sulcata
Gloeophyllales
Basidiomycota
0.1

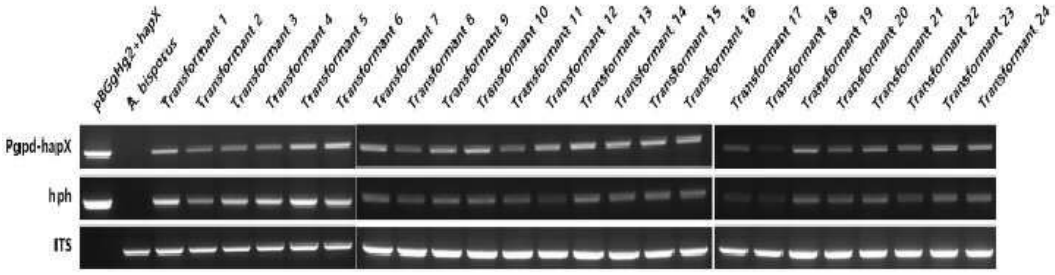
도면3


LB T-DNA repeat
KanR
CAMV poly(A) signal
hph
gpd promoter(A. bisporus)
T-DNA
ori
bom
pVS1 oriV
pVS1 RepA
pVS1 StaA
pBGgHg
9695 bp
EGFP
CaMV poly(A) signal
RB T-DNA repeat
gpd promoter(A. bisporus)
AbHapX
9000
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

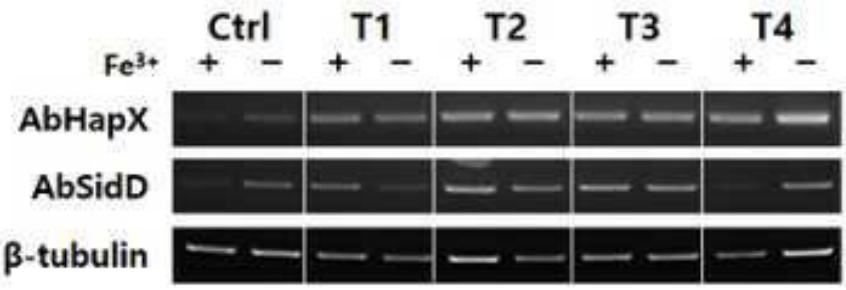
도면4


Young
Gill tissue
Transformed
A. tumefaciens
in AB IM for 6 hr
10 min
3 days
Co-Culture : AB IM Agar + kan 50 ug/ml
10
days
10
days
Final
Selection
1st Selection : PDAC+amp 100 ug/ml, kan 100 ug/ml,
cefo 150 ug/ml, gen 100 ug/ml, chlr 25 ug/ml, hygB 30 ug/ml
2nd Selection : PDAC+hygB 50 ug/ml

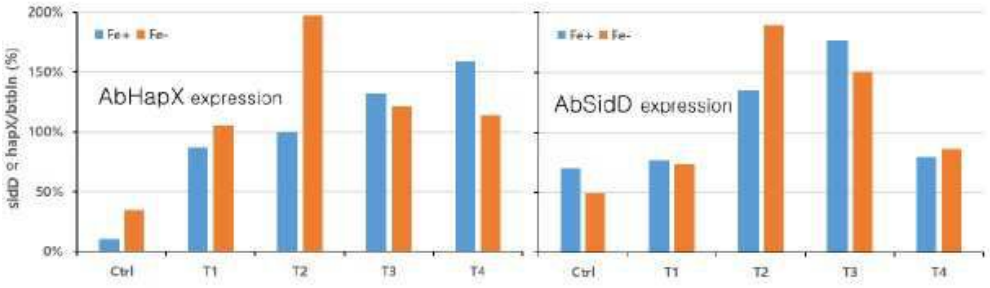
도면5



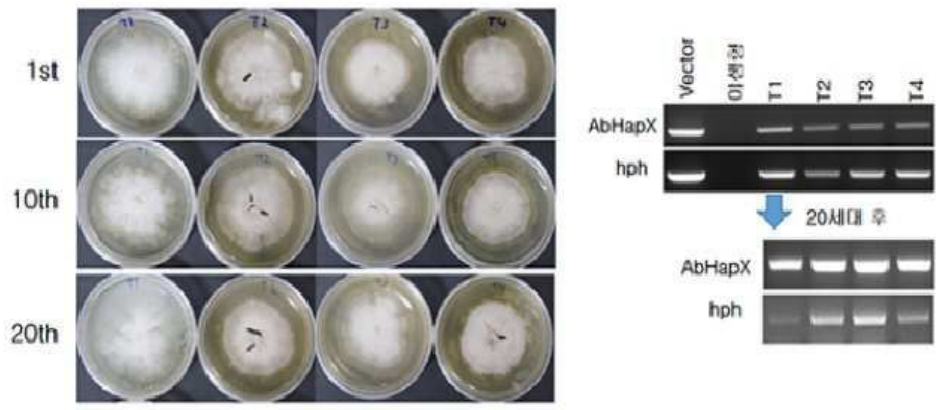
도면6



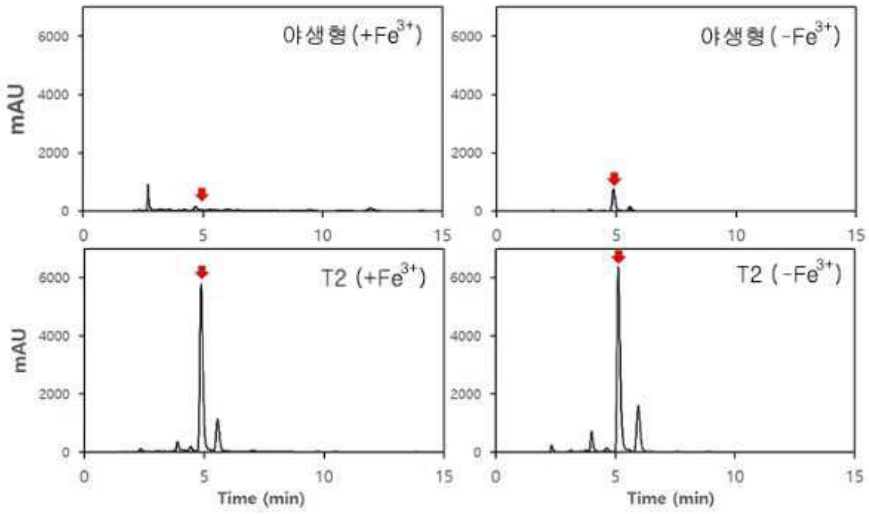
도면7



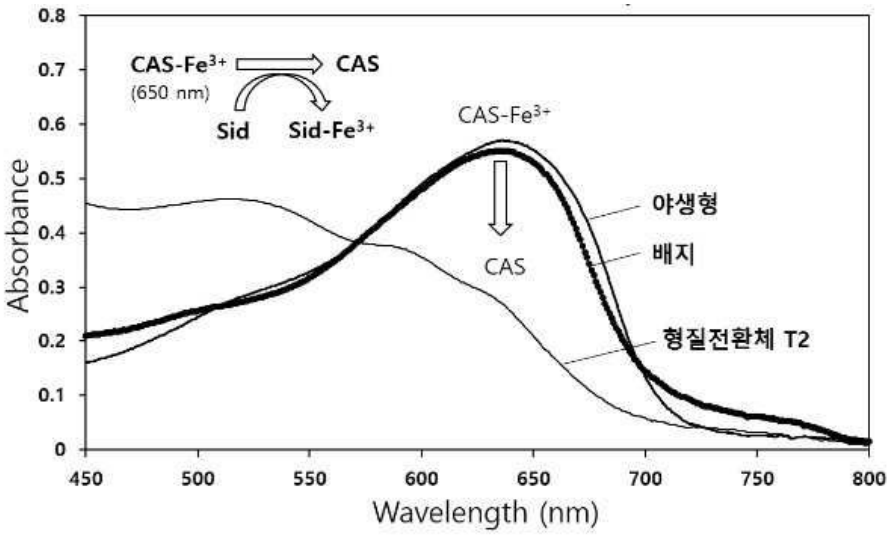
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for production of siderophore using mushrooms

<130> PN1910-510

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of AbHapX gene

<400> 1

gaattcattt aaatcatgtc cgcagcactc ctac 34

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of AbHapX gene

<400> 2

gaattcgggc ccatttgggg aacgtcagtc gt 32

<210> 3

<211> 264

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GDP promoter

<400> 3

gaggtccgca agtagattga aagttcagta cgtttttaac aatagagcat tttcgaggct 60

tgcgtcattc tgtgtcaggc tagcagttta taagcgttga ggatctagag ctgctgttcc 120

cgcgtctcga atgttctcgg tgtttagggg ttagcaatct gatatgataa taatttgtga 180

tgacatcgat agtacaaaaa ccccaattcc ggtcacatcc accatctccg ttttctccca 240

tctacacaca acaacttatc gccg 264

<210> 4

<211> 4860

<212> DNA

<213> Agaricus bisporus

<400> 4

catgtccgca gcactcctac aagatccaga agacattgac tactctgata tcgaaaacaa 60

gtaaactcga aggctacctg tagatcaacg tactcactgt ctgctagata caaaatccaa 120

tatgatgaaa gtttcgataa cgtgctcctt gtagatggtg tacccatcat cggaaaggac 180

aagctcgaaa aattgttggc aaaaatctgc aaagagttct cgagaaaggg ggttactatc 240

aaacctgatg acattcacgt cccatgggac gattcgactg gcaaaagcaa agggtgtgtg 300

tgcaacccaa aaacttttt cccggctaca ttttctcacc tacggttacg aaacagtttc 360

atctttgtag agcttcgcag tgttgacgag gctaatcttg ctttggtgtc gctccacaac 420

catccgtttg atgccagaca tatcttcaag cttaatcggt ttaccgatat agagaaattt 480

gcagaacttg atgaagtata tgtagagcca gaagaggaag agttcgctcc caaggtaagt 540

ctgtgtttcc agggaagcat tctttggtga aattaatgac gattatagga acatttgagg 600

gcttggttgg cagatcctca aggacgggat caatatgtca cataccgtgg cgaagaggtt 660

ttaattcact ggcatgggaa gccttcacag tatgagattg catacaaacc agtgcgttct 720

tttccccccg taatccatgt ttagcctctc agttccgaat ggtaggaatg gaaagatttt 780

ctctacgttg cgtggtcgcc attaggtacc tatgtcgcaa ccttacaccg gcaaggcgtc 840

cgactatggg gtggtccatc ctggaagcca caacaaagat ttgctcatcc ctttgtcaag 900

ttgattgatt tctccccatg cgagaactat atcgtcacat ggtctaatga gccaattgtt 960

gttcctgagg gtgccgtaca aggtcctcaa tatttctcac cagacgacga aggaaacaat 1020

atagctgtct gggacatcaa atctggacat cttcttcgca cattctccac atatcacgaa 1080

ggcgaaaccc ctggacagaa aaagcagatg caatggccga tcttgaaatg gagtccagac 1140

gataaattca tcgcacgctt gaccccgagt cagatgataa gcatttacga gcttccggac 1200

atgggcttgc acgggaaaaa gagtttgaag atagaaggcg tcgtagattt cgagtggtgt 1260

cctcttgggg aaagagataa agaggtgacg gagagagatg caaaaggagg aattaaaacg 1320

acgaagaaag cgcgggaaaa catgcttgtg tattggaccc ccgaagtggt gaaccaacca 1380

gcgcgtgtta ctttactcag cttccccggt cgttcaatct tgcgtcaaaa aaatcttttc 1440

aatgtcactg aagtaagttc actgttggga gatttgatat cgttgcttac gcgctactta 1500

gtgtaagctt tattggcaaa accaaggaga cttcctttgc gtcaaggtcg atcgacatac 1560

gaaaaccaaa aaatctattt tttgcaacct ggagatcttt cgaatgcgcg aaaaggactt 1620

cccagttgaa gtcattgaac tcaaaggtat acatcctatt ttggtcttgg tcatattctc 1680

actcacagct aattcccaga cactgtaact gatttctcat gggaaccaaa gggagatagg 1740

tttgcaattg tttctagtag cgatcccaac ctggggaatc ccggtcctgg catcactgtg 1800

aagaccgacg tcggtttcta tcaactcgat cactccaaaa atgattttag gctcttgcgt 1860

gagtttattc ccttgtccgt cattcgccaa tttaacgcgt ggcaggtaca ctttcttctc 1920

gcacgagtaa tgccattcgg tggtctccac gagggcgcca tgtggtgcta gcaactgtcg 1980

gttcctctac caaatcggaa ctggaatttt gggatcttga ctttaactct gacgatgcga 2040

atcgaaagga aggccaagct tctaaggatg attggggcag tggaatccag ttacttgggt 2100

ctgccgacca ctatggtgtc acagacgttg aatgggatcc aagtggccga tatctcgcta 2160

ccagcgcgag cgcttggact cacacggtac cggatttcgc accttatact tgaccacttg 2220

acgacgttgc ctttcctttc cttttatagc tagagaacgg ttatgcagtc tgggatttcc 2280

gaggacaaga actaacaaag cagatccaag atcgtttcaa gcaatttatt tggcggccga 2340

ggccccctac tctactgaca aaggagcaac aaaggactat tagaaggaac ctgcgagagt 2400

atagtcgcgt attcgatgag gaggatgcgg ccgaggaaag caatgttagc gcagagcttg 2460

ttgctttgcg gaaacgtctt gtggacgaat ggaatgcttg gcgtacattg cgcaaacggg 2520

aattggctga tgaacgtggg cacaaaaccg ataagcacga agtgagcgag gccaaggagg 2580

agattgaggt gtgggtagac gaagtcattg aacaaatcga ggaggtatta gaataatgaa 2640

tgtagggtcg gtttcgatcg catcccctgc ttggattcga attcacgcat tgatgagaaa 2700

ataagattgg ggcacatggc tgcccggaaa agaggaatgg tccgggaaga aataagctgt 2760

ttgtctgaat gaccgatcgc ctatttcgtg acagaggccg gtaatcgtgg atacgcctga 2820

ggaatctctc actcttccgt cgtgacggct tacacgtcgc ggaaaaatgg acacgcacgc 2880

tcgcgaaggc gctcatcctg ggacaggccc gcttctcacg ccacggtgtg aacttgatga 2940

aggcggggtt gcgtccccgc gggaccgaag ttgccggcta cggtaatctg ataagacaac 3000

ctccggcatc attaaagacc gtctctccct ccactttccc cgtcgcacat gtcgactccc 3060

tccccctctc ctactactct ctgggcaaca ggtatttcct ctccatctcc ctcctcttct 3120

tcctctctca tcgccgcaaa gcttccaagg aatgggtcat acaacccaaa cccaagcccg 3180

ggcgcaagcc taagaaagac ttgtcggccg ccgtcaagga cgaggaagag gcatgtgttg 3240

cctaccttcc cctttccagc gcatgctaat ctattgtcta gagtgactcc aagggccgtc 3300

gggtccagaa taggtgggtt atcgcaatca gatagtcgaa tgtcacccat ctcatcagtt 3360

tcggcagagc tgctcagcgc gctttccgcg agcgcaagca atctcaacta gccgagctac 3420

aatcacgtat acaacaatac gaacaaggag agatcgaacg caatgtcgcg cttcagaaca 3480

tcgcaaaacg cttgaaggaa gagaatgaag ctctgcgaag ggaaaattct ctgctcaaag 3540

agagaataac aaagcaagag caagagcagc gggcagccaa cgaaaagaag cgttggagag 3600

acaattcccc cggtagtgtc cattcaccta aagctcctgc acgcaagaaa ccgcgcttca 3660

gtcccgaaac acacgacaag cctttgtcaa cttatttgcc ttccccccct tcgatgctcg 3720

attcccccaa ctcttcaaat tcatcggaca gcggattttc acccatgtac gaagtgcaat 3780

cttccgaagc gacgcaccct atcatcgcca acatcgatct aaacaataca aatagatcaa 3840

tatctctcga gtcctttgat tactctcctt ctttcaattg tggattctgt agcgacgata 3900

caccttgtgt ctgcagagag cttgctgcgc aacaggtttc tgagcgctcg aatctcagca 3960

atttcaagtc ggaggaattt acgggtgttg ttcatctaga gccggctcca caaccccaat 4020

cgagccggtc ttccatccta gataatctgc ccgcttatcg gccccctgtg cccctccgcc 4080

gccgtgaaac cccttgtacg gttaactcga tttttccagt tcaggtcttg ccagaaactc 4140
gacccccctac catctcttct cagccaacat gttcgggaga cccatcgaac tgtctcgctt 4200
gcgcagatga tgcctttggt aaggccttct gttctgcaat taaagagacg attgctgctc 4260
gcccttcctg tgttgattat cccggaggtg ttccatcatc ttctcacaat ccttgtaaca 4320
gccgaggcgg ttgtgaacat tgtatatcag atccgacggc gaacctcaat ggctatgatt 4380
cttcagaatc aattcctacg aacgcggcgt ggcagcaaat caaggctcac cccaacgtct 4440
catttgccga cctctcttta cttgctaatg tggtggccag ccgctcgaga tgtactggtc 4500

cccggatccc actttctcca agtccagaat caaagtttac tcctccgaca ccacccttg 4560
ccccgcccgc cgacaatgag actattgtac tcacagaccc tcatgcgcaa tataaagaga 4620
aagagaaagc tcagcgtgag ggggcctcac ctccacctcg ggacgtttta gctcgctgtg 4680
ggagaatccg cgaagtttca acgtctgcgg tgcacgacgc cctacgacta cttgatgtca 4740
agttcccata gctggcatca gaacgatttg taaattgcat aactagtatt ttgtatatga 4800
tcaatcctca atgtagtata tattacacca ttacattata acgactgacg ttccccaaat 4860
4860

<210> 5
<211> 1258
<212> PRT
<213> Agaricus bisporus
<400> 5

Met Ser Ala Ala Leu Leu Gln Asp Pro Glu Asp Ile Asp Tyr Ser Asp
1 5 10 15
Ile Glu Asn Lys Tyr Lys Ile Gln Tyr Asp Glu Ser Phe Asp Asn Val
20 25 30
Leu Leu Val Asp Gly Val Pro Ile Ile Gly Lys Asp Lys Leu Glu Lys
35 40 45
Leu Leu Ala Lys Ile Cys Lys Glu Phe Ser Arg Lys Gly Val Thr Ile
50 55 60
Lys Pro Asp Asp Ile His Val Pro Trp Asp Asp Ser Thr Gly Lys Ser
65 70 75 80
Lys Gly Phe Ile Phe Val Glu Leu Arg Ser Val Asp Glu Ala Asn Leu

85 90 95

Ala Leu Val Ser Leu His Asn His Pro Phe Asp Ala Arg His Ile Phe

100 105 110

Lys Leu Asn Arg Phe Thr Asp Ile Glu Lys Phe Ala Glu Leu Asp Glu

115 120 125

Val Tyr Val Glu Pro Glu Glu Glu Glu Phe Ala Pro Lys Glu His Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Arg Gly Glu Glu Val Leu Ile His Trp His Gly Lys Pro Ser Gln Tyr

165 170 175

Glu Ile Ala Tyr Lys Pro Glu Trp Lys Asp Phe Leu Tyr Val Ala Trp

180 185 190

Ser Pro Leu Gly Thr Tyr Val Ala Thr Leu His Arg Gln Gly Val Arg

195 200 205

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

210 215 220

Phe Val Lys Leu Ile Asp Phe Ser Pro Cys Glu Asn Tyr Ile Val Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Gln Tyr Phe Ser Pro Asp Asp Glu Gly Asn Asn Ile Ala Val Trp Asp

260 265 270

Ile Lys Ser Gly His Leu Leu Arg Thr Phe Ser Thr Tyr His Glu Gly

275 280 285

Glu Thr Pro Gly Gln Lys Lys Gln Met Gln Trp Pro Ile Leu Lys Trp

290 295 300

Ser Pro Asp Asp Lys Phe Ile Ala Arg Leu Thr Pro Ser Gln Met Ile

305 310 315 320

Ser Ile Tyr Glu Leu Pro Asp Met Gly Leu His Gly Lys Lys Ser Leu

325 330 335

Lys Ile Glu Gly Val Val Asp Phe Glu Trp Cys Pro Leu Gly Glu Arg

340 345 350

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

355 360 365

Lys Lys Ala Arg Glu Asn Met Leu Val Tyr Trp Thr Pro Glu Val Val

370 375 380

Asn Gln Pro Ala Arg Val Thr Leu Leu Ser Phe Pro Gly Arg Ser Ile

385 390 395 400

Leu Arg Gln Lys Asn Leu Phe Asn Val Thr Glu Cys Lys Leu Tyr Trp

405 410 415

Gln Asn Gln Gly Asp Phe Leu Cys Val Lys Val Asp Arg His Thr Lys

420 425 430

Thr Lys Lys Ser Ile Phe Cys Asn Leu Glu Ile Phe Arg Met Arg Glu

435 440 445

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

450 455 460

Phe Ser Trp Glu Pro Lys Gly Asp Arg Phe Ala Ile Val Ser Ser Ser

465 470 475 480

Asp Pro Asn Leu Gly Asn Pro Gly Pro Gly Ile Thr Val Lys Thr Asp

485 490 495

Val Gly Phe Tyr Gln Leu Asp His Ser Lys Asn Asp Phe Arg Leu Leu

500 505 510

Arg Thr Leu Ser Ser Arg Thr Ser Asn Ala Ile Arg Trp Ser Pro Arg

515 520 525

Gly Arg His Val Val Leu Ala Thr Val Gly Ser Ser Thr Lys Ser Glu

530 535 540

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

545 550 555 560

Glu Gly Gln Ala Ser Lys Asp Asp Trp Gly Ser Gly Ile Gln Leu Leu

565 570 575

Gly Ser Ala Asp His Tyr Gly Val Thr Asp Val Glu Trp Asp Pro Ser

580 585 590

Gly Arg Tyr Leu Ala Thr Ser Ala Ser Ala Trp Thr His Thr Leu Glu

595 600 605

Asn Gly Tyr Ala Val Trp Asp Phe Arg Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln

610 615 620

Ile Gln Asp Arg Phe Lys Gln Phe Ile Trp Arg Pro Arg Pro Pro Thr

625 630 635 640

Leu Leu Thr Lys Glu Gln Gln Arg Thr Ile Arg Arg Asn Leu Arg Glu

645 650 655

Tyr Ser Arg Val Phe Asp Glu Glu Asp Ala Ala Glu Glu Ser Asn Val

660 665 670

Ser Ala Glu Leu Val Ala Leu Arg Lys Arg Leu Val Asp Glu Trp Asn

675 680 685

Ala Trp Arg Thr Leu Arg Lys Arg Glu Leu Ala Asp Glu Arg Gly His

690 695 700

Lys Thr Asp Lys His Glu Val Ser Glu Ala Lys Glu Glu Ile Glu Val

705 710 715 720

Trp Val Asp Glu Val Ile Glu Gln Ile Glu Glu Gly Arg Pro Ser Leu

725 730 735

Pro Pro Leu Ser Pro Ser His Met Ser Thr Pro Ser Pro Ser Pro Thr

740 745 750

Thr Leu Trp Ala Thr Ala Ser Lys Glu Trp Val Ile Gln Pro Lys Pro

755 760 765

Lys Pro Gly Arg Lys Pro Lys Lys Asp Leu Ser Ala Ala Val Lys Asp

770 775 780

Glu Glu Glu Ser Asp Ser Lys Gly Arg Arg Val Gln Asn Arg Ala Ala

785 790 795 800

Gln Arg Ala Phe Arg Glu Arg Lys Gln Ser Gln Leu Ala Glu Leu Gln

805 810 815

Ser Arg Ile Gln Gln Tyr Glu Gln Gly Glu Ile Glu Arg Asn Val Ala

820 825 830

Leu Gln Asn Ile Ala Lys Arg Leu Lys Glu Glu Asn Glu Ala Leu Arg

835 840 845

Arg Glu Asn Ser Leu Leu Lys Glu Arg Ile Thr Lys Gln Glu Gln Glu

850 855 860

Gln Arg Ala Ala Asn Glu Lys Lys Arg Trp Arg Asp Asn Ser Pro Gly

865 870 875 880

Ser Val His Ser Pro Lys Ala Pro Ala Arg Lys Lys Pro Arg Phe Ser

885 890 895

Pro Glu Thr His Asp Lys Pro Leu Ser Thr Tyr Leu Pro Ser Pro Pro

900 905 910

Ser Met Leu Asp Ser Pro Asn Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Gly Phe

915 920 925

Ser Pro Met Tyr Glu Val Gln Ser Ser Glu Ala Thr His Pro Ile Ile

930 935 940

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

945 950 955 960

Phe Asp Tyr Ser Pro Ser Phe Asn Cys Gly Phe Cys Ser Asp Asp Thr

965 970 975

Pro Cys Val Cys Arg Glu Leu Ala Ala Gln Gln Val Ser Glu Arg Ser

980 985 990

Asn Leu Ser Asn Phe Lys Ser Glu Glu Phe Thr Gly Val Val His Leu

995 1000 1005

Glu Pro Ala Pro Gln Pro Gln Ser Ser Arg Ser Ser Ile Leu Asp Asn

1010 1015 1020

Leu Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Val Pro Leu Arg Arg Arg Glu Thr Pro

1025 1030 1035 1040

Cys Thr Val Asn Ser Ile Phe Pro Val Gln Val Leu Pro Glu Thr Arg

1045 1050 1055

Pro Pro Thr Ile Ser Ser Gln Pro Thr Cys Ser Gly Asp Pro Ser Asn

1060 1065 1070

Cys Leu Ala Cys Ala Asp Asp Ala Phe Gly Lys Ala Phe Cys Ser Ala

1075 1080 1085

Ile Lys Glu Thr Ile Ala Ala Arg Pro Ser Cys Val Asp Tyr Pro Gly
1090 1095 1100

Gly Val Pro Ser Ser Ser His Asn Pro Cys Asn Ser Arg Gly Gly Cys
1105 1110 1115 1120

Glu His Cys Ile Ser Asp Pro Thr Ala Asn Leu Asn Gly Tyr Asp Ser
1125 1130 1135

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Asn Ala Ala Trp Gln Gln Ile Lys Ala His
1140 1145 1150

Pro Asn Val Ser Phe Ala Asp Leu Ser Leu Leu Ala Asn Val Val Ala
1155 1160 1165

Ser Arg Ser Arg Cys Thr Gly Pro Arg Ile Pro Leu Ser Pro Ser Pro
1170 1175 1180

Glu Ser Lys Phe Thr Pro Pro Thr Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ala Asp
1185 1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

Glu Lys Ala Gln Arg Glu Gly Ala Ser Pro Pro Pro Arg Asp Val Leu
1220 1225 1230

Ala Arg Cys Gly Arg Ile Arg Glu Val Ser Thr Ser Ala Val His Asp
1235 1240 1245

Ala Leu Arg Leu Leu Asp Val Lys Phe Pro
1250 1255