

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0028169 (43) 공개일자 2011년03월17일
(51) Int. Cl. <i>C12P 21/00</i> (2006.01) <i>C12N 9/14</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0086136 (22) 출원일자 2009년09월11일 심사청구일자 2009년09월11일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 박천석 경기도 성남시 분당구 수내동 양지마을한양아파트 521동 503호 서동호 충청북도 청주시 흥덕구 개신동 650번지 (74) 대리인 특허법인태동	

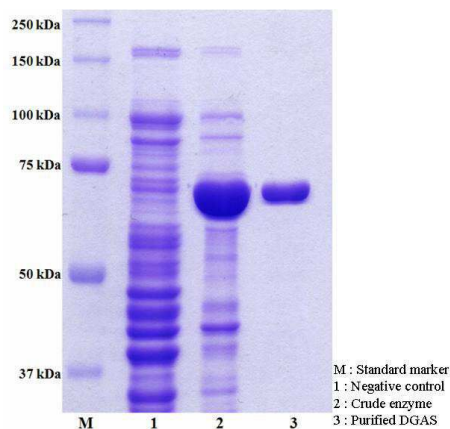
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 데이노코커스 제오써르말리스로부터 유래한 아밀로수크라아제를 이용한 알파 알부틴의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제를 이용한 알파 알부틴의 제조방법에 관한 것으로, 효소적 합성법에서 일반적으로 사용되는 기질보다 상대적으로 저렴한 기질인 설탕을 사용함으로써, 알부틴보다 멜라닌색소 합성 저해능이 높고, 세포 독성이 적은 특성이 있는 알파 알부틴을 경제적으로 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정종현

서울특별시 강서구 가양2동 가양아파트 402-504호

하석진

경기도 수원시 권선구 호매실동 목화빌라 11동 202호

특허청구의 범위

청구항 1

설탕 및 하이드로퀴논(hydroquinone)을 기질로 포함하는 반응액에 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제를 첨가하여 효소 반응시키는 것을 특징으로 하는 알파 알부틴의 제조방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 반응액에,

하이드로퀴논의 산화를 방지하기 위해 항산화제를 추가로 첨가하는 것을 특징으로 하는 알파 알부틴의 제조방법

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항산화제는,

비타민 C 인 것을 특징으로 하는 알파 알부틴의 제조방법

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제는,

정제를 위한 태그가 N-말단 또는 C-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 알파 알부틴의 제조방법

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 태그는,

히드-태그(His-tag)인 것을 특징으로 하는 알파 알부틴의 제조방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 효소를 이용한 알파-알부틴의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제를 이용한 알파 알부틴의 제조방법에 관한 것이다.

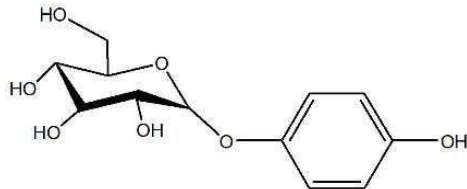
배경 기술

[0002] 알부틴은 하이드로퀴논(hydroquinone)에 글루코피라노사이드(glucopyranoside)가 베타로 결합된 유도체로서, 멜라닌색소 억제작용이 있어, 피부질환의 치료제 및 피부 미백 물질로 널리 사용되고 있다.

[0003] 한편, 알과 알부틴은 하기 화학식 1에서 보는 바와 같이, 당과 하이드로퀴논이 알과 글루코시딕(α -glycosidic) 결합으로 연결되어 있는 물질로 새로운 미백 원료로 각광을 받고 있다.

[0004] 알과 알부틴은 알부틴과 비교하여 IC_{50} 의 값이 10배 이상 낮은 수치를 보일 정도로 티로시나아제(tyrosinase)에 대한 활성 저해가 강하면서도 안전한 화학적 특성을 보이는데, 생체실험에서도 매우 우수한 티로시나아제 저해효과를 보여주고 있다.

화학식 1



[0005]

[0006] 알과 알부틴은 하이드로퀴논에 당을 전위시키는 효소적 당전이 반응을 통해 합성을 하고 있는데, 당 분자가 전위된 각종 당전이 생성물은 감미의 향상, 용해성 증가, 장내 유용세균 증식 효과, 화학안정성의 증가 등의 기능성이 부가되는 것으로 알려져 있다.

[0007] 하이드로퀴논의 당전이 반응은 일본 니시무라(Nishimura) 등이 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) X-23 유래 알파-아밀라아제를 이용하여 최초로 성공하였으며, 이 후 알파-글루코시다아제와 트랜스글루코시다아제를 이용하여 알과 알부틴을 합성할 수 있는 보고가 있다.

[0008] 그런데, 기질로 사용되는 말토펜타오스와 말토오스는 높은 비용이 요구되며, 당전이 산물 외에 여러 산물이 부수적으로 생성되는 등 비경제적인 문제점이 있다.

[0009] 한편, 아밀로수크라아제는 설탕을 기질로 사용하여 설탕을 포도당과 과당으로 가수분해하는 효소인데, 생성된 포도당을 이용하여 알과-1,4-결합의 비수용성 글루칸을 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0010] 그런데, 아밀로수크라아제에 관한 연구는 주로 비수용성 글루칸을 생성하는 쪽에 많이 치우쳐 있을 뿐, 이를 사용하여 알과 알부틴을 생산하는 연구는 아직까지 구체적으로 알려진바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 이에 본 발명은 하이드로퀴논과 상대적으로 저렴한 설탕을 기질로 하여 아밀로수크라아제를 첨가하여 효소 반응을 시킴으로써 알과 알부틴을 제조할 수 있는 방법을 개발하여 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 설탕 및 하이드로퀴논(hydroquinone)을 기질로 포함하는 반응액에 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제를 첨가하여 효소 반응시키는 것을 특징으로 하는 알과 알부틴의 제조방법을 제공한다.

[0013] 한편, 본 발명에서 사용하는 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제는 네이세리아 폴리사카레아(*Neisseria polysaccharea*) 유래 아밀로수크라아제의 반응 최적 pH가 6.0인 것에 반해 최적 pH가 7.0인데, 기질로 사용되는 하이드로퀴논은 pH 7.0에서 산화될 수 있으므로, 산화를 방지하기 위하여 바람직하게 상기 반응액에 항산화제를 추가로 첨가하는 것이 좋다. 이때, 항산화제는 특정의 것으로 반드시 한정하지 되지 않으나, 일 예로 비타민 C를 사용할 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명의 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 아밀로수크라아제는 바람직하게 정제를 위한 태그가 N-말단 또는 C-말단에 결합되어 있는 것을 사용할 수 있다.

[0015] 통상적으로 효소는 이를 코딩하는 유전자가 도입되어 형질전환된 형질전환체로부터 얻어지는데, 해당 효소를 회수하기 위해서는 정제과정을 반드시 거쳐야 한다. 정제 과정에서는 해당 효소의 순도를 높이는 것이 대단히 중요한데, 해당 유전자의 5' 또는 3'에 정제를 위한 태그를 붙이는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 정제용 태그로는 호스트로 사용되는 균주에 포함되어 있는 호스트 단백질들의 pH 특성 등을 고려하여 다양한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 호스트로 대장균을 사용할 경우, 대장균 내 주된 단백질의 pH를 고려할 때, 양이온성 아미노산 태그인 히스-태그(His-tag)를 사용하는 것이 효율적일 수 있다.

[0016] 한편, 태그를 붙임으로써 해당 효소의 활성이 변하는 경우가 종종 발생하는데, 본 발명에서 확인한 바에 의하면, 본 발명의 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제는 히스-태그(His-tag)를 붙여도 활성에는 큰 변화가 없어 사용에 문제가 없는 것으로 확인되었다.

효 과

[0017] 본 발명의 알파 알부틴 제조방법은 효소적 합성법에서 사용되는 종래의 기질보다 상대적으로 저렴한 설당을 기질로 사용함으로써, 알부틴보다 멜라닌색소 합성 저해능이 높고, 세포 독성이 적은 알파 알부틴을 경제적으로 제조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0019] 한편, 본 발명에서 구체적으로 기재하지 않은 사항은 통상의 유전공학 기술 및 발효 기술을 통해 충분히 달성 가능하므로 그에 대한 구체적인 기술은 생략하기로 한다.

[0020] **제조예1: 히스-태그(His-tag)가 결합한 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 재조합 아밀로수크라아제(amylosucrase)의 제조**

[0021] (1) 아밀로수크라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터의 제조

[0022] 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 1)는 데이노코커스 제오씨르말리스(*Deinococcus geothermalis*)의 염색체 유전자로부터 분리하여 사용하였고, 그 방법은 하기와 같았다.

[0023] 아밀로수크라아제 유전자의 클로닝을 위해 데이노코커스 제오씨르말리스 (*Deinococcus geothermalis*) DSM 11300의 염색체 DNA를 주형 DNA로 사용하고, 표 1과 같은 서열로 정방향 프라이머 pHCDGAS1 및 역방향 프라이머 pHCDGAS2를 설계한 후, 표 2에 기재된 방법으로 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다.

표 1

명칭	유전자서열	비고
pHCDGAS1	5'-CATATGCTGAAAGACGTGCTCACT-3'	정방향 프라이머
pHCDGAS2	5'-CTCGAGTGCTGGAGCCTCCCGGCGGT-3'	역방향 프라이머

표 2

변성 (denaturation)	사전 변성(pre-denaturation)	95/ 5 min	
증폭 (amplification)	변성(denaturation)	95/ 1 min	30 회
	결합(annealing)	60/ 1 min	
	확장(extension)	72/ 2 min	

최종 확장 (final extension)	최종 확장(final extension)	72/ 5 min	
----------------------------	------------------------	-----------	--

[0026] 상기 PCR을 수행한 결과, 벡터 전체를 포함하는 약 1.9 kb의 PCR 산물을 수득하였다. 상기 수득한 PCR 산물을 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*로 처리된 pGEM-T Easy 벡터와 함께 접합(ligation)하여 pGEM-T-DGAS를 제조하였다.

[0027] 이 후, 상기 pGEM-T-DGAS를 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*로 처리하고, 약 1.9 kbp 길이의 조각을 아가로스 전기영동을 통해 분리하여, 동일한 제한 효소로 처리한 pHCEXHD 발현벡터(His tag 포함 벡터)와 함께 라이게이션함으로써 pHCDGAS를 제조하였다.

[0029] (2) 형질전환체의 제조

[0030] 아밀로수크라아제를 대량 생산하기 위하여, 상기 재조합 벡터 pHCDGAS로 형질전환된 형질전환체를 제조하였다.

[0031] 형질전환용 균주(competent cell)화된 이 콜라이(*E. coli*) MC1061 균주 50 μ l를 약 30분 정도 얼음에서 녹인 후, 형질전환하고자 하는 재조합 벡터 pHCDGAS가 첨가된 라이게이션 액 1 μ l를 첨가하여 잘 섞은 다음, 전기충격 큐벳(cuvette)으로 옮긴 후, 전기충격기(Hybaid Cellject Uno, Hybaid Ltd, UK)로 전기적충격을 주어 형질전환을 수행하였다.

[0032] 상기 형질전환을 수행한 반응액에 950 μ l의 LB 액체배지를 첨가하고 37°C에서, 약 40분간 항온배양기에 서 배양하였다. 배양 후, 앰피실린(100 μ g/ml)이 포함된 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.

[0033] 1차 선별된 균주를 앰피실린이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37°C에서 12시간 배양하고, 원심 분리하여 균체를 수득하였다.

[0034] 이 후, 회수된 균체로부터 플라스미드 분리 키트를 통해 플라스미드를 분리하고 *NdeI*과 *XhoI* 제한 효소로 절단하여, 약 1.9 kb의 아밀로수크라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함되어 있음을 확인한 1종의 균주를 선별하였다.

[0035] (3) His-tag(히스-태그)가 결합된 재조합 아밀로수크라아제의 정제

[0036] 상기에서 선별한 형질전환주를 37°C에서 15시간 배양하였다. 배양한 후, 4°C 및 4,000 rpm의 조건으로 30분 동안 원심분리를 수행하여 균체를 회수하고, 라이시스 버퍼(Lysis buffer) [50mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 7.0]에 현탁한 후, 초음파 분쇄하였다.

[0037] 상기 초음파를 이용하여 분쇄한 분쇄액을 4°C 및 12,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리를 수행한 후, 상등액을 수득하였다. 상기 상등액을 Ni-NTA 친화 크로마토그래피에 주입하여, 재조합 아밀로수크라아제를 정제하였다.

[0038] 도 1에 나타난 바와 같이, 정제된 재조합 아밀로수크라아제의 분자량이 이론값과 일치하는 약 75kDa의 분자량을 나타내는 것으로 확인되어, 재조합 아밀로수크라아제 효소가 이 콜라이(*E. coli*) MC1061에서 성공적으로 발현됨을 확인할 수 있었으며, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피 과정을 통하여 효율적으로 정제된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0040] 실시예 1: 알파 알부틴의 제조 및 정제

[0041] 알파 알부틴의 제조를 위해 사용된 하이드로퀴논과 설탕은 시그마(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 하이드로퀴논은 25 g/L, 설탕 50 g/L를 Tris-Cl 완충용액(pH 7.0)에 혼합한 후, 상기 제조예 1로부터 정제된 재조합 아밀로수크라아제 효소 10 U/ml을 첨가하고 35°C에서 15시간 동안

반응시켰다. 반응 후 5분 동안 용액을 끓이고, 왓트만 여지를 이용하여 여과하였다.

[0042] 이후, 하기 실험예에서 반응생성물을 분석하였다.

[0043] 실시예 2; 알파 알부틴의 제조 및 정제

[0044] 알파 알부틴의 제조를 위해 사용된 하이드로퀴논과 설탕은 시그마(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 하이드로퀴논 25 g/L, 설탕 50 g/L를 Tris-Cl 완충용액(pH 7.0)에 혼합한 후, 상기 제조예 1로부터 정제된 재조합 아밀로수크라아제 효소 10 U/ml을 첨가하고 35℃에서 15시간 동안 반응시켰다.

[0045] 한편, 기질인 하이드로퀴논의 산화를 방지하기 위해서 4 g/L의 아스코빈 산(비타민 C)을 첨가해 주고, 반응 후 5분 동안 용액을 끓이고, 왓트만 여지를 이용하여 여과하였다.

[0046] 이후, 하기 실험예에서 반응생성물을 분석하였다.

[0047] 실험예 1; 박막크로마토그래피를 이용한 반응생성물의 분석

[0048] 실시예 1 및 실시예 2의 반응에서 얻어진 반응생성물을 분석하기 위해서 박막크로마토그래피를 수행하였다.

[0049] 실시예 1 및 실시예 2의 반응생성물을 Merck 60 F₂₅₄ TLC 플레이트(20 cm × 20 cm)에 1 μl씩 로딩하여 에틸아세테이트:아세트산:증류수=3:1:1 전개액에서 전개시켰다. 전개 후에 플레이트를 잘 건조시켜 메탄올에 0.3 %(w/v) *N*-(1-나프틸)-에틸렌디아민과 5 %(v/v) 황산을 용해시킨 발색액에 담갔다가 꺼낸 후 110℃ 오븐에서 10분 동안 발색시켰다.

[0050] 도 2에서 보듯이, 아스코빈 산(비타민 C)가 첨가되지 않은 실시예 1의 반응물과 아스코빈 산(비타민 C)가 첨가된 실시예 2의 반응물에서 공히 하이드로퀴논에 당이 전이되어 알파 알부틴이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 다만, 아스코빈 산(비타민 C)을 반응액에 첨가시켜 반응을 시킨 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 알파 알부틴의 양이 많이 생성되는 것으로 확인되었다.

[0051] 실험예 2; 고성능액체크로마토그래피를 이용한 반응생성물의 분석

[0052] 실시예 2에서 얻은 반응생성물을 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석하였다. 시료를 실시예 2에서 얻은 반응생성물을 0.45 μm 박막여과지로 여과하여 25 μl를 주입하였고, 유속은 1.0 ml/분으로 하여 분석하였다. HPLC 분석은 시마즈(일본)의 LC-AD 그래디언트 펌프와 SPD-10A 검출기 및 LC-NH2 컬럼(SUPELCOSIL™)을 이용하여 시행하였으며, 용매는 A 용액(아세트나이트릴), B 용액(물)을 9:1로 혼합하여 사용하였다.

[0053] 결과는 도 3과 같았는데, 알파 알부틴이 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[0054] 실험예 3; 'Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy'를 이용한 알파 알부틴의 분자량 측정

[0055] 실시예 2에서 얻은 반응생성물의 분자량을 확인하기 위해서 FABMS(Fast atom bombardment mass spectroscopy: JEOL JMS 700, Japan)을 사용하였다. 분석결과, 실시예 2에서 얻은 반응생성물은 271.1 [M-H]⁻에 나타나는 이온 피크로부터 시료의 분자량이 272.1으로 측정되었다.

[0056] 이로부터 반응 생성물이 알파 알부틴의 분자량과 일치함을 알 수가 있다.

[0057] 실험예 4; ¹H 및 ¹³C NMR을 이용한 알파 알부틴의 구조분석

[0058] 실시예 2에서 얻은 반응생성물의 구조를 확인하기 위하여 ¹H 및 ¹³C 핵자기공명분석(NMR; Varian, US

A)을 알부틴과 비교하여 수행하였다. 시료는 실시예 2에서 순수 정제한 반응생성물을 중수(D₂O)에 용해시켜 사용하였다.

[0059] 결과는 표 3과 같았다. COSY, HMQC 및 HMBC 실험결과로부터 반응생성물은 알과 알부틴임을 알 수 있었다. 하기 표 3은 본 발명에 따른 알부틴과 알과 알부틴에 대한 ¹H 및 ¹³C NMR 을 이용한 구조분석결과를 나타낸 것이다.

표 3

		¹³ C NMR		¹ H NMR	
		Arbutin	α-arbutin	Arbutin	α-arbutin
<i>p</i> -hydroxyphenol	1	152.2	150.0		
	2	116.5	115.7	6.69 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.65(d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
	3	119.2	118.7	6.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.88(d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
	4	153.5	153.7	6.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.88(d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
	5	119.2	118.7	6.69 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.65 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)
	6	116.5	115.6		
<i>β</i> Or <i>α</i> -D-glucopyranose	1'	103.4	99.4	4.74 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz)	5.11 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz)
	2'	74.8	73.2		
	3'	77.8	73.7		
	4'	71.2	70.2		
	5'	77.8	71.9		
	6'	62.4	60.9		

도면의 간단한 설명

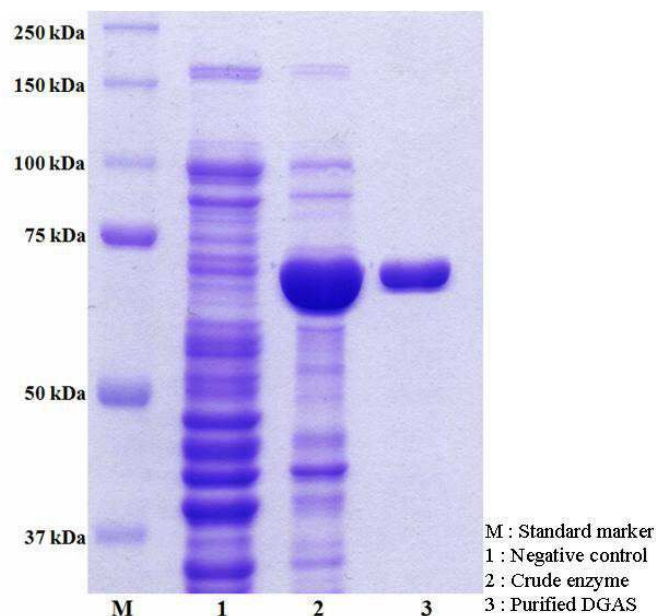
도 1은 정제된 재조합 아밀로수크라아제를 보여주는 전기영동 사진이다.

도 2는 박막크로마토그래피를 이용한 본 발명의 반응생성물 분석결과를 보여준다.

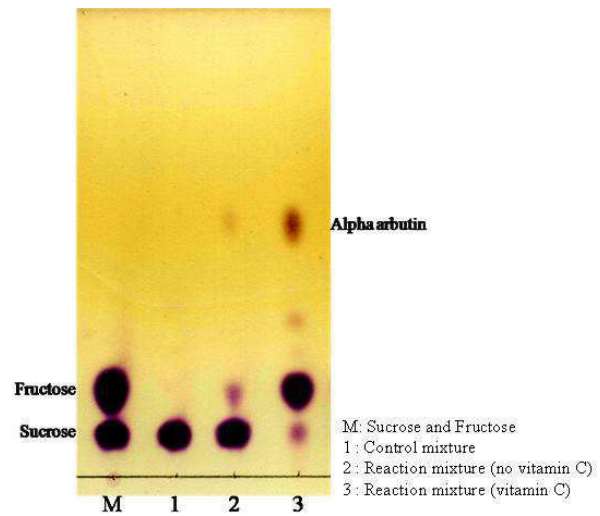
도 3은 HPLC를 이용한 본 발명의 반응생성물 분석결과를 보여준다.

도면

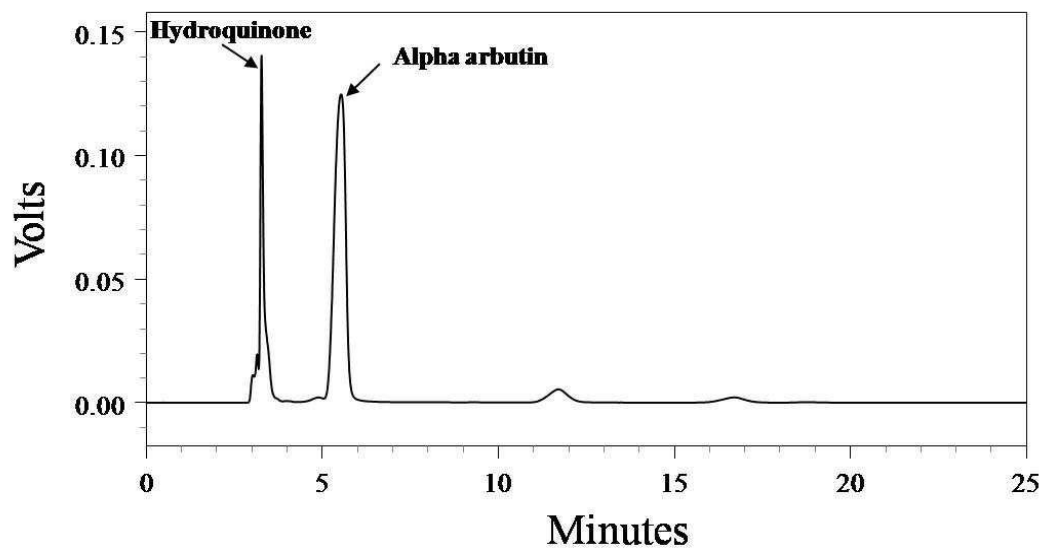
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for production of alpha-arbutin using amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1950

<212> DNA

<213> *Deinococcus geothermalis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1950)

<400> 1

atg ctg aaa gac gtg ctc act tct gaa ctg gcg gcg cag gta cga gac 48
Met Leu Lys Asp Val Leu Thr Ser Glu Leu Ala Ala Gln Val Arg Asp
1 5 10 15

gcc ttc gat gat gac cgt gac gcc gag acg ttc ctg ctg cgg ctg gaa 96
Ala Phe Asp Asp Asp Arg Asp Ala Glu Thr Phe Leu Leu Arg Leu Glu
20 25 30

cgc tac ggc gag gac ctc tgg gag agc ctg cgc gcg gtg tat ggc gac 144
Arg Tyr Gly Glu Asp Leu Trp Glu Ser Leu Arg Ala Val Tyr Gly Asp
35 40 45

cag gtg agg gcc ttg cca ggg cga ctg ctg gaa gtc atg ctc cac gcc 192
Gln Val Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Leu Glu Val Met Leu His Ala
50 55 60

tat cac gcc cgc ccc gcg gag ctg cgg cgt ttg gac gag gcc cgg ctg 240
Tyr His Ala Arg Pro Ala Glu Leu Arg Arg Leu Asp Glu Ala Arg Leu
65 70 75 80

ctg cgg ccc gac tgg ctg caa cgt ccc gag atg gtg ggc tac gtc gcc 288
Leu Arg Pro Asp Trp Leu Gln Arg Pro Glu Met Val Gly Tyr Val Ala
85 90 95

tac acc gac cgt ttt gcc gga acg ctg aag ggg gta gag gag cgc ttg 336
Tyr Thr Asp Arg Phe Ala Gly Thr Leu Lys Gly Val Glu Glu Arg Leu
100 105 110

gac tac ctg gag ggc ctg ggt gtg aag tac ctg cac ctg atg ccc ctt 384
Asp Tyr Leu Glu Gly Leu Gly Val Lys Tyr Leu His Leu Met Pro Leu
115 120 125

ctc agg ccg cgc gag ggc gaa aat gac ggt ggc tac gcg gtg cag gat Leu Arg Pro Arg Glu Gly Glu Asn Asp Gly Gly Tyr Ala Val Gln Asp 130 135 140	432
tac cga gcg gtg cgt ccc gac ctg ggc acg atg gat gac ctc tcg gcc Tyr Arg Ala Val Arg Pro Asp Leu Gly Thr Met Asp Asp Leu Ser Ala 145 150 155 160	480
ctc gcg cgg gcg ctg cgg ggc cgc ggc atc agc ctg gtg ctg gat ctc Leu Ala Arg Ala Leu Arg Gly Arg Gly Ile Ser Leu Val Leu Asp Leu 165 170 175	528
gtg ctg aac cac gtg gcg cgc gaa cat gcg tgg gcc cag aag gcg cgg Val Leu Asn His Val Ala Arg Glu His Ala Trp Ala Gln Lys Ala Arg 180 185 190	576
gcg ggt gat ccc aag tac cgg gcc tac ttt cat ctc ttc ccc gac cgc Ala Gly Asp Pro Lys Tyr Arg Ala Tyr Phe His Leu Phe Pro Asp Arg 195 200 205	624
agg ggg ccg gac gct ttt gaa gcc acc ctt cct gag atc ttt ccc gac Arg Gly Pro Asp Ala Phe Glu Ala Thr Leu Pro Glu Ile Phe Pro Asp 210 215 220	672
ttc gcg ccg ggc aac ttc tcg tgg gac gag gag atc ggt gaa ggc gag Phe Ala Pro Gly Asn Phe Ser Trp Asp Glu Glu Ile Gly Glu Gly Glu 225 230 235 240	720
ggg ggc tgg gtc tgg acc acc ttc aac agc tac cag tgg gac ctg aac Gly Gly Trp Val Trp Thr Thr Phe Asn Ser Tyr Gln Trp Asp Leu Asn 245 250 255	768
tgg gcc aac ccc gac gtg ttt ctg gag ttt gtg gac atc atc ctc tac Trp Ala Asn Pro Asp Val Phe Leu Glu Phe Val Asp Ile Ile Leu Tyr 260 265 270	816
ctc gcc aac cgg ggc gtg gag gtg ttc cgg ctg gat gcg atc gcc ttc Leu Ala Asn Arg Gly Val Glu Val Phe Arg Leu Asp Ala Ile Ala Phe 275 280 285	864
atc tgg aag cgg ctg gga acc gac tgc caa aac cag ccg gaa gtt cac Ile Trp Lys Arg Leu Gly Thr Asp Cys Gln Asn Gln Pro Glu Val His 290 295 300	912

cac ctc acg cgg gcg ctg cgg gca gcc gcg cgc atc gtc gcg ccc gca His Leu Thr Arg Ala Leu Arg Ala Ala Arg Ile Val Ala Pro Ala 305 310 315 320	960
gtc gcc ttt aag gcc gag gcg atc gtg gcg ccc gcc gac ctg atc cac Val Ala Phe Lys Ala Glu Ala Ile Val Ala Pro Ala Asp Leu Ile His 325 330 335	1008
tac ctg ggc acc cgt gcg cac cac ggc aag gtg agc gac atg gcc tac Tyr Leu Gly Thr Arg Ala His His Gly Lys Val Ser Asp Met Ala Tyr 340 345 350	1056
cac aac agc ctg atg gtg cag ctg tgg agt agc ctc gcc agc cgg aat His Asn Ser Leu Met Val Gln Leu Trp Ser Ser Leu Ala Ser Arg Asn 355 360 365	1104
acc cgt ctc ttt gag gag gca ctg cgg gcg ttt ccc ccc aag ccc acg Thr Arg Leu Phe Glu Glu Ala Leu Arg Ala Phe Pro Pro Lys Pro Thr 370 375 380	1152
agc acg acc tgg ggg ctg tac gtc cgc tgt cac gac gac atc ggc tgg Ser Thr Thr Trp Gly Leu Tyr Val Arg Cys His Asp Asp Ile Gly Trp 385 390 395 400	1200
gcc atc agc gac gag gac gcg gcc cgg gcc gga ttg aac ggc gcg gcg Ala Ile Ser Asp Glu Asp Ala Ala Arg Ala Gly Leu Asn Gly Ala Ala 405 410 415	1248
cac cgg cac ttt ctc tcg gac ttc tac agc ggt cag ttt ccc ggc tcc His Arg His Phe Leu Ser Asp Phe Tyr Ser Gly Gln Phe Pro Gly Ser 420 425 430	1296
ttt gcg cgg ggg ctg gtg ttt cag tac aac ccg gtg aac ggc gac cgg Phe Ala Arg Gly Leu Val Phe Gln Tyr Asn Pro Val Asn Gly Asp Arg 435 440 445	1344
cgc atc agt ggc tcg gcg gcc agc ctc gct ggg ctg gag gca gcg ctg Arg Ile Ser Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Ala Ala Leu 450 455 460	1392
gaa acc ggg gac ccg ggc cgc atc gag gac gcg gtg cgt cgc ctg ctg Glu Thr Gly Asp Pro Gly Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Arg Leu Leu 465 470 475 480	1440

ctc ctc cac acg gtc att ctc ggc ttc ggc ggg gtg ccg ctg ctg tac Leu Leu His Thr Val Ile Leu Gly Phe Gly Gly Val Pro Leu Leu Tyr 485 490 495	1488
atg ggc gac gaa ctc gcc ctg ctg aat gac tac gcc ttc gag gac gtg Met Gly Asp Glu Leu Ala Leu Leu Asn Asp Tyr Ala Phe Glu Asp Val 500 505 510	1536
ccc gaa cac gcg ccg gac aac cgc tgg gtg cat cgc ccg cag atg gat Pro Glu His Ala Pro Asp Asn Arg Trp Val His Arg Pro Gln Met Asp 515 520 525	1584
tgg gcc ctc gcg gag cgg gtg cgg cag gag cct tcc tcg ccc gcc gga Trp Ala Leu Ala Glu Arg Val Arg Gln Glu Pro Ser Ser Pro Ala Gly 530 535 540	1632
cgg gtg aac acg ggc ctg cgc cac ctc ctg cgg gtg cgc cgc gat acc Arg Val Asn Thr Gly Leu Arg His Leu Leu Arg Val Arg Arg Asp Thr 545 550 555 560	1680
ccg cag ctg cac gcc agc atc gag agc cag gtg ctg ccc agc ccc gat Pro Gln Leu His Ala Ser Ile Glu Ser Gln Val Leu Pro Ser Pro Asp 565 570 575	1728
tcg cgt gcg ctt ctg ctg cgc cgc gac cat ccc ctc ggc ggg atg gtg Ser Arg Ala Leu Leu Leu Arg Arg Asp His Pro Leu Gly Gly Met Val 580 585 590	1776
cag gtg tac aac ttc agc gag gag acg gtg atg ctg ccc agc cat gtt Gln Val Tyr Asn Phe Ser Glu Glu Thr Val Met Leu Pro Ser His Val 595 600 605	1824
ctg cgg gac gtg ctg ggg gac cac gtc cag gac cgg ctg agc ggg agt Leu Arg Asp Val Leu Gly Asp His Val Gln Asp Arg Leu Ser Gly Ser 610 615 620	1872
gcc ttt cgc cta gat cgg ccc acc gtt cgc ctg gag ggc tac cgg gca Ala Phe Arg Leu Asp Arg Pro Thr Val Arg Leu Glu Gly Tyr Arg Ala 625 630 635 640	1920
ctg tgg ctg acc gcc ggg gag gct cca gca Leu Trp Leu Thr Ala Gly Glu Ala Pro Ala 645 650	1950

<210> 2
 <211> 650
 <212> PRT
 <213> *Deinococcus geothermalis*

<400> 2
 Met Leu Lys Asp Val Leu Thr Ser Glu Leu Ala Ala Gln Val Arg Asp
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Asp Asp Arg Asp Ala Glu Thr Phe Leu Leu Arg Leu Glu
 20 25 30

Arg Tyr Gly Glu Asp Leu Trp Glu Ser Leu Arg Ala Val Tyr Gly Asp
 35 40 45

Gln Val Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Leu Glu Val Met Leu His Ala
 50 55 60

Tyr His Ala Arg Pro Ala Glu Leu Arg Arg Leu Asp Glu Ala Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Arg Pro Asp Trp Leu Gln Arg Pro Glu Met Val Gly Tyr Val Ala
 85 90 95

Tyr Thr Asp Arg Phe Ala Gly Thr Leu Lys Gly Val Glu Glu Arg Leu
 100 105 110

Asp Tyr Leu Glu Gly Leu Gly Val Lys Tyr Leu His Leu Met Pro Leu
 115 120 125

Leu Arg Pro Arg Glu Gly Glu Asn Asp Gly Gly Tyr Ala Val Gln Asp
 130 135 140

Tyr Arg Ala Val Arg Pro Asp Leu Gly Thr Met Asp Asp Leu Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Arg Ala Leu Arg Gly Arg Gly Ile Ser Leu Val Leu Asp Leu
 165 170 175

Val Leu Asn His Val Ala Arg Glu His Ala Trp Ala Gln Lys Ala Arg
 180 185 190

Ala Gly Asp Pro Lys Tyr Arg Ala Tyr Phe His Leu Phe Pro Asp Arg
195 200 205

Arg Gly Pro Asp Ala Phe Glu Ala Thr Leu Pro Glu Ile Phe Pro Asp
210 215 220

Phe Ala Pro Gly Asn Phe Ser Trp Asp Glu Glu Ile Gly Glu Gly Glu
225 230 235 240

Gly Gly Trp Val Trp Thr Thr Phe Asn Ser Tyr Gln Trp Asp Leu Asn
245 250 255

Trp Ala Asn Pro Asp Val Phe Leu Glu Phe Val Asp Ile Ile Leu Tyr
260 265 270

Leu Ala Asn Arg Gly Val Glu Val Phe Arg Leu Asp Ala Ile Ala Phe
275 280 285

Ile Trp Lys Arg Leu Gly Thr Asp Cys Gln Asn Gln Pro Glu Val His
290 295 300

His Leu Thr Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Arg Ile Val Ala Pro Ala
305 310 315 320

Val Ala Phe Lys Ala Glu Ala Ile Val Ala Pro Ala Asp Leu Ile His
325 330 335

Tyr Leu Gly Thr Arg Ala His His Gly Lys Val Ser Asp Met Ala Tyr
340 345 350

His Asn Ser Leu Met Val Gln Leu Trp Ser Ser Leu Ala Ser Arg Asn
355 360 365

Thr Arg Leu Phe Glu Glu Ala Leu Arg Ala Phe Pro Pro Lys Pro Thr
370 375 380

Ser Thr Thr Trp Gly Leu Tyr Val Arg Cys His Asp Asp Ile Gly Trp
385 390 395 400

Ala Ile Ser Asp Glu Asp Ala Ala Arg Ala Gly Leu Asn Gly Ala Ala
405 410 415

His Arg His Phe Leu Ser Asp Phe Tyr Ser Gly Gln Phe Pro Gly Ser
420 425 430

Phe Ala Arg Gly Leu Val Phe Gln Tyr Asn Pro Val Asn Gly Asp Arg
435 440 445

Arg Ile Ser Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Ala Ala Leu
450 455 460

Glu Thr Gly Asp Pro Gly Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Arg Leu Leu
465 470 475 480

Leu Leu His Thr Val Ile Leu Gly Phe Gly Gly Val Pro Leu Leu Tyr
485 490 495

Met Gly Asp Glu Leu Ala Leu Leu Asn Asp Tyr Ala Phe Glu Asp Val
500 505 510

Pro Glu His Ala Pro Asp Asn Arg Trp Val His Arg Pro Gln Met Asp
515 520 525

Trp Ala Leu Ala Glu Arg Val Arg Gln Glu Pro Ser Ser Pro Ala Gly
530 535 540

Arg Val Asn Thr Gly Leu Arg His Leu Leu Arg Val Arg Arg Asp Thr
545 550 555 560

Pro Gln Leu His Ala Ser Ile Glu Ser Gln Val Leu Pro Ser Pro Asp
565 570 575

Ser Arg Ala Leu Leu Leu Arg Arg Asp His Pro Leu Gly Gly Met Val
580 585 590

Gln Val Tyr Asn Phe Ser Glu Glu Thr Val Met Leu Pro Ser His Val
595 600 605

Leu Arg Asp Val Leu Gly Asp His Val Gln Asp Arg Leu Ser Gly Ser
610 615 620

Ala Phe Arg Leu Asp Arg Pro Thr Val Arg Leu Glu Gly Tyr Arg Ala
625 630 635 640

Leu Trp Leu Thr Ala Gly Glu Ala Pro Ala
645 650