(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 9/10

(11) 공개번호 특2002-0038816
(43) 공개일자 2002년05월23일

(21) 출원번호 10-2002-7004627
(22) 출원일자 2002년04월11일
번역문 제출일자 2002년04월11일
(86) 국제출원번호 PCT/DK2000/00560
(86) 국제출원출원일자 2000년10월16일
(87) 국제공개번호 WO 2001/29195
(87) 국제공개일자 2001년04월26일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바부다, 코스타리카, 도미니카연방, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 그레나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 유고슬라비아, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장 PA199901501 1999년10월20일 덴마크(DK)
PA199901641 1999년11월15일 덴마크(DK)

(71) 출원인 노보자임스 에이/에스
피아 스타르
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 크록쇼이베이 36

(72) 발명자 후쿠야마시로
일본211-0012지바켄지바시미도리쿠아리요시쵸166-2

(74) 대리인 정진상
박종혁

심사청구 : 없음

(54) 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드 및그것을 코드하는 핵산

요약

본 발명은 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 분리된 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성물, 벡터, 및 숙주 세포, 그리고 폴리펩티드의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

색인어

글루카노트랜스페라제, 고리 글루칸, 식품, 세제

명세서

기술분야

본 발명은 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 분리된 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성물, 벡터, 및 숙주 세포, 그리고 폴리펩티드의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

4-α-글루카노트랜스페라제(EC. 2.4.1.25)는 α-글루칸 사슬을 α-글루칸 분자에서 다른 분자(또는 글루코스)로 전달하는 반응을 촉매한다. 글루카노트랜스페라제는 미생물(예를 들어,E. coli) 및 감자괴경, 발아보리씨, 고구마 및 시금치와 같은 식물 조직에 광범위하게 분포한다.

최근, 글루카노트랜스페라제가 α-글루칸의 분자내 반응을 촉매할 수 있다는 것이 판명되었다. 예를 들어, 글루카노트랜스페라제가 아밀로스의 분자내 글리코실전달 반응(고리화 반응)을 촉매하여, 중합도(이후, "DP")가 17 이상인 시클로아밀로스를 합성할 수 있다는 것이 보고되었다.

글루카노트랜스페라제는 다양한 산업적 목적에 사용될 수 있다. 예를 들어, 글루카노트랜스페라제는 고리 글루칸의 생성을 위해 α-글루칸을 가공하는데 이용될 수 있다. 산업적 목적을 위해 효소를 사용하는 경우, 반응은 가능한 높은 온도 (약 60℃ 이상)에서 수행되는 것이 바람직하며, 이것은 이로써 α-글루칸, 즉 기질의 퇴화가 방지되고, 동시에 미생물에 의한 시스템의 오염이 피해지거나 또는 적어도 감소된다는 사실 때문이다.

일반적으로, 온건한 온도 구간(전형적으로 약 30℃에서 45℃)에서 높은 활성을 가지는 글루카노트랜스페라제(아밀로말타제)만이 유일하게 분리되었다. 예를 들어, Agric. Biol. Chem. 53, 2653-2659(1989) 및 J. Chem. Soc. 44-53(1956) 참조. 더욱 최근에, 고리 글루칸을 생성할 수도 있는 신규의 내열성 글루카노트랜스페라제(아밀로말타제)가 EP 0 884 384 A2에 설명되었다.

발명의 상세한 설명

(발명의 개요)

따라서, 제 1 양태로서, 본 발명은

(a) SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열과 적어도 65% 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드;

(b) 낮은 긴축도 조건하에서

(i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는

(ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열

과 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코드되는 폴리펩티드;

(c) (a) 또는 (b)의 대립형질 변이체;

(d)Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제에 의해 코드되는 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드와 적어도 65% 동일한 그것의 변이체; 및

(e) 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 상기 폴리펩티드의 단편

으로 구성되는 군으로부터 선택된, 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 분리된 폴리펩티드에 관한 것이다.

제 2 양태로서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 서열에 관한 것이다.

제 3 양태로서, 본 발명은

(a) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열;

(b) 낮은 긴축도 조건하에서

(i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는

(ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열

과 혼성화하는 핵산 서열;

(c) (a) 또는 (b)의 대립형질 변이체;

(d)Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제, 또는 상기 DNA 서열에 적어도 70% 동일한 그것의 변이체; 및

(e) 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드 단편을 코드하는 (a), (b), (c) 또는 (d)의 하위서열

로 구성되는 군으로부터 선택된, 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열, 또는 (a), (b), (c), (d) 또는 (e)의 상보성 가닥인 분리된 핵산 서열에 관한 것이다.

제 4 양태로서, 본 발명은 적합한 발현 숙주에서 폴리펩티드의 발현을 지시할 수 있는 하나 이상의 제어 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성물에 관한 것이다.

제 5 양태로서, 본 발명은 본 발명의 핵산 구성물, 프로모터, 및 전사 및 전사 중지 신호를 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

제 6 양태로서, 본 발명은 본 발명의 핵산 구성물을 포함하는 재조합 숙주 세포에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드의 제조 방법; 식품 제조 방법 및 식품를 위한 본 발명의 폴리펩티드의 사용; 그리고 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 세제 조성물에 관한 것이다.

(도면의 간단한 설명)

도 1은 플라스미드 pFUKU-Ruben을 예시한다.

도 2는 각각 아세테이트 완충액 및 포스페이트 완충액에서 시험된 본 발명의 폴리펩티드의 pH 프로파일을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 폴리펩티드의 온도 프로파일(30℃에서 75℃)을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 폴리펩티드의 열안정성(50℃에서 75℃)을 나타낸다.

(발명의 상세한 설명)

정의

본원에 사용된 때, 용어 " α-글루칸" 은 α-1,4-글루칸(구성 이당 단위로서 말토스를 함유하는 사슬 구조를 가지는 다당) 또는 α-1,6-분지 구조를 가지는 α-1,4-글루칸으로 간주한다. α-글루칸의 예는 아밀로스, 아밀로펙틴, 녹말, 글리코겐, 왁스질 녹말, 고 아밀로스 녹말, 가용성 녹말, 덱스트린, 가수분해된 녹말 생성물, 및 포스포릴라제를 사용하여 효소적으로 합성된 아밀로펙틴을 포함한다.

본 문맥에서, 용어 " 고리 글루칸" 은 α-1,4-글루코시드 결합만을 가지는 고리 α-1,4-글루칸, 및 α-1,4-글루코시드 결합 및 α-1,6-글리코시드 결합을 모두 가지는 분지 고리 글루칸을 의미하도록 의도된다. 용어 " 분지" 는 α-글루칸(고리이든 아니든)이 적어도 하나의 α-1,4-결합과는 상이한 글리코시드 결합을 가진다는 것을 의미하도록 의도된다. 분지 고리 글루칸의 예는 고리 구조에 α-1,6-결합을 가지는 분지 구조를 함유하는 내부 분지 고리 글루칸, 및 고리 구조에 더하여 비-고리 구조 부분을 함유하는 외부 분지 고리 글루칸을 포함한다.

본원에 사용된 때, 용어 " 글루카노트랜스페라제 활성" 또는 " 활성" 은 폴리펩티드가 10분간 65℃에서 0.86%(w/v) 말토트리오스 및 20mM 나트륨 포스페이트(pH 7.0)를 함유하는 용액에 작용한 때 생성된 글루코스의 양에 의해 측정된 폴리펩티드의 활성으로 간주한다. 1 유니트 효소 활성은 상기 언급된 조건을 사용하여 분 당 1㎛ol 글루코스를 방출하는 폴리펩티드의 양으로 정의된다.

본원에 정의된 바와 같은, " 분리된 폴리펩티드" 는 다른 폴리펩티드를 본질적으로 함유하지 않는 폴리펩티드이다. 따라서, " 분리된 폴리펩티드" 는 SDS-PAGE에 의해 측정된 바, 적어도 약 20%, 바람직하게 적어도 약 40%, 더 바람직하게 적어도 약 60%, 더욱 더 바람직하게 적어도 약 80%, 가장 바람직하게 적어도 약 90%, 특히 적어도 약 95% 순수해야 한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 " 분리된 핵산 서열" 은 다른 핵산 서열을 본질적으로 함유하지 않는 핵산 서열로 간주한다. 따라서, " 분리된 핵산 서열" 은 아가로스 전기영동에 의해 측정된 바, 적어도 약 20%, 바람직하게 적어도 약 40%, 더 바람직하게 적어도 약 60%, 더욱 더 바람직하게 적어도 약 80%, 가장 바람직하게 적어도 약 90% 순수해야 한다.

본 문맥에서, 용어 " 발현" 은 이것들에 제한되는 것은 아니지만, 전사, 전사후 변형, 번역, 번역후 변형, 및 분비를 포함하는 폴리펩티드의 생성에 연루된 어떤 단계를 포함한다.

" 핵산 구성물" 은 단일- 또는 이중-가닥인 핵산 분자로서 본원에서 정의되며, 이것은 자연발생한 유전자로부터 분리되거나, 또는 다르게는 자연에 존재하지 않는 방식으로 조합되고 병치된 핵산 세그먼트를 함유하도록 변형된다. 용어 " 핵산 구성물" 은 이 핵산 구성물이 본 발명의 코딩 서열의 발현에 필요한 모든 제어 서열을 함유하는 때 용어 " 발현 카세트" 와 동의어이다.

용어 " 코딩 서열" 은 단백질 생성물의 아미노산 서열을 직접적으로 구체화하는 핵산 서열로서 본원에서 정의된다. 코딩 서열의 경계는 일반적으로 mRNA의 3' 단부에 있는 오픈 리딩 프레임의 하류에 바로 위치한 전사 종결인자 서열 및 mRNA의 5' 단부에 있는 오픈 리딩 프레임의 상류에 바로 위치한 리보솜 결합 부위(원핵생물) 또는 ATG 시작 코돈(진핵생물)에 의해 결정된다. 코딩 서열은 이것들에 제한되는 것은 아니지만, DNA, cDNA, 및 재조합 핵산 서열을 포함할 수 있다.

본원에 사용된 때, 용어 " 제어 서열" 은 본 발명의 폴리펩티드의 발현에 필수적이거나 또는 유리한 모든 성분을 포함한다.

용어 " 작동가능하게 연결된" 은 제어 서열이 폴리펩티드의 발현을 지시하도록 제어 서열이 DNA 서열의 코딩 서열에 관련된 위치에 적합하게 놓여있는 입체배치로서 본원에서 정의된다.

본원에 사용된 때, 용어 " 숙주 세포" 는 복제 동안 발생한 돌연변이로 인해 모세포와는 동일하지 않은 모세포의 어떤 자손을 포함한다.

식품의 개선을 위한 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드의 사용

본 발명의 폴리펩티드는 식품에 있는 녹말에 작용함으로써 녹말의 고리화 반응을 촉매한다. 결과적으로, 식품에 있는 녹말의 분자 크기가 감소되고 고리 글루칸이 생성된다. 이 반응에 의해 생성된 고리 글루칸은 낮은 점도, 높은 가용성, 녹말의 퇴화를 억제하는 능력, 및 다양한 물질을 포함하는 능력을 가진다. 따라서, 식품은 본 발명의 폴리펩티드를 사용함에 의해 개선될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 식품에 있는 녹말에 작용하여 고리 글루칸을 축적하고, 이로써 저장 동안의 안정성 개선과 같은 식품의 물리적 성질 및 입안촉감이 개선될 수 있다. 고리 글루칸은 유기체에서 글루코스로 쉽게 분해되며, 그 결과 고리 글루칸은 양호한 소화능력 및 높은 에너지 전환 효율을 가진다.

본 발명의 폴리펩티드는 일본식 디저트(예를 들어, 고사리떡, 콩깻묵, 떡, 쌀젤리 및 콩떡), 스넥(예를 들어, 일본식 크래커, 쌀 크래커, 포테이토칩 및 다른 스넥), 밀제품(예를 들어, 빵, 파이, 피자, 케이크, 쿠키, 비스킷 및 크래커), 국수(예를 들어, 밀국수, 메밀국수, 중국식 국수, 및 스파게티 및 마카로니와 같은 파스타), 겨자피(gyoza skins), 슈마이피(shumai skins), 가공 해산물(예를 들어, 피시스틱 및 피시-파스타 케이크), 냉동 또는 냉장 가공 식품, 이유식, 유아식, 애완동물 사료, 동물 사료, 드링크(예를 들어, 스포츠 드링크), 운동식 및 영양보충식을 포함하여, 광범위한 녹말-함유 식품을 개선하는데 사용된다.

다량의 녹말을 함유하는 쌀제품, 일본식 디저트, 스넥, 밀제품 및 국수가 본 발명이 적용될 수 있는 바람직한 식품의 예들이다. 바람직한 식품의 다른 예는 저온 저장 동안의 안정성이 중요한 냉동 또는 냉장 가공 식품이다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 " 식품 재료" 는 상술된 식품을 제조하기 위한 어떤 재료, 및 식품 제조 과정 동안 제공되는 어떤 제조물로 간주한다.

본 발명의 폴리펩티드에 드러난 식품이 개선되는지의 여부는 식품에 있는 녹말의 분자 크기가 고리 글루칸 생성의 결과로서 감소되었는지의 여부를 시험함에 의해 확인될 수 있다.

또한, 각각 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 식품 재료, 식품 첨가 조성물, 및 식품 개선제가 본 발명의 범위내이다. 식품 첨가 조성물의 예는 양념(예를 들어, 간장, 간장 딥스, 우스터 소스, 육즙 베이스, 스튜 베이스, 카레 베이스, 수프 베이스, 마요네즈, 드레싱, 케찹, 및 혼합 양념)을 포함한다. 식품 개선제의 예는 증자(steamed rice)용 항-퇴화제 및 개선제를 포함한다.

글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 세제 조성물

녹말 오염, 예를 들어 아밀로스 오염은 현행 세제에 의해 제거하기 어려울 수 있으므로, 본 발명의 폴리펩티드가 아밀로스와 같은 결정화된 녹말의 더 수용성인 고리 화합물로의 변형을 촉매하는 능력으로 인해 그러한 세제에 사용될 수 있다고 생각된다.

따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 클리닝 또는 세제 조성물; 녹말 오염의 제거, 특히 아밀로스 오염의 제거를 위한 본 발명의 폴리펩티드의 사용; 및 아밀로스 오염-함유 단단한 표면 또는 아밀로스 오염-함유 세탁물을 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 클리닝 또는 세제 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 단단한 표면 또는 세탁물로부터 녹말 오염의 제거, 특히 아밀로스 오염의 제거 방법에 관한 것이다.

그러한 클리닝 및 세제 조성물은 본 분야에 잘 설명되어 있으며, 적합한 클리닝 및 세제 조성물을 더 설명하는 참고자료로는 WO 96/34946, WO 97/07202, WO 95/30011이 있다.

세제 조성물

본 발명의 폴리펩티드는 세제 조성물에 첨가됨으로써 세제 조성물의 성분이 될 수 있다.

본 발명의 세제 조성물은, 예를 들어 오염된 직물의 전처리에 적합한 세탁 첨가 조성물 및 린스가 첨가된 직물 유연제 조성물을 포함하는 손 또는 기계 세탁 세제 조성물로 조제될 수 있거나, 또는 일반 가정의 단단한 표면 클리닝 작업에 사용되는 세제 조성물로 조제될 수 있거나, 또는 손 또는 기계 설겆이 작업용으로 조제될 수 있다.

구체적 양태로서, 본 발명은 본 발명의 효소를 포함하는 세제 첨가제를 제공한다. 세제 첨가제 및 세제 조성물은 프로테아제, 리파제, 큐티나제, 아밀라제, 카르보히드라제, 셀룰라제, 펙티나제, 만난나제, 아라비나제, 갈락타나제, 크실라나제, 옥시다제, 예를 들어 락카제, 및/또는 퍼옥시다제와 같은 하나 이상의 다른 효소를 포함할 수 있다.

일반적으로, 선택된 효소(들)의 특성은 선택된 세제와 양립할 수 있어야 하며(즉, 최적 pH, 다른 효소 및 비효소 성분과의 양립성 등), 효소(들)는 유효량으로 존재해야 한다.

프로테아제:

적합한 프로테아제는 동물, 야채 또는 미생물 기원의 것들을 포함한다. 미생물 기원이 바람직하다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조작된 돌연변이가 포함된다. 프로테아제는 세린 프로테아제 또는 금속 프로테아제, 바람직하게 알칼리성 미생물 프로테아제 또는 트립신-유사 프로테아제일 수 있다. 알칼리성 프로테아제의 예는 섭틸리신, 특히Bacillus로부터 유도된 것들, 예를 들어 섭틸리신 노보, 섭틸리신 칼스버그, 섭틸리신 309, 섭틸리신 147 및 섭틸리신 168이다(WO 89/06279에 설명됨). 트립신-유사 프로테아제의 예는 트립신(예를 들어, 돼지 또는 소 기원의) 및 WO 89/06270 및 WO 94/25583에 설명된Fusarium프로테아제이다.

유용한 프로테아제의 예는 WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 및 WO 98/34946에 설명된 변이체, 특히 다음 위치 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 및 274 중 하나 이상에서 치환된 변이체이다.

바람직한 상업적으로 입수가능한 프로테아제 효소는 Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™ 및 Kannase™ (Novo Nordisk A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™ 및 FN3™ (Gene-ncor International Inc.)를 포함한다.

리파제:

적합한 리파제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조작된 돌연변이가 포함된다. 유용한 리파제의 예는, 예를 들어 EP 258 068 및 EP 305 216에 설명된H. lanuginosa(T. lanuginosa) 또는 WO 96/13580에 설명된H. insolens로부터의Humicola(동의어Thermomyces) 리파제, 예를 들어P. alcaligenes 또는P. pseudoalcaligens(EP 218 272),P. cepacia(EP 331 376),P. stutzeri(GB 1,372,034),P. fluorescens,Pseudomonsa sp.균주 SD 705(WO 95/06720 및 WO 96/27002),P. wisconsinensis(WO 96/12012)로부터의Pseu-domonas리파제, 예를 들어B. subtilis(Dartois 등 1993, Biochemica et Biophys-ica Acta, 1131, 253-360), B. stearothermophilus(JP 64/744992) 또는B. pumilus(WO 91/16422)로부터의Bacillus리파제를 포함한다.

다른 예는 WO92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 및 WO 97/07202에 설명된 것들과 같은 리파제 변이체이다.

바람직한 상업적으로 입수가능한 리파제 효소는 Lipolase™ 및 Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S)를 포함한다.

아밀라제:

적합한 아밀라제(α 및/또는 β)는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조작된 돌연변이가 포함된다. 아밀라제는, 예를 들어Bacillus, 예를 들어B. licheniformis의 특별한 균주로부터 얻어진 α-아밀라제를 포함하며, 이것은 GB 1,296,839에 더 상세히 설명된다.

유용한 아밀라제의 예는 WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 및 WO 97/ 43424에 설명된 변이체, 특히 다음 위치 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 및 444 중 하나 이상에서 치환된 변이체이다.

상업적으로 입수가능한 아밀라제는 Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ 및 BAN™ (Novo Nordisk A/S), Rapidase™ 및 Purastar™ (Genencor International Inc.)이다.

셀룰라제:

적합한 셀룰라제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조작된 돌연변이가 포함된다. 적합한 셀룰라제는Bac-illus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium속으로부터의 셀룰라제, 예를 들어 US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 및 WO 89/09259에 개시된Humicola insolens, Myceliophthora thermophila및Fusari-um oxysporum으로부터 생성된 진균 셀룰라제를 포함한다.

특히 적합한 셀룰라제는 색채 관리 이점을 가지는 알칼리성 또는 중성 셀룰라제이다. 그러한 셀룰라제의 예는 EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940에 설명된 셀룰라제이다. 다른 예는 WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 및 PCT/DK98/00299에 설명된 것들과 같은 셀룰라제 변이체이다.

상업적으로 입수가능한 셀룰라제는 Celluzyme™ 및 Carezyme™ (Novo Nordisk A/S), Clazinase™ 및 Puradax HA™ (Genencor International Inc.), 및 KAC-500(B)™ (Kao Corporation)을 포함한다.

퍼옥시다제/옥시다제:

적합한 퍼옥시다제/옥시다제는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조작된 돌연변이가 포함된다. 유용한 퍼옥시다제의 예는 WO 93/24618, WO 95/10602 및 WO 98/15257에 설명된 것들과 같은Coprinus, 예를 들어C. cinereus로부터의 퍼옥시다제 및 그것들의 변이체를 포함한다.

상업적으로 입수가능한 퍼옥시다제는 Guardzyme™ (Novo Nordisk A/S)를 포함한다.

세제 효소(들)는 하나 이상의 효소를 함유하는 개별 첨가제를 첨가함에 의해, 또는 이들 효소를 모두 포함하는 혼합 첨가제를 첨가함에 의해 세제 조성물에 포함될 수 있다. 본 발명의 세제 첨가제, 즉 개별 첨가제 또는 혼합 첨가제는, 예를 들어 과립, 액체, 슬러리 등으로 조제될 수 있다. 바람직한 세제 첨가제 조제물은 과립, 특히 비-분산 과립, 액체, 특히 안정화된 액체, 또는 슬러리이다.

비-분산 과립은, 예를 들어 US 4,106,991 및 4,661,452에 개시된 것과 같이 제조될 수 있으며, 선택적으로 본 분야에 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다. 왁스질 코팅재의 예는 평균 몰중량이 1000 내지 20000인 폴리(에틸렌옥시드) 생성물(폴리에틸렌 글리콜, PEG); 16 내지 50 에틸렌 옥시드 단위를 가지는 에톡실화 노닐페놀; 알콜이 12 내지 20 탄소 원자를 함유하고 15 내지 80 에틸렌 옥시드 단위를 가지는 에톡실화 지방 알콜; 지방 알콜; 지방산; 및 지방산의 모노-, 디- 및 트리-글리세리드이다. 유동층 기술에 의해 도포하기 적합한 필름-형성 코팅재의 예는 GB 1483591에 제공된다. 액체 효소 제조물은, 예를 들어 확립된 방법에 따라 프로필렌 글리콜과 같은 폴리올, 당 또는 당알콜, 락트산 또는 붕산을 첨가함에 의해 안정화될 수 있다. 보호된 효소는 EP 238,216에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

본 발명의 세제 조성물은 어떤 편리한 형태, 예를 들어 막대, 정제, 분말, 과립, 페이스트 또는 액체일 수 있다. 액체 세제는 전형적으로 70%까지의 물 및 0 내지 30%의 유기 용매를 함유하는 수성, 또는 비수성일 수 있다.

세제 조성물은 하나 이상의 계면활성제를 포함하며, 이것은 반극성을 포함하는 비이온성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 양쪽성일 수 있다. 계면활성제는 전형적으로 0.1중량% 내지 60중량%의 수준으로 존재한다.

세제에 포함된 때, 세제는 보통 선형 알킬벤젠술포네이트, 알파-올레핀술포네이트, 알킬 술페이트(지방 알콜 술페이트), 알콜 에톡시술페이트, 2차 알칸술포네이트, 알파-술포 지방산 메틸 에스테르, 알킬- 또는 알켄일숙신산 또는 비누와 같은 음이온성 계면활성제를 약 1% 내지 약 40% 함유할 것이다.

세제에 포함된 때, 세제는 보통 알콜 에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 알킬폴리글리코시드, 알킬디메틸아민옥시드, 에톡실화 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 폴리히드록시 알킬 지방산 아미드, 또는 글루코스아민(" 글루카미드")의 N-아실 N-알킬 유도체와 같은 비이온성 계면활성제를 약 0.2% 내지 약 40% 함유할 것이다.

세제는 제올라이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스포네이트, 카르보네이트, 시트레이트, 니트릴로트리아세트산, 에틸렌디아민테트라아세트산, 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 알킬- 또는 알켄일숙신산, 가용성 실리케이트 또는 층상 실리케이트(예를 들어, Hoechst의 SKS-60)와 같은 세제 빌더 또는 착화제를 0 내지 65% 함유할 수 있다.

세제는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 예는 카르복시메틸셀룰로스, 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(비닐알콜), 폴리(비닐피리딘-N-옥시드), 폴리(비닐이미다졸), 폴리아크릴레이트와 같은 폴리카르복실레이트, 말레/아크릴산 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체이다.

세제는 테트라아세틸에틸렌디아민 또는 노나노일옥시벤젠술포네이트와 같은 과산-형성 표백 활성제와 조합될 수 있는 퍼보레이트 또는 퍼카르보네이트와 같은 H_2O_2 공급원을 포함할 수 있는 표백 시스템을 함유할 수 있다. 또는 달리, 표백 시스템은, 예를 들어 아미드, 이미드 또는 술폰형의 과산화산을 포함할 수 있다.

본 발명의 세제 조성물의 효소(들)는 종래의 안정제, 예를 들어 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤과 같은 폴리올, 당 또는 당알콜, 락트산, 붕산, 또는 붕산 유도체, 예를 들어 방향족 보레이트 에스테르, 또는 4-포르밀페닐 보론산과 같은 페닐 보론산 유도체를 사용하여 안정화될 수 있으며, 이 조성물은, 예를 들어 WO 92/19709 및 WO 92/19708에 설명된 바와 같이 조제될 수 있다.

또한, 세제는, 예를 들어 클레이, 거품 부스터, 비누거품 억제제, 항-부식제, 때-현탁제, 항-때재부착제, 염료, 살생물제, 광표백제, 굴수성 유발제, 변색 저해제, 또는 향수를 포함하는 직물 콘디셔너와 같은 다른 종래의 세제 성분을 함유할 수 있다.

세제 조성물에 어떤 효소, 특히 본 발명의 폴리펩티드(효소)가 세척액 리터 당 효소 단백질 0.01 내지 100mg, 바람직하게 세척액 리터 당 효소 단백질 0.05 내지 5mg, 특히 세척액 리터 당 효소 단백질 0.1 내지 1mg에 상응하는 양으로 첨가될 수 있다고 현재 생각된다.

본 발명의 폴리펩티드는 추가적으로 본원에 참고자료로 포함되는 WO 97/07202에 개시된 세제 조제물에 혼합될 수 있다.

글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드

본 발명의 제 1 구체예에서, 분리된 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열과 적어도 65% 동일한 아미노산 서열을 가진다(즉, 성숙한 폴리펩티드). 관심있는 본 발명의 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다(이후, " 상동성 폴리펩티드").

바람직한 구체예에서, 상동성 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열과 5 아미노산까지, 예를 들어 4 아미노산까지, 예컨대 3 아미노산, 2 아미노산, 또는 1 아미노산까지 상이한 아미노산 서열을 가진다.

서열 정렬 및 동일성 점수의 계산은 단백질 및 DNA 정렬 모두에 유용한 전 Smith-Waterman 정렬을 사용하여 행했다. 초기값 점수화 매트릭스 BLOSUM50 및 동일성 매트릭스가 단백질 및 DNA 정렬에 각각 사용된다. 갭에 있는 제 1 잔기에 대한 패널티는 단백질 -12 및 DNA -16이다. 갭에 있는 추가의 잔기에 대한 패널티는 단백질 -2 및 DNA -4이다. 정렬은 파스타 패키지 버전 v20u6에 의거한다(W. R. Pearson 및 D. J. Lipman (1998), " 생물학적 서열 분석의 개선된 도구" , PNAS 85: 2444-2448, 및 W. R. Pearson (1990) " FASTP 및 FASTA를 사용한 빠르고 민감한 서열 비교" Methods in Enzymology 183:63-98).

최신의 선행기술로 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 글루카노트랜스페라제를 정렬하면, 즉 상술된 방법을 사용하여 EP 0 884 384에 개시된 서열을 가지는 글루카노트랜스페라제를 정렬하면, 다음의 동일성 퍼센트가 얻어진다: 아미노산 서열간 동일성 %: 62.5%, 및 핵산 서열간 동일성 %: 65.5%

바람직하게, 본 발명의 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열, 그것의 대립형질 변이체, 또는 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 그것의 단편을 포함한다. 명백하게, 본 발명의 폴리펩티드는 또한 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

대립형질 변이체는 동일한 염색체 유전자좌를 점유하는 유전자의 둘 이상의 다른 형태 중 어느 것을 표시한다. 대립형질 변이는 돌연변이를 통해 자연적으로 발생하고, 집단내에 다형성을 가져올 수 있다. 유전자 돌연변이는 사일런트(코드된 폴리펩티드에 변화가 없다)일 수 있거나, 또는 변경된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 코드할 수 있다. 폴리펩티드의 대립형질 변이체는 유전자의 대립형질 변이체에 의해 코드된 폴리펩티드이다.

본 발명의 제 2 구체예에서, 분리된 폴리펩티드는 낮은 긴축도 조건, 바람직하게 중간 긴축도 조건, 더 바람직하게 높은 긴축도 조건하에서, (i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는 (ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열과 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코드된다(J. Sambrook, E. F. Fritsch, 및 T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2판, 콜드 스프링 하버, 뉴욕).

SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥의 하위서열은 적어도 100개의 뉴클레오티드, 또는 바람직하게 적어도 200개의 뉴클레오티드일 수 있다. 더욱이, 이 하위서열은 글루코트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드 단편을 코드해야 한다. 폴리펩티드는 또한 글루코트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드의 대립형질 변이체 또는 단편일 수도 있다.

SEQ ID NO:1의 핵산 서열 또는 그것의 하위서열, 그리고 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는 그것의 단편은 본 분야에 잘 공지된 방법에 따라 상이한 속 또는 종의 균주로부터 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코드하는 DNA를 확인 및 클론하기 위한 핵산 프로브를 디자인하는데 사용될 수 있다. 특히, 그러한 프로브는 표준 서든 블롯팅 과정 후 관심의 속 또는 종의 게놈 또는 cDNA와의 혼성화에 사용될 수 있으며, 이로써 거기에 있는 상응하는 유전자가 확인 및 분리된다. 그러한 프로브는 전체 서열보다 상당히 짧을 수 있지만, 적어도 15개, 바람직하게 적어도 25개, 더 바람직하게 적어도 35개 뉴클레오티드의 길이여야 한다. 더 긴 프로브가 또한 사용될 수 있다. DNA 및 RNA 프로브가 모두 사용될 수 있다. 프로브는 전형적으로 상응하는 유전자를 검출하기 위해 표지된다(예를 들어, ^{32}P,H, ^{35}S, 바이오틴 또는 아비딘으로). 그러한 프로브는 본 발명에 의해 포함된다.

따라서, 그러한 다른 유기체로부터 제조된 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리는 상술된 프로브와 혼성화하고 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코드하는 DNA에 대해 스크리닝될 수 있다. 그러한 다른 유기체로부터의 게놈 또는 다른 DNA는 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 또는 당업자에 의해 공지된 다른 분리 기술에 의해 분리될 수 있다. 이 라이브러리로부터의 DNA 또는 분리된 DNA는 옮겨져 니트로셀룰로스 또는 다른 적합한 담체 물질에 고정될 수 있다. SEQ ID NO:1 또는 그것의 하위서열과 상동성인 클론 또는 DNA를 확인하기 위해서, 담체 물질이 서든 블롯에 사용된다. 본 발명의 목적을 위하여, 혼성화는 핵산 서열이 낮은 내지 높은 긴축도 조건하에서 SEQ ID NO:1에 나타낸 핵산 서열, 그것의 상보성 가닥, 또는 그것의 하위서열에 상응하는 표지된 핵산 프로브에 혼성화하는 것을 나타낸다. 이들 조건하에서 핵산 프로브가 혼성화한 분자가 x-선 필름을 사용하여 검출된다.

제 2의 관심있는 구체예에서, 핵산 프로브는 SEQ ID NO:2의 (성숙한) 폴리펩티드 또는 그것의 하위서열을 코드하는 핵산 서열이다. 제 3의 관심있는 구체예에서, 핵산 프로브는 SEQ ID NO:1이다. 제 4의 관심있는 구체예에서, 핵산 프로브는 SEQ ID NO:1의 성숙한 폴리펩티드 코딩 영역이다. 제 5의 관심있는 구체예에서, 핵산 프로브는Escherichia coliDSM 13049에 함유된 플라스미드 pFuKu-Ruben에 함유된 핵산 서열이며, 여기에서 핵산 서열은 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코드한다. 제 6의 관심있는 구체예에서, 핵산 프로브는Escherichia coliDSM 13049에 함유된 플라스미드 pFuku-Ruben에 함유된 성숙한 폴리펩티드 코딩 영역이다.

적어도 100개 뉴클레오티드 길이의 긴 프로브에 대해서, 낮은 내지 높은 긴축도 조건은 표준 서든 블롯팅 과정 후, 5x SSPE, 0.3% SDS, 200μg/ml 잘려져 변성된 연어 정자 DNA, 및 25% 포름아미드(낮은 긴축도), 35% 포름아미드(중간 긴축도) 또는 50% 포름아미드(높은 긴축도) 중에서 42℃에서 예비혼성화 및 혼성화로 정의된다.

적어도 100개 뉴클레오티드 길이의 긴 프로브에 대해서, 담체 물질은 바람직하게 적어도 50℃(낮은 긴축도), 더 바람직하게 적어도 55℃(중간 긴축도), 더욱 더 바람직하게 적어도 65℃(높은 긴축도)에서 2x SSC, 0.2% SDS를 사용하여 각 15분씩 3번 최종적으로 세척된다.

약 15개 뉴클레오티드 내지 약 70개 뉴클레오티드 길이의 짧은 프로브에 대해서, 긴축도 조건은 표준 서든 블롯팅 과정 후, 0.9M NaCl, 0.09M Tris-HCl pH 7.6, 6mM EDTA, 0.5% NP-40, 1x 덴하르츠 용액, 1mM 나트륨 피로포스페이트, 1mM 나트륨 모노베이직 포스페이트, 0.1mM ATP, 및 ml 당 효모 RNA 0.2mg 중에서, Bol-ton 및 McCarthy(1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48: 1390)에 따라 계산된 Tm보다 5℃ 내지 10℃ 낮은 온도에서 예비혼성화, 혼성화, 및 혼성화후 세척으로 정의된다.

약 15개 뉴클레오티드 내지 약 70개 뉴클레오티드 길이의 짧은 프로브에 대해서, 담체 물질은 계산된 Tm보다 5℃ 내지 10℃ 낮은 온도에서 6x SCC, 0.1% SDS로 15분간 1번, 6x SSC를 사용하여 각 15분씩 2번 세척된다.

상기 나타낸 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 그것의 성숙한 폴리펩티드일 수 있으며, 여기에서 하나 이상의 아미노산(들)이 또 다른(다른) 아미노산(들)으로 치환되고, 하나 이상의 아미노산(들)이 결실되고, 및/또는 하나 이상의 아미노산(들)이 삽입된다.

바람직하게, 아미노산 변화는 부차적 성질로서, 즉 단백질의 접힘 및/또는 활성에 의미있는 영향을 미치지 않는 보존성 아미노산 치환; 전형적으로 1 내지 약 30 아미노산의 작은 결실; 아미노-말단 메티오닌 잔기와 같은 작은 아미노- 또는 카르복실-말단 확장; 약 20 내지 25 잔기까지의 작은 링커 펩티드; 또는 폴리-히스티딘 트랙, 항원 에피토프 또는 결합 도메인과 같이 순전하 또는 다른 기능을 변화시킴으로써 정제를 용이하게 하는 작은 확장이다.

보존성 치환의 예는 염기성 아미노산(아르기닌, 리신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(로이신, 이소로이신 및 발린), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌 및 메티오닌) 군의 범위내이다. 일반적으로 특이적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 치환이 본 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 H. Neurath 및 R. L. Hill, 1979, In, Proteins(아카데믹 프레스, 뉴욕)에 설명된다. 가장 통상적으로 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/ Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly, 그리고 이것들의 역이다.

본 발명의 매우 관심있는 구체예에서, 폴리펩티드는 열안정성으로서, 즉 본 발명의 폴리펩티드는 승온에서도 그것의 효소 활성을 보유한다.

따라서, 본 발명자들은 분리된 폴리펩티드가 열안정성으로 고려될 수 있는지의 여부를 평가하기 위해 당업자에 의해 쉽게 사용될 수 있는 적합한 예비 시험을 개발했다. 따라서, 본원에 설명된 바와 같이 시험된 때, 특히 바람직한 폴리펩티드는 20mM 포스페이트 완충액 pH 7.0 중에서 10분간 67℃에서, 바람직하게 70℃에서 인큐베이션한 후, 적어도 75%의 활성, 예를 들어 적어도 80%의 활성, 예컨대 적어도 85%, 바람직하게 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 특히 실질적으로 전활성을 보유하는 폴리펩티드이다. 이와 관련하여, 100% 활성은 앞서 설명된 글루카노트랜스페라제 활성으로 간주되는데, 즉 상기 언급된 퍼센트 값은 20mM 포스페이트 완충액 pH 7.0중에서 10분간 65℃에서 인큐베이션한 후 폴리펩티드의 활성에 대해 상대적으로 측정된다는 것이 이해되어야 한다.

효소는 바람직하게 6 내지 8 범위, 특히 약 6.5 내지 약 7.5 범위, 예컨대 약 6.75 내지 약 7.25 범위, 예를 들어 약 7의 최적 pH를 가져야 한다.

더욱이, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게 아밀로스와 같은 α-글루칸에 작용함으로써 분자내 글리코실전달 반응에 의해 고리 글루칸을 생성할 수 있어야 한다. 여기에 더하여, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게 아밀로펙틴과 같은 분지 구조를 포함하는, 즉 α-1,6-결합을 가지는 α-글루칸에 작용함으로써 분지 고리 글루칸을 생성할 수 있어야 한다.

더욱이 또한, 본 발명의 범위내에 있다고 고려되는 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 그것의 성숙한 폴리펩티드에 대해 면역화학적 동일성 또는 부분적 면역화학적 동일성을 가지는, 바람직하게는 정제된 형태의 분리된 폴리펩티드이다. 면역화학적 특성은 잘 공지된 오크테를로니 이중 면역확산 과정에 의한 면역학적 교차-반응 동일성 시험에 의해 측정된다. 구체적으로, 면역반응성이거나 또는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 그것의 성숙한 폴리펩티드의 에피토프에 결합하는 다중클론 항체를 함유하는 항혈청이 Harboe 및 Ingild, In N. H. Axelsen, J. Kroll 및 B. Weeks, 편집자, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, 블랙웰 과학서적, 1973, 챕터 23, 또는 Johnstone 및 Thorpe, Immunochemistry in Practice, 블랙웰 과학서적, 1982 (27-31쪽)에 설명된 과정에 따라 토끼(또는 다른 설치류)를 면역화함에 의해 제조된다. 면역화학적 동일성을 가지는 폴리펩티드는 특이적 면역화학 기술을 사용하여, 전체적 침전물 융합, 동일한 침전물 형태, 및/또는 동일한 전기영동도와 같이 동일한 방식으로 항혈청과 반응하는 폴리펩티드이다. 면역화학적 동일성에 대한 더 이상의 설명은 Axelsen,

Bock 및 Kroll, In N. H. Axelsen, J. Kroll 및 B. Weeks, 편집자, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, 블랙웰 과학서적, 1973, 챕터 10에 설명된다. 부분적 면역화학적 동일성을 가지는 폴리펩티드는 특이적 면역화학 기술을 사용하여, 부분적 침전물 융합, 부분적으로 동일한 침전물 형태, 및/또는 부분적으로 동일한 전기영동도와 같이 부분적으로 동일한 방식으로 항혈청과 반응하는 폴리펩티드이다. 부분적 면역화학적 동일성에 대한 더 이상의 설명은 Bock 및 Axelsen, In N. H. Axelsen, J. Kroll 및 B. Weeks, 편집자, A Ma-nual of Quantitative Immunoelectrophoresis, 블랙웰 과학서적, 1973, 챕터 11에 설명된다.

또한, 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 단일클론 항체는, 예를 들어 E. Harlow 및 D. Lane, 편집자, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual(콜드 스프링 하버 프레스, 콜드 스프링 하버, 뉴욕)의 방법에 따라 제조 및 사용될 수 있다.

일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 글루카노트랜스페라제 활성의 적어도 20%를 가지는 것이 바람직하다.

SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 글루카노트랜스페라제 활성의 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예를 들어 적어도 50%, 바람직하게 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예를 들어 적어도 80%, 더 바람직하게 적어도 90%, 또는 적어도 95%를 가지는 폴리펩티드가 특히 바람직하다.

본 발명의 폴리펩티드는 어떤 속의 미생물로부터 얻어질 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 주어진 공급원과 관련하여 본원에 설명된 바와 같은, 용어 " 로부터 얻어진" 은 핵산 서열에 의해 코드되는 폴리펩티드가 공급원에 의해 또는 공급원으로부터의 핵산 서열이 삽입된 세포에 의해 제조되는 것을 의미해야 한다. 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드는 세포외적으로 분비된다.

본 발명의 한 관심있는 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는Thermus속, 특히Thermus rubens, 예컨대Thermus rubensATCC 31556으로부터 유도될 수 있다.

본 발명자들은Thermus rubensATCC 31556으로부터 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코드하는 유전자를 분리하여, 그것을E. coliDH12S에 삽입했다. 유전자가 잠복해 있는E. coli균주는 1999년 9월 20일자로 도이체 삼룬그 본 미크로오르가니스멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(독일 디-38124 브라운츠베이그 마체로데르 베그 1베)에 특허 진행 목적을 위한 미생물 기탁의 국제 승인에 대한 부다페스트 조약에 따라 기탁되었고 기탁 번호 DSM 13049를 받았다.

따라서, 본 발명의 더 이상의 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드는Escheri-chia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제에 의해 코드되는 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드에 적어도 65% 동일한 그것의 변이체이다. 변이체에 관하여, 변이체 폴리펩티드는Esche-richia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제에 의해 코드되는 폴리펩티드와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 것이 바람직하다.

본 발명의 폴리펩티드는 박테리아 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는,Bacillus폴리펩티드, 예를 들어Bacillus alkalophilus, Bacillus amy-loliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Bac-illus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, 또는Bacillus thuringiensis폴리펩티드; 또는Streptomyces폴리펩티드, 예를 들어Streptomyces lividans또는Streptomyces murinus폴리펩티드와 같은 그램 양성 박테리아 폴리펩티드; 또는 그램 음성 박테리아 폴리펩티드, 예를 들어E. coli또는Pseudomonas sp.폴리펩티드일 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 진균 폴리펩티드일 수 있으며, 더 바람직하게Cand-ida, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces,또는Yarrowia폴리펩티드와 같은 효모 폴리펩티드; 또는 더 바람직하게Acremonium, Aspergillus , Aureobasidium, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor. Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Piromyces, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, 또는Trichoderma폴리펩티드와 같은 사상균 폴리펩티드일 수 있다.

바람직한 구체예에서, 폴리펩티드는Saccharomyces carlsbergensis, Saccha-romyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Sacc-haromyces kluyveri, Saccharomyces norbensis또는Saccharomyces oviformis폴리펩티드이다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드는Aspergillus aculeatus, Asper-gillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nid-ulans, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Fusarium bactridioides, Fusari-um cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxyspor-um, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulo-sum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humic-ola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trich-oderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, 또는Trichoderma viride폴리펩티드이다.

상술된 종에 관해서, 본 발명이 완전한 및 불완전한 상태, 그리고 공지된 종명에 무관하게 다른 분류학적 동위종, 예를 들어 무성세대를 포함한다는 것이 이해될 것이다. 당업자는 적합한 동위종의 동일성을 쉽게 인지할 것이다.

이들 종의 균주는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC), 도이체 삼룬크 본 미크로오르가니스멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(DSM), 센트랄뷰로 보르 슈멜컬쳐스(CBS), 및 애그리컬쳐랄 리서치 서비스 페이턴트 컬쳐 콜렉션, 노던 레지오날 리서치 콜렉션(NRRL)과 같은, 많은 배양 콜렉션에서 공식적으로 쉽게 입수할 수 있다.

더욱이, 그러한 폴리펩티드는 상기 언급된 프로브를 사용하여 자연(예를 들어, 토양, 퇴비, 물 등)에서 분리된 미생물을 포함하는 다른 공급원으로부터 확인되고 얻어질 수 있다. 자연 서식지로부터 미생물을 분리하는 기술은 본 분야에 잘 공지되어 있다. 다음에, 핵산 서열이 또 다른 미생물의 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 유사하게 스크니링함으로써 유도될 수 있다. 일단 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열이 프로브 (들)를 사용하여 검출되면, 이 서열은 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 분리 또는 클론될 수 있다(예를 들어, Sambrook 등, 1989 상동, 참조).

또한, 본 발명의 핵산 서열에 의해 코드되는 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드가 폴리펩티드 또는 그것의 단편의 N-말단 또는 C-말단에서 융합된 융합 폴리펩티드 또는 절단가능한 융합 폴리펩티드를 포함한다. 융합 폴리펩티드는 본 발명의 핵산 서열(또는 그것의 일부)에 다른 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열(또는 그것의 일부)을 융합함에 의해 제조된다. 융합 폴리펩티드를 제조하는 기술은 본 분야에 공지되어 있으며, 폴리펩티드를 코드하는 코딩 서열을 리게이션하는 것을 포함하고, 이로써 그것들은 프레임안에 있고 융합 폴리펩티드의 발현은 동일한 프로모터(들) 및 종결인자의 제어하에 있다.

핵산 서열

또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열에 관한 것이다.

한 관심있는 구체예에서, 핵산 서열은 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열과 적어도 70% 동일하다. 바람직하게, 핵산 서열은 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 본 발명의 또 다른 관심있는 구체예에서, 핵산 서열은 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 아미노산 서열, 그것의 대립형질 변이체, 또는 본 발명에 따르는 폴리펩티드를 코드할 수 있는 그것의 단편을 포함한다. 명백하게, 핵산 서열은 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 핵산 서열은Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제, 또는 상기 DNA 서열에 적어도 70% 동일한 그것의 변이체이다. 변이체에 관하여, 변이체 DNA 서열은Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 그것의 성숙한 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 포함하며, 이것은 유전 코드의 축퇴에 의하여 SEQ ID NO:1과는 상이하다. 또한, 본 발명은 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 SEQ ID NO:2의 단편을 코드하는 SEQ ID NO:1의 하위서열에 관한 것이다.

SEQ ID NO:1의 하위서열은 5' 및/또는 3' 단부로부터 하나 이상의 뉴클레오티드가 결실되었다는 것을 제외하고는 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503에 의해 포함되는 핵산 서열이다.

또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열에 관한 것으로서, 이것은 낮은 긴축도 조건, 바람직하게 중간 긴축도 조건, 더 바람직하게 높은 긴축도 조건하에서, (i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는 (ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열과 혼성화한다. 또한, 본 발명은 (i), (ii) 및 (iii)의 상보성 가닥에 관한 것이다.

폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 분리 또는 클론하는데 사용되는 기술은 본 분야에 공지되어 있으며, 게놈 DNA로부터의 분리, cDNA로부터의 제조, 또는 그것들의 조합을 포함한다. 그러한 게놈 DNA로부터 본 발명의 핵산 서열을 클로닝하는 것은, 예를 들어 잘 공지된 중합효소 연쇄반응(PCR) 또는 구조적 특징을 공유하는 클론된 DNA 단편을 검출하기 위한 발현 라이브러리의 항체 스크리닝을 사용하여 행해질 수 있다. 예를 들어, Innis 등 1990, PCR:A Guide to Methods and Applic-ation(아카데믹 프레스, 뉴욕) 참조. 리가제 연쇄반응(LCR), 리게이션 활성화 전사(LAT) 및 핵산 서열-기초 증폭(NASBA)과 같은 다른 핵산 증폭 과정이 사용될 수 있다. 핵산 서열은Thermus rubensATCC 31556의 균주, 또는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있으며, 예를 들어 핵산 서열의 폴리펩티드 코드 영역의 대립형질 또는 종변이체일 수 있다.

분리된 핵산 서열은, 예를 들어 핵산 서열을 그것의 자연적 위치에서 그것이 재생성되는 다른 부위로 재배치하는 유전 조작에 사용되는 표준 클로닝 과정에 의해 얻어질 수 있다. 클로닝 과정은 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 포함하는 원하는 핵산 단편의 절제 및 분리, 벡터 분자에 단편의 삽입, 및 재조합 벡터와 숙주 세포의 결합을 포함할 수 있으며, 이 경우 핵산 서열의 다중 카피 또는 클론이 복제될 것이다. 핵산 서열은 게놈, cDNA, RNA, 반합성, 합성 기원 또는 그것들의 어떤 조합일 수 있다.

본 발명의 목적을 위하여, 두 핵산 서열간의 동일성 정도는 상술된 바와 같이 측정된다.

본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열의 변형은 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드의 합성에 필수적일 수 있다. 용어 폴리펩티드와 " 실질적으로 유사한" 은 폴리펩티드의 비-자연발생적 형태로 간주한다. 이들 폴리펩티드는 자생 공급원으로부터 분리된 폴리펩티드와는 일부 조작 방식에서 상이할 수 있는데, 예를 들어 특이적 활성, 열안정성, 최적 pH 등에서 상이한 변이체일 수 있다. 변이체 서열은 SEQ ID NO:1의 일부를 코드하는 폴리펩티드로서 나타낸 핵산 서열, 예를 들어 그것의 하위서열을 토대로, 및/또는 핵산 서열에 의해 코드되는 폴리펩티드의 다른 아미노산 서열을 발생시키지는 않지만, 효소를 생성하도록 의도된 숙주 유기체의 코돈 용법에는 상응하는 뉴클레오티드 치환의 도입에 의해, 또는 상이한 아미노산 서열을 발생시킬 수 있는 뉴클레오티드 치환의 도입에 의해 구성될 수 있다. 뉴클레오티드 치환에 대한 일반적인 설명은, 예를 들어 Ford 등, 1991, Protein Expression and Purification 2:95-107 참조.

그러한 치환이 분자의 기능에 결정적인 영역을 벗어나서 만들어질 수 있으며, 여전히 활성 폴리펩티드를 가져온다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 분리된 핵산 서열에 의해 코드되는 폴리펩티드의 활성에 본질적이며, 따라서 치환되지 않는 것이 바람직한 아미노산 잔기가 부위-지정 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발과 같은 본 분야에 공지된 과정에 따라 확인될 수 있다(예를 들어, Cunningham 및 Wells, 1989, Science 244:1081-1085). 후자의 기술에서, 돌연변이가 분자에 있는 모든 양으로 하전된 잔기에 도입되고, 결과의 돌연변이 분자가 글루카노트랜스페라제 활성에 대해 시험되어, 분자의 활성에 결정적인 아미노산 잔기를 확인한다. 또한, 기질-효소 상호작용 부위가 핵자기 공명 분석, 결정학 또는 광친화성 표지화와 같은 기술에 의해 측정된 3-차원 구조의 분석에 의해 측정될 수 있다(예를 들어, de Vos 등, 1992, Science 255:306-312; Smith 등, 1992, Journal of Molecular Biology 224:899-904; Wlodaver 등, 1992, FEBS Letters 309:59-64).

핵산 구성물

또한, 본 발명은 적합한 숙주 세포에서 폴리펩티드의 발현을 지시할 수 있는 하나 이상의 제어 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성물에 관한 것이다.

본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열은 폴리펩티드의 발현을 제공하기 위해 다양한 방식으로 조작될 수 있다. 벡터에 삽입하기 전에 핵산 서열을 조작하는 것이 발현 벡터에 따라 바람직하거나 또는 필수적일 수 있다. 재조합 DNA 방법을 이용하는 핵산 서열 변형 기술이 본 분야에 잘 공지되어 있다.

제어 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 발현에 필수적이거나 또는 유리한 모든 성분을 포함한다. 각 제어 서열은 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열에 자생적 또는 외래적일 수 있다. 그러한 제어 서열은 이것들에 제한되는 것은 아니지만, 리더, 폴리아데닐화 서열, 프로펩티드 서열, 프로모터, 신호 펩티드 서열, 및 전사 종결인자를 포함한다. 최소한 제어 서열은 프로모터, 그리고 전사 및 번역 중지 신호를 포함한다. 제어 서열은 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열의 코딩 영역과 제어 서열의 리게이션을 용이하게 하는 특이적 제한 부위를 도입할 목적으로 링커와 함께 제공될 수 있다.

제어 서열은 핵산 서열의 발현을 위해 숙주 세포에 의해 인식되는 핵산 서열인 적합한 프로모터 서열일 수 있다. 프로모터 서열은 폴리펩티드의 발현을 매개하는 전사 제어 서열을 함유한다. 프로모터는 돌연변이, 트렁케이트, 및 혼성 프로모터를 포함하는 선택된 숙주 세포에서 전사 활성을 나타내는 어떤 핵산 서열일 수 있으며, 숙주 세포에 상동성 또는 이종성인 세포외 또는 세포내 폴리펩티드를 코드하는 유전자로부터 얻어질 수 있다.

특히 박테리아 숙주 세포에서 본 발명의 핵산 구성물의 전사를 지시하는데 적합한 프로모터의 예는E. coli lac오페론, Streptomyces coelicolor아가라제 유전자(dagA),Bacillus subtilis레반수크라제 유전자(sacB),Bacillus licheniformis알파-아밀라제 유전자(amyL),Bacillus stearothermophilus말토겐 아밀라제 유전자(amyM),Bacillus amyloliquefaciens알파-아밀라제 유전자(amyQ),Bacillus licheniformis페니실리나제 유전자(penP),Bacillus subtilis xylA및xylB유전자, 및 원핵생물 베타-락타마제 유전자로부터 얻어진 프로모터(Villa-Kamaroff 등, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3727-3731), 그리고tac프로모터(DeBoer 등, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25)이다. 더 이상의 프로모터는 " 재조합 박테리아로부터의 유용한 단백질" Scientific American, 1980, 242:74-94; 및 Sambrook 등, 1989(상동)에 설명된다.

사상균 숙주 세포에서 본 발명의 핵산 구성물의 전사를 지시하는데 적합한 프로모터의 예는Aspergillus oryzaeTAKA 아밀라제,Rhizomucor miehei아스파르트 프로테이나제,Aspergillus niger중성 알파-아밀라제,Aspergillus niger산 안정성 알파-아밀라제,Aspergillus niger또는Aspergillus awamori글루코아밀라제 (glaA),Rhizomucor miehei리파제,Aspergillus oryzae알칼리성 프로테아제,Aspergillus oryzae트리오스 포스페이트 이소머라제,Aspergillus nidulans아세트아미다제, 및Fusarium oxysporum트립신-유사 프로테아제의 유전자로부터 얻어진 프로모터(WO 96/00787), 그리고 NA2-tpi 프로모터(Aspergillus niger중성 알파 -아밀라제 및Aspergillus oryzae트리오스 포스페이트 이소머라제 유전자로부터의 프로모터의 혼성체), 및 그것의 돌연변이, 트렁케이트, 및 혼성 프로모터이다.

효모 숙주에서 유용한 프로모터는Saccharomyces cerevisiae에놀라제(ENO-1),Saccharomyces cerevisiae갈락토키나제(GAL1),Saccharomyces cerevisiae알콜 탈수소효소/글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(ADH2/GAP), 및Sacchar-omyces cerevisiae3-포스포글리세레이트 키나제의 유전자로부터 얻어진다. 효모 숙주 세포용의 다른 유용한 프로모터는 Romanos 등, 1992, Yeast 8:423-488에 설명된다.

또한, 제어 서열은 숙주 세포에 의해 인식되어 전사를 종결하는 서열인 적합한 전사 종결인자 서열일 수 있다. 종결인자 서열은 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열의 3'-말단에 작동가능하게 연결된다. 선택된 숙주 세포에서 기능적인 어떤 종결인자가 본 발명에 사용될 수 있다.

사상균 숙주 세포에 바람직한 종결인자는Aspergillus oryzaeTAKA 아밀라제,Aspergillus niger글루코아밀라제,Aspergillus nidulans안트라닐레이트 신타제,Aspergillus niger알파-글루코시다제, 및Fusarium oxysporum트립신-유사 프로테아제의 유전자로부터 얻어진다.

효모 숙주 세포에 바람직한 종결인자는Saccharomyces cerevisiae에놀라제,Saccharomyces cerevisiae시토크롬 C(CYC1), 및Saccharomyces cerevisiae글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소의 유전자로부터 얻어진다. 효모 숙주 세포용의 다른 유용한 종결인자는 Romanos 등, 1992(상동)에 설명된다.

또한, 제어 서열은 숙주 세포에 의한 번역에 중요한 mRNA의 미번역 영역인 적합한 리더 서열일 수 있다. 리더 서열은 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열의 5' -말단에 작동가능하게 연결된다. 선택된 숙주 세포에서 기능적인 어떤 리더 서열이 본 발명에 사용될 수 있다.

사상균 숙주 세포에 바람직한 리더는Aspergillus oryzaeTAKA 아밀라제 및Aspergillus nidulans트리오스 포스페이트 이소머라제의 유전자로부터 얻어진다.

효모 숙주 세포에 적합한 리더는Saccharomyces cerevisiae에놀라제(ENO-1),Saccharomyces cerevisiae3-포스포글리세레이트 키나제,Saccharomyces cere-visiae알파-인자, 및Saccharomyces cerevisiae알콜 탈수소효소/글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(ADH2/GAP)의 유전자로부터 얻어진다.

또한, 제어 서열은 핵산 서열의 3' 말단에 작동가능하게 연결된 서열인 폴리아데닐화 서열일 수 있으며, 이것은 전사되었을 때 전사된 mRNA에 폴리아데노신 잔기를 부가하기 위한 신호로서 숙주 세포에 의해 인식된다. 선택된 숙주 세포에서 기능하는 어떤 폴리아데닐화 서열이 본 발명에 사용될 수 있다.

사상균 숙주 세포에 바람직한 폴리아데닐화 서열은Aspergillus oryzaeTAKA 아밀라제,Aspergillus niger글루코아밀라제,Aspergillus nidulans안트라닐레이트 신타제,Fusarium oxysporum트립신-유사 프로테아제, 및Aspergillus niger알파-글루코시다제의 유전자로부터 얻어진다.

효모 숙주 세포에 유용한 폴리아데닐화 서열은 Guo 및 Sherman, 1995, Mole-cular Cellular Biology 15:5983-5900에 설명된다.

또한, 제어 서열은 폴리펩티드의 아미노 말단에 연결된 아미노산 서열을 코딩하고 세포의 분비 경로로 코드된 폴리펩티드를 향하게 하는 신호 펩티드 코딩 영역일 수 있다. 핵산 서열의 코딩 서열의 5' 단부는 분비된 폴리펩티드를 코드하는 코딩 영역의 세그먼트와 함께 번역 리딩 프레임에 자연적으로 연결된 신호 펩티드 코딩 영역을 고유하게 함유할 수 있다. 또는 달리, 코딩 서열의 5' 단부는 코딩 서열에 고유하지 않은 신호 펩티드 코딩 영역을 함유할 수 있다. 코딩 서열이 신호 펩티드 코딩 영역을 자연적으로 함유하지 않는 경우에 외래 신호 펩티드 코딩 영역이 필요할 수 있다. 또는 달리, 외래 신호 펩티드 코딩 영역은 자연적 신호 펩티드 코딩 영역을 간단하게 대체하여 폴리펩티드의 분비를 증대시킬 수 있다. 그러나, 선택된 숙주 세포의 분비 경로로 발현된 폴리펩티드를 향하게 하는 어떤 신호 펩티드 코딩 영역이 본 발명에 사용될 수 있다.

박테리아 숙주 세포에 효과적인 신호 펩티드 코딩 영역은BacillusNCIB 11837 말토겐 아밀라제,Bacillus stearothermophilus알파-아밀라제,Bacillus licheniformis섭틸리신,Bacillus licheniformis베타-락타마제,Bacillus stear-o thermophilus중성 프로테아제(nprT,nprS,nprM), 및Bacillus subtilis prsA의 유전자로부터 얻어진 신호 펩티드 코딩 영역이다. 더 이상의 신호 펩티드는 Simo-nen 및 Palva, 1993, Microbiological Reviews 57:109-137에 설명된다.

사상균 숙주 세포에 효과적인 신호 펩티드 코딩 영역은Aspergillus oryzaeTAKA 아밀라제,Aspergillus niger중성 아밀라제,Aspergillus niger글루코아밀라제,Rhizomucor miehei아스파르트 프로테이나제,Humicola insolens셀룰라제, 및Humicola lanuginosa리파제의 유전자로부터 얻어진 신호 펩티드 코딩 영역이다.

효모 숙주 세포에 유용한 신호 펩티드는Saccharomyces cerevisiae알파-인자 및Saccharomyces cerevisiae전화효소의 유전자로부터 얻어진다. 다른 유용한 신호 펩티드 코딩 영역은 Romanos 등, 1992(상동)에 설명된다.

또한, 제어 서열은 폴리펩티드의 아미노 말단에 위치한 아미노산 서열을 코딩하는 프로펩티드 코딩 영역일 수 있다. 결과의 폴리펩티드가 선구효소 또는 프로폴리펩티드(또는 어떤 경우에 효소원)으로 공지되어 있다. 프로폴리펩티드는 일반적으로 불활성이며, 프로폴리펩티드로부터 프로펩티드의 촉매적 또는 자가촉매적 절단에 의해 성숙한 활성 폴리펩티드로 전환될 수 있다. 프로펩티드 코딩 영역은Bacillus subtilis알칼리성 프로테아제(aprE),Bacillus subtilis중성 프로테아제(nprT),Saccharomyces cerevisiae알파-인자,Rhizomucor miehei아스파르트 프로테이나제, 및Myceliophthora thermophila락카제(WO 95/33836)의 유전자로부터 얻어질 수 있다.

신호 펩티드 및 프로펩티드 영역이 모두 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하는 경우, 프로펩티드 영역은 폴리펩티드의 아미노 말단 옆에 위치하고, 신호 펩티드 영역은 프로펩티드 영역의 아미노 말단 옆에 위치한다.

또한, 숙주 세포의 성장과 관련하여 폴리펩티드의 발현을 조절하는 조절 서열이 부가되는 것이 바람직할 수 있다. 조절 시스템의 예는, 유전자의 발현이 조절 화합물의 존재를 포함하는 화학적 또는 물리적 자극에 반응하여 켜지거나 꺼지게 하는 것들이다. 원핵생물 시스템에서 조절 시스템은lac,tac, 및trp작동인자 시스템을 포함한다. 효모에서는 ADH2 시스템 또는 GAL1 시스템이 사용될 수 있다. 사상균에서는 TAKA 알파-아밀라제 프로모터,Aspergillus niger글루코아밀라제 프로모터, 및Aspergillus oryzae글루코아밀라제 프로모터가 조절 서열로 사용될 수 있다. 조절 서열의 다른 예는 유전자 증폭을 허용하는 것들이다. 진핵생물 시스템에서, 이것들은 메토트렉세이트의 존재하에서 증폭되는 디히드로폴레이트 환원효소 유전자, 및 중금속을 사용하여 증폭되는 메탈로티오네인 유전자를 포함한다. 이들 경우에, 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열은 조절 서열과 작동가능하게 연결될 것이다.

발현 벡터

또한, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열, 프로모터, 및 전사 및 전사 중지 신호를 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 다양한 핵산 및 상술된 제어 서열을 서로 결합하여 재조합 발현 벡터를 생성할 수 있으며, 이것은 그러한 부위에서 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열의 삽입 또는 치환을 허용하는 하나 이상의 편리한 제한 부위를 포함할 수 있다. 또는 달리, 본 발명의 핵산 서열은 발현을 위한 적합한 벡터에 핵산 서열 또는 이 서열을 포함하는 핵산 구성물을 삽입함으로써 발현될 수 있다. 발현 벡터를 만드는데 있어서, 코딩 서열은 벡터에 위치하게 되고, 이로써 코딩 서열이 발현을 위한 적합한 제어 서열과 작동가능하게 연결된다.

재조합 발현 벡터는 재조합 DNA 과정이 편리하게 행해질 수 있고, 핵산 서열의 발현을 야기할 수 있는 어떤 벡터(예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스)일 수 있다. 벡터의 선택은 전형적으로 벡터와 벡터가 도입될 숙주 세포의 양립성에 의존할 것이다. 벡터는 선형 또는 폐환형 플라스미드일 수 있다.

벡터는 자율 복제 벡터, 즉 염색체외 존재로서 존재하는 벡터일 수 있으며, 이것의 복제는 염색체 복제에 독립적이고, 예를 들어 플라스미드, 염색체외 요소, 미니 염색체 또는 인공 염색체이다. 벡터는 자가-복제를 확보하기 위한 어떤 수

단을 함유할 수 있다. 또는 달리, 벡터는 숙주 세포에 도입되었을 때, 게놈에 통합되어 그것이 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다. 더욱이, 숙주 세포의 게놈에 도입될 총 DNA를 함께 함유하는 단일 벡터 또는 플라스미드 또는 둘 이상의 벡터 또는 플라스미드, 또는 트랜스포존이 사용될 수 있다.

본 발명의 벡터는 바람직하게 형질전환 세포를 용이하게 선택하도록 하는 하나 이상의 선택성 마커를 함유한다. 선택성 마커는 유전자의 생성물이 살생물제 또는 바이러스 내성, 중금속 내성, 영양요구체에 대한 원영양성 등을 제공하는 유전자이다. 박테리아 선택성 마커의 예는Bacillus subtilis또는Bacillus liche-niformis로부터의dal유전자, 또는 암피실린, 가나마이신, 클로르암페니콜 또는 테트라시클린 내성과 같은 항생제 내성을 부여하는 마커이다. 효모 숙주 세포에 적합한 마커는 ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 및 URA3이다. 사상균 숙주 세포에 사용되는 선택성 마커는 이것들에 제한되는 것은 아니지만,amdS(아세트아미다제),argB(오르니틴 카르바모일트랜스페라제),bar(포스피노트리신 아세틸트랜스페라제),hygB(히그로마이신 포스포트랜스페라제),niaD(니트레이트 환원효소),pyrG(오로티딘-5'-포스페이트 디카르복실라제),sC(술페이트 아데닐트랜스페라제),trpC(안트라닐레이트 신타제), 그리고 그것들의 동등물을 포함한다.Aspergillus세포에 사용되는 바람직한 것은Aspergillus nidulans또는Aspergillus oryzae의amdS및pyrG유전자, 및Streptomyces hygroscopicus의bar유전자이다.

본 발명의 벡터는 바람직하게 숙주 세포의 게놈에 벡터의 안정한 통합, 또는 게놈에 독립적인 세포에서 벡터의 자율 복제를 허락하는 요소(들)를 함유한다.

숙주 세포 게놈에 통합되기 위하여, 벡터는 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열, 또는 상동성 또는 비상동성 재조합에 의해 게놈에 벡터를 안정하게 통합시키기 위한 벡터의 어떤 다른 요소에 의지할 수 있다. 또는 달리, 벡터는 숙주 세포 게놈으로의 상동성 재조합에 의한 통합을 지시하는 추가의 핵산 서열을 함유할 수 있다. 추가의 핵산 서열은 벡터가 염색체(들)의 정확한 위치(들)에서 숙주 세포 게놈에 통합되는 것을 가능하게 한다. 정확한 위치에서의 통합 가능성을 증가시키기 위해, 통합 요소는 바람직하게 100 내지 1,500 염기쌍, 바람직하게 400 내지 1,500 염기쌍, 가장 바람직하게 800 내지 1,500 염기쌍과 같이 충분한 수의 핵산을 함유해야 하며, 이것은 상동성 재조합의 확률을 증대시키기 위해 상응하는 표적 서열에 매우 상동성이다. 통합 요소는 숙주 세포의 게놈에 있는 표적 서열과 상동성인 어떤 서열일 수 있다.

더욱이, 통합 요소는 비-코드된 또는 코드된 핵산 서열일 수 있다. 한편, 벡터는 비-상동성 재조합에 의해 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있다.

자율 복제를 위해서, 벡터는 벡터가 해당 숙주 세포에서 자율적으로 복제하는 것을 가능하게 하는 복제 기원을 더 포함할 수 있다. 박테리아 복제 기원의 예는E. coli에서 복제를 허락하는 플라스미드 pBR322, pUC19, pACYC177 및 pACYC 184, 그리고Bacillus에서 복제를 허락하는 pUB110, pE194, pTA1060 및 pAMβ1의 복제 기원이다. 효모 숙주 세포에 사용되는 복제 기원의 예는 2 미크론 복제 기원, ARS1, ARS4, ARS1과 CEN3의 조합, 및 ARS4와 CEN6의 조합이다. 복제 기원은 그것이 숙주 세포에서 온도에 민감하게 기능하게 하는 돌연변이를 가지는 것일 수 있다(예를 들어, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Scienc-es USA 75:1433).

하나 이상의 본 발명 핵산 서열의 카피가 유전자 생성물의 생성을 증가시키기 위해 숙주 세포에 삽입될 수 있다. 핵산 서열의 카피수의 증가는 적어도 하나의 추가적 서열 카피를 숙주 세포 게놈에 통합시킴에 의해 얻어질 수 있거나, 또는 핵산 서열을 갖는 증폭가능한 선택성 마커 유전자를 포함시킴에 의해 얻어질 수 있는데, 이 경우 증폭된 선택성 마커 유전자 카피, 및 그것에 의한 추가적 핵산 서열 카피를 함유하는 세포가 적합한 선택성 제제의 존재하에서 세포를 배양함에 의해 선택될 수 있다.

상술된 요소들을 리게이션하여 본 발명의 재조합 발현 벡터를 구성하는데 사용되는 과정이 당업자에게 잘 공지되어 있다(예를 들어, Sambrook 등, 1989, 상동, 참조)

숙주 세포

또한, 본 발명은 폴리펩티드의 재조합적 제조에 유리하게 사용되는 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 재조합 숙주 세포에 관한 것이다.

본 발명의 핵산 서열을 포함하는 벡터는 숙주 세포에 도입되고, 이로써 벡터는 이미 설명된 바와 같이 염색체 통합체로서 또는 자가-복제 염색체외 벡터로서 유지된다. 숙주 세포의 선택은 폴리펩티드를 코드하는 유전자 및 그것의 공급원에 큰 정도로 의존할 것이다.

숙주 세포는 단세포 미생물, 예를 들어 원핵생물, 또는 비-단세포 미생물, 예를 들어 진핵생물일 수 있다.

유용한 단세포성 세포는 이것들에 제한되는 것은 아니지만,Bacillus세포, 예를 들어Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis 및Bacillus thuringiensis; 또는Streptomyces세포, 예를 들어Streptomyces lividans또는Streptomyces murinus를 포함하는 그램 양성 박테리아, 또는E. coli및Pseudomonas sp.와 같은 그램 음성 박테리아와 같은 박테리아 세포이다. 바람직한 구체예에서, 박테리아 숙주 세포는Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus, 또는Bacillus subtilis세포이다. 또 다른 바람직한 구체예에서,Bacillus세포는 호염기성Bacillus이다.

박테리아 숙주 세포에 벡터의 도입은, 예를 들어 원형질체 형질전환(예를 들어, Chang 및 Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168:111-115 참조), 수용성 세포의 사용(예를 들어, Young 및 Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81:823-829, 또는 Dubnau 및 Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56:209-221 참조), 전기천공(예를 들어, Shigekawa 및 Dower, 1988, Biotechniques 6:742-751 참조), 또는 콘쥬게이션(예를 들어, Koehler 및 Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169:5771-5278 참조)에 의해 행해질 수 있다.

숙주 세포는 포유류, 곤충, 식물 또는 진균 세포와 같은 진핵생물일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 진균 세포이다. 본원에 사용된 바와 같은 " 진균" 은 자낭균(Ascomycota), 담자균(Basidiomycota), 항아리균(Chytridiomycota) 및 접합균(Zygomycota) 문(Hawksworth 등, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi(8판, 1995, CAB 인터내셔날, 유니버시티 프레스, 캠브리지, 영국)에 정의된 바와 같음), 그리고 난균(Oomycota)(Hawksworth 등, 1995, 상동, 171쪽에 인용된 바와 같음) 및 모든 영양포자 진균(Hawksworth 등, 1995, 상동)을 포함한다.

더욱 바람직한 구체예에서, 진균 숙주 세포는 효모 세포이다. 본원에 사용된 바와 같은 " 효모" 는 자낭포자형성효모(Endomycetales), 담자포자형성효모 및 불완전균류에 속하는 효모(Blastomycetes)를 포함한다. 효모의 분류가 장차 변화할 수 있으므로, 본 발명의 목적을 위하여, 효모는 효모의 생물학 및 활성(Skinner, F. A., Passmore, S. M. 및 Davenport, R. R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series NO. 9, 1980)에 설명된 바와 같이 정의되어야 한다.

더욱 더 바람직한 구체예에서, 효모 숙주 세포는Candida, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces,또는Yarrowia세포이다.

가장 바람직한 구체예에서, 효모 숙주 세포는Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces norbensis또는Saccharomyces oviformis세포이다. 다른 가장 바람직한 구체예에서, 효모 숙주 세포는Kluyveromyces lactis세포이다. 또 다른 가장 바람직한 구체예에서, 효모 숙주 세포는Yarrowia lipolytica세포이다.

다른 더 바람직한 구체예에서, 진균 숙주 세포는 사상균 세포이다. " 사상균" 은 진균(Eumycota) 및 난균 아문(Hawksworth 등, 1995(상동)에 정의된 바와 같음)의 모든 사상 형태를 포함한다. 사상균은 키틴, 셀룰로스, 글루칸, 키토산, 만난, 및 다른 복합 다당으로 이루어진 균사체 벽을 특징으로 한다. 영양생장은 균사 신장에 의하며 탄소 이화작용은 절대적으로 호기성이다. 반대로,Saccharomyc-es cerevisiae와 같은 효모에 의한 영양생장은 단세포 엽상체의 출아에 의하며 탄소 이화작용은 발효성일 수 있다.

더욱 더 바람직한 구체예에서, 사상균 숙주 세포는 이것들에 제한되는 것은 아니지만,Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Humicola, Mucor, Myceliophthora, Neurospora, Penicillium, Thielavia, Tolypocladium또는Trichoderma종의 세포이다.

가장 바람직한 구체예에서, 사상균 숙주 세포는Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergill-us niger또는Aspergillus oryzae세포이다. 다른 가장 바람직한 구체예에서, 사상균 숙주 세포는Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwe-llense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Frsarium negundi, Fusaruim oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusaruim sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotr-ichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides또는Fusarium venenatum세포이다. 더욱 가장 바람직한 구체예에서, 사상균 모세포는Fusarium venenatum(Nirenberg sp. nov.) 세포이다. 또 다른 가장 바람직한 구체예에서, 사상균 숙주 세포는Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpruoge-num, Thielavia terrestris, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Tric-hoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei또는Trichoderma viride세포이다.

진균 세포는 원형질체 형성, 원형질체의 형질전환, 및 세포벽의 재생을 수반하는 공지된 방식의 과정에 의해 형질전환될 수 있다.Aspergillus숙주 세포의 형질전환에 적합한 과정은 EP 238 023 및 Yelton 등, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474에 설명된다.Fusarium종의 형질전환에 적합한 방법은 Malardier 등, 1989, Gene 78:147-156 및 WO 96/00787에 설명된다. 효모는 Becker 및 Guarente, In Abelson, J. N. 및 Simon, M. I., 편집자, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 194권, 182-187쪽, 아카데믹 프레스, 아이엔씨, 뉴욕; Ito 등, 1983, Journal of Ba-cteriology 153:163; 및 Hinnen 등, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920에 설명된 과정을 사용하여 형질전환될 수 있다.

제조 방법

또한, 본 발명은 (a)Thermus속으로부터의 균주를 배양하여 폴리펩티드를 포함하는 상청액을 생성하는 단계, 및 (b) 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드의 제조 방법에 관한 것다. 바람직하게, 균주는Thermus rubens종, 더 바람직하게Thermus rubensATCC 31556의 것이다.

또한, 본 발명은 (a) 폴리펩티드의 생성에 도움이 되는 조건하에서 상술된 바와 같은 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (b) 세포 및/또는 배양 배지로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조 방법에서, 세포는 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 폴리펩티드의 제조에 적합한 영양 배지에서 배양된다. 예를 들어, 세포는 쉐이크 플라스크 배양, 실험실 또는 공업적 발효기에서의 소규모 또는 대규모 발효(연속식, 배치식, 페드-배치식, 또는 고체 상태 발효를 포함함)에 의해 배양될 수 있으며, 이것은 적합한 배지 및 폴리펩티드의 발현 및/또는 분리를 허용하는 조건하에서 수행된다. 배양은 탄소 및 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적합한 영양 배지 중에서 행해지며, 본 분야에 공지된 과정을 사용한다. 적합한 배지는 상업적 공급자로부터 입수가능하고, 공개된 조성물(예를 들어, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션의 카탈로그)에 따라서 제조될 수 있다. 폴리펩티드가 영양 배지에 분비된다면, 폴리펩티드는 배지로부터 직접 회수될 수 있다. 폴리펩티드가 분비되지 않는다면, 그것은 세포 용해액으로부터 회수될 수 있다.

폴리펩티드는 본 분야에 공지된 폴리펩티드에 특이적인 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 이들 검출 방법은 특이적 항체의 사용, 효소 생성물의 형성, 또는 효소 기질의 소실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 효소 분석법이 본원에 설명된 바와 같은 폴리펩티드의 활성을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

결과의 폴리펩티드가 본 분야에 공지된 방법에 의해 회수될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 이것들에 제한되는 것은 아니지만, 원심분리, 여과, 추출, 분무건조, 증발, 또는 침전을 포함하는 종래의 과정에 의해 영양 배지로부터 회수될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 이것들에 제한되는 것은 아니지만, 크로마토그래피 (예를 들어, 이온교환, 친화성, 소수성, 크로마토포커싱, 및 크기 배제), 전기영동 과정(예를 들어, 예비 등전 포커싱), 용해성 차이(예를 들어, 황산암모늄 침전), SDS-PAGE, 또는 추출을 포함하는 본 분야에 공지된 여러가지 과정에 의해 정제될 수 있다(예를 들어, Protein Purification, J. -C. Janson 및 Lars Ryden, 편집자, VCH 퍼블리셔, 뉴욕, 1989 참조).

식물

또한, 본 발명은 회수가능한 양의 폴리펩티드를 발현 및 생성하도록 글루코트랜스페라제 활성을 가지는 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열로 형질전환된 트랜스제닉 식물, 식물편 또는 식물 세포에 관한 것이다. 폴리펩티드는 식물 또는 식물편으로부터 회수될 수 있다. 또는 달리, 재조합 폴리펩티드를 함유하는 식물 또는 식물편은 식품 또는 사료의 질을 개선하는데, 예를 들어 영양 가치, 맛 및 유동성을 개선하는데, 또는 항영양성 인자를 파괴하는데 사용될 수 있다.

트랜스제닉 식물은 쌍떡잎식물성(쌍떡잎류) 또는 외떡잎식물성(외떡잎류)일 수 있다. 외떡잎 식물의 예는 초본식물, 예컨대 메도우그래스(블루그래스, 포아), 페스투카와 같은 벼과사료작물, 롤리움, 한지형 목초, 예컨대 아그로스티스, 및 시리얼, 예를 들어 밀, 귀리, 호밀, 보리, 쌀, 수수 및 옥수수(콘)이다.

쌍떡잎 식물의 예는 담배, 콩과식물, 예컨대 루우핀, 감자, 사탕무우, 완두콩, 콩 및 대두, 및 겨자과 식물(Brassicaceae 과), 예컨대 콜리플라워, 평지씨, 및 근친 모델 유기체인Arabidopsis thaliana이다.

식물편의 예는 줄기, 유합조직, 잎, 뿌리, 열매, 씨 및 괴경이다. 또한, 엽록체, 아포플라스트, 미토콘드리아, 액포, 퍼옥시솜 및 세포질과 같은 특수한 식물 조직이 식물편으로 고려된다. 더욱이, 조직 기원이 무엇이든지 어떤 식물 세포가 식물편으로 고려된다.

또한, 그러한 식물, 식물편 및 식물 세포의 자손이 본 발명의 범위내에 포함된다.

본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 트랜스제닉 식물 또는 식물 세포는 본 분야에 공지된 방법에 따라서 구성될 수 있다. 간단히 말해서, 식물 또는 식물 세포는 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 하나 이상의 발현 구성물을 식물 숙주 게놈에 결합시키고, 결과의 변형 식물 또는 식물 세포를 트랜스제닉 식물 또는 식물 세포로 증식시킴에 의해 구성된다.

편리하게, 발현 구성물은 선택된 식물 또는 식물편의 핵산 서열 발현에 필요한 적합한 조절 서열과 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성물이다. 더욱이, 발현 구성물은 발현 구성물이 통합된 숙주 세포 및 해당 식물에 이 구성물을 도입하는데 필요한 DNA 서열을 확인하는데 유용한 선택성 마커를 포함할 수 있다(후자는 사용될 DNA 도입 방법에 의존한다).

프로모터 및 종결인자 서열과 같은 조절 서열 및 선택적으로 신호 또는 운반 서열의 선택은, 예를 들어 폴리펩티드가 언제 어디서 어떻게 발현되는 것이 바람직한가를 토대로 결정된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 유전자의 발현은 구성성 또는 유도성일 수 있거나, 또는 발생, 단계 또는 조직 특이적일 수 있고, 유전자 생성물은 씨 또는 잎과 같은 특수한 조직 또는 식물편을 표적으로 할 수 있다. 조절 서열은, 예를 들어 Tague 등, 1988, Plant Physiolog

y 86:506에 의해 설명된다.

구성성 발현을 위해 35S-CaMV 프로모터가 사용될 수 있다(Franck 등, 1980, Cell 21:285-294). 기관-특이적 프로모터는, 예를 들어 씨, 감자 괴경 및 열매와 같은 저장 수용부 조직(Edwards & Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:275-303), 또는 분열조직과 같은 대사 수용부 조직(Ito 등, 1994, Plant Mol. Biol. 24:863-878)으로부터의 프로모터, 쌀로부터의 글루텔린, 프롤라민, 글로불린 또는 알부민 프로모터와 같은 씨 특이적 프로모터(Wu 등, 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885-889),Vicia faba의 레구민 B4 및 미지의 씨단백질 유전자로부터의Vicia faba프로모터(Conrad 등, 1998, Journal of Plant Physiology 152:708-711), 씨유체 단백질로부터의 프로모터(Chen 등, 1998, Plant and Cell Physiology 39:935-941),Brassica napus로부터의 저장 단백질 napA 프로모터, 또는 예를 들어 WO 91/14772에 설명된 바와 같은, 본 분야에 공지된 어떤 다른 씨 특이적 프로모터일 수 있다. 더욱이, 프로모터는 쌀 또는 토마토로부터의rbcs프로모터(Kyozuka 등, 1993, Plant Physiology 102:991-1000), 클로렐라 바이러스 아데닌 메틸트랜스페라제 유전자 프로모터(Mitra 및 Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26:85-93), 또는 쌀로부터의aldP유전자 프로모터(Kagaya 등, 1995, Molecular and General Genet-ics 248:668-674)와 같은 잎 특이적 프로모터, 또는 감자 pin2 프로모터(Xu 등, 1993, Plant Molecular Biology 22:573-588)와 같은 상처 유도성 프로모터일 수 있다.

또한, 프로모터 인핸서 요소가 식물에서 더 높은 효소 발현을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 프로모터 인핸서 요소는 프로모터와 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한 인트론일 수 있다. 예를 들어, Xu 등(1993, 상동)은 쌀 액틴 1 유전자의 제 1 인트론을 사용한 발현 증대를 개시한다.

선택성 마커 유전자 및 발현 구성물의 어떤 다른 부분은 본 분야에 이용할 수 있는 것들로부터 선택될 수 있다.

핵산 구성물은Agrobacterium-매개 형질전환, 바이러스-매개 형질전환, 미소주사, 입자충격, 바이올리스틱 형질전환, 및 전기천공을 포함하는 본 분야에 공지된 종래의 기술에 따라서 식물 게놈에 결합된다(Gasser 등, 1990, Science 244:1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8:535; Shimamoto 등, 1989, Nature 338:274).

현재,Agrobacterium tumefaciens-매개 유전자 전달이 트랜스제닉 쌍떡잎류을 발생시키기 위해 선택된 방법이다(Hooykas 및 Schilperoort 1992, Plant Molecular Biology 19:15-38 참조). 또한, 이것은 외떡잎류를 형질전환하는 데도 사용될 수 있지만, 일반적으로는 다른 형질전환법이 이들 식물에 바람직하다. 현재, 트랜스제닉 외떡잎류를 생성하기 위해 선택된 방법은 배 유합조직 또는 발생중인 배의 입자 충격(형질전환 DNA로 코팅된 극히 미세한 금 또는 텅스텐 입자)이다 (Christou, 1992, Plant Journal 2:275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5:158-162; Vasil 등., 1992, Bio/Technology 10:667-674). 외떡잎류를 형질전환하는 다른 방법은 Omirulleh 등, 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428에 설명된 원형질체 형질전환을 토대로 한다.

형질전환 후, 발현 구성물이 결합된 형질전환체가 선택되고 본 분야에 잘 공지된 방법에 따라서 전체 식물로 재생된다.

또한, 본 발명은 (a) 폴리펩티드의 생성에 도움이 되는 조건하에서 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 포함하는 트랜스제닉 식물 또는 식물 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드의 제조 방법에 관한 것이다.

물질 및 방법

분자 클로닝 기술은 J. Smabrook, E. F. Fritsch, 및 T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2판, 콜드 스프링 하버, 뉴욕)에 설명된다.

다음의 상업적 플라스미드/벡터가 사용되었다: pT7 Blue(Invitrogen, 네덜란드) 및 pBAD/Myc-HisB(Invitrogen, 네덜란드).

다음의 균주가 형질전환 및 단배질 발현에 사용되었다:E. coliDH12S(GIBCO BRL, Life Technologies, 미국).

완충액 및 기질로서 사용된 화학제품은 적어도 시약 등급의 상업적 제품이다.

글루카노트랜스페라제 활성의 측정

글루카노트랜스페라제 활성이 Takaha 등, in J. Biol. Chem. 268, 1391-1396 (1993)에 설명된 방법의 변형된 버전에 따라서 측정되었다.

기질 용액:

pH 7.0으로 맞춰진 20mM 나트륨 포스페이트에 용해된 1%(w/v) 말토트리오스

활성 측정:

(1) 65℃에서 300㎕ 기질 용액을 예비 인큐베이션한다.

(2) 효소 용액 50㎕를 가하고 65℃에서 10분간 인큐베이션한다.

(3) 0.04N NaOH 50㎕를 가하여 반응을 종결한다.

(4) 용액을 10분간 실온에 방치하여 α- 및 β-아노머가 평형에 이르도록 한다.

(5) 글루코스 비-테스트 키트(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 일본)에 의해 유리된 글루코스의 양을 측정한다.

1 유니트 효소 활성은 상기 조건을 사용하여 분 당 1㎛mol 글루코스를 방출하는 효소의 양으로 정의된다.

실시예

실시예 1

Thermus rubens Thermus rubens글루카노트랜스페라제 유전자 프로브의 제조

프라이머 gt-1 및 gt-5를 다른 공개된 글루카노트랜스페라제 유전자를 토대로 디자인하여,Thermus rubens로부터의 게놈 DNA를 사용하는 중합효소 연쇄반응 (PCR)에 사용했다:

Solanum tuberosum, 기탁 번호(AC) q06801: J. Biol. Chem. 268, 1391-1396 (1993); Clostridium Butyricum NCIMB7423, AC 137384: Microbiology 143(10), 3287-3294(1997); Escherichia coli K-12, AC p15977: Mol. Microbiol. 2, 473-479 (1988); Homo sapiens, AC p35573: J. Biol. Chem. 267, 9294-9299(1992); Haemop-hilus influenzae, AC p45176: Science 269, 496-512(1995); Streptococcus pneum-oniae, AC p29851: Cell 31, 327-336(1982); Synechocystis SP. AC p72785: DNA Res. 3, 109-136(1996); Thermus aquaticus, AC AB016244: Appl. Environ. Microb-iol. 65, 910-915(1999); 및 Borrelia Burgdorferi, AC AE001127: Nature 390, 580-586(1997).

PCR 프라이머:

gt-1: 5'-GGI GAY ATI CCI ATH TAY RTI GS-3'

gt-5: 5'-RTT RTC RTG IGT ICC IGT RTA-3'

I = 이노신

R = A 또는 G

Y = C 또는 T

H = A 또는 T 또는 C

S = G 또는 C

PCR은 다음 조건하에서 수행했다:

70μℓ H_2O

10μℓ 10x 반응 완충액

15μℓ 25mM $MgCl_2$

2μℓTaq중합효소(Boehlinger)

2μℓ 25mM dNTP

1μℓ 주형(> 1μg)

단계 1: 94℃ 75초

단계 2: 94℃ 45초

단계 3: 52℃ 45초

단계 4: 72℃ 90초

(단계 2-4: 31 사이클)

단계 5: 72℃ 180초

PCR 반응 혼합물을 아가로스겔 상에서 분리하고, 증폭된 PCR 단편의 예상 크기를 다른 공개된 서열 데이타(바로 위의 참고문헌 참조)로부터 계산한 결과 약 600bp였다. 이들 단편을 SuprecTM-01(TAKARA)로 겔-정제한 후, Takara 리게이션 키트 ver. 2를 사용하여 pT7Blue 벡터에 리게이션했다. 리게이션 혼합물을 전기천공에 의해E. coliDH12S로 형질전환했다. 얻어진 형질전환체로부터의 플라스미드를 제한 효소 소화에 의해 조사하여,Thermus rubens글루카노트랜스페라제 삽입체의 크기를 확인했다.

실시예 2

Thermus rubens Thermus rubens글루카노트랜스페라제 유전자의 클로닝

Thermus rubens글루카노트랜스페라제 프로브로서 삽입된 단편을 사용하여, 서든 혼성화를Thermus rubens로부터의 소화된 게놈 DNA에서 수행하여 서브클론을 생성하는데 편리한 제한 효소를 선택했다. 1.8kb의 혼성화된KpnI 및SacII 단편 및 1.6kb의 혼성화된ScaI 및Kpn단편을 글루카노트랜스페라제 유전자 서브클론에 대해 선택했다.Thermus rubens게놈 DNA를 각각KpnI-SacII 및ScaI-KpnII로 소화시켰다. 다음에, 이들 두 분획된 단편을 아가로스겔로부터 잘라내고 pBluescript SD(-)로 클론했다. 이들 두 라이브러리를E. coliDH12S 세포로 리게이션된 클론을 형질전환하여 만들었다. 콜로니 리프트를 Hybond-N^+ 멤브레인(Amersham Pharmacia Biotech, 일본)을 사용하여 이들 두 라이브러리의 형질전환체에서 수행한 후 DIG-표지 프로브에 혼성화했다. 양성 콜로니를 채집하고 삽입체를 PCR에 의해 조사했다. 선택된 콜로니로부터의 플라스미드를 제조하여 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer에 의해 서열화했다.

실시예 3

발현 벡터의 구성

각각NcoI 및XbaI 제한 효소 부위를 포함하는 프라이머 ruben-Nco 및 ruben-Xba를 사용하여 전체 글루카노트랜스페라제 유전자를Thermus rubens게놈 DNA로부터 증폭했다.NcoI 및XbaI로 PCR-증폭 단편을 자르는 것은NcoI 및XbaI로 소화된 pBAD/Myc-His A 벡터로의 직접적인 클로닝을 허용했다. 결과의 벡터 pFuku-ruben(도 1에 나타냄)는 TOP10E. coli에서의 형질전환 및 아라비노스를 사용한 유도 후 본 발명의 폴리펩티드를 생성했다.

프라이머:

ruben-Nco:Thermus rubens글루카노트랜스페라제 유전자 증폭용 PCR 프라이머(포워드). 밑줄친 뉴클레오티드가 Nco I 부위를 도입한다.

5'-GCCCCATGGAACTCCAACGCGCTTTTG-3'

ruben-Xba:Thermus rubens글루카노트랜스페라제 유전자 증폭용 PCR 프라이머(리버스). 밑줄친 뉴클레오티드가 Xba I 부위를 도입한다.

5'-GCGTCTAGATCAAGCGCGCTGGCTGGCCTC-3'

또한, 완전한Thermus rubens글루카노트랜스페라제 코드 뉴클레오티드 서열을 가지는 pBAD/Myc-HisB를 도이체 삼룬그 본 미크로오르가니스멘 운트 젤쿨툴렌 게엠베하에 DSM 13049로서 기탁된E. coliDH12S에서 형질전환했다(하기 참조).

실시예 4

본 발명의 폴리펩티드의 발현

Thermus rubens글루카노트랜스페라제를 pFuku-ruben으로 형질전환된 TOP10E. coli균주에서 이종성으로 발현했다.E. coli세포를 28℃에서 100μg/ml 암피실린을 가지는 SB 배지중에서 하룻밤 인큐베이션했다. 다음에, 발현을 유도하기 위해 0.1% 아라비노스를 가했다. 세포를 원심분리에 의해 스핀다운시키고, 20mM 포스페이트 완충액(pH 6.0)에 재현탁했다. 완충액의 양은 1/20의 성장 배지에 상응했다. 다음에, 세포를 초음파처리하고, 잔해를 원심분리에 의해 제거했다.

실시예 5

pH 프로파일

세포 추출물을 10분간 70℃에서 예열하고, 잔해를 제거한 후, 전처리된 세포 추출물을 상술된 바와 같이 65℃에서 글루카노트랜스페라제 활성에 대해 분석했다. 두가지 다른 완충액을 기질 용액의 제조에 사용했다:

4.5≤pH≤6.0: 나트륨 아세테이트 완충액

5.5≤pH≤8.5: 나트륨 포스페이트 완충액

도 2에 나타낸 그래프로부터 분명한 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드의 최적 pH는 6.5에서 7.5 범위내이다.

실시예 6

온도 프로파일

효소의 온도 프로파일을 측정하기 위해서, 세포 추출물을 10분간 70℃에서 예열하고, 잔해를 제거한 후, 전처리된 세포 추출물을 상술된 바와 같이 pH 7.0에서 30-75℃의 온도 간격으로 글루카노트랜스페라제 활성에 대해 분석했다. 도 3에 나타낸 그래프로부터 분명한 바와 같이, 효소의 최적 온도는 50℃에서 70℃ 범위내이다.

실시예 7

열안정성

효소의 열안정성을 측정하기 위해서, 세포 추출물을 10분간 50-70℃의 간격으로 다양한 온도에서 예열하고, 잔해를 제거한 후, 상술된 바와 같이 65℃에서 글루카노트랜스페라제 활성에 대해 분석했다. 도 4에 나타낸 그래프로부터 분명한 바와 같이, 효소는 70℃에서 안정하고, 이후 효소의 안정성은 극적으로 감소된다.

생물학적 물질의 기탁

다음의 생물학적 물질을 도이체 삼룬그 본 미크로오르가니스멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(독일 디-38124 브라운츠베이그 마체로데르 베그 1베)에 부다페스트 조약에 의거하여 기탁했고, 다음의 기탁 번호가 주어졌다.

[표 1]

기탁물	기탁 번호	기탁일
E. coliDH12S pFuku-Ruben	DSM 13049	1999, 09, 20

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열과 적어도 65% 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드;

(b) 낮은 긴축도 조건하에서

(i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는

(ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열

과 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코드되는 폴리펩티드;

(c) (a) 또는 (b)의 대립형질 변이체;

(d)Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제에 의해 코드되는 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드와 적어도 65% 동일한 그것의 변이체; 및

(e) 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 상기 폴리펩티드의 단편

으로 구성되는 군으로부터 선택된, 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 분리된 폴리펩티드.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 폴리펩티드가Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제에 의해 코드되는 폴리펩티드와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 중간 긴축도 조건, 바람직하게 높은 긴축도 조건하에서

(i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는

(ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열

과 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코드되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 폴리펩티드가 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함하는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 변이체인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 활성이 20mM 포스페이트 완충액 pH 7.0 중에서 10분간 65℃에서 인큐베이션한 후 폴리펩티드의 활성에 대해 상대적으로 측정된 때, 20mM 포스페이트 완충액 pH 7.0 중에서 10분간 67℃에서, 바람직하게 70℃에서 인큐베이션한 후 적어도 75%의 활성을 보유하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 20mM 포스페이트 완충액 pH 7.0 중에서 10분간 67℃에서, 바람직하게 70℃에서 인큐베이션한 후 적어도 80%, 예컨대 85%, 바람직하게 적어도 90%, 예컨대 95%, 특히 실질적으로 전활성을 보유하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 기질이 α-글루칸인 때, 분자내 글리코실전달 반응에 의해 고리 글루칸을 생성할 수 있는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 11.

제 1 항에 있어서,Thermus속, 바람직하게Thermus rubens종으로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 12.

제 11 항에 있어서,Thermus rubensATCC 31556으로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 13.

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 글루카노트랜스페라제 활성의 적어도 20%를 가지는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 501로서 나타낸 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드의 글루카노트랜스페라제 활성의 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예를 들어 적어도 50%, 바람직하게 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%를 가지는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 15.

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드를 코드하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 서열.

청구항 16.

(a) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열;

(b) 낮은 긴축도 조건하에서

(i) SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 1 내지 1503으로서 나타낸 핵산 서열의 상보성 가닥, 또는

(ii) 적어도 100개 뉴클레오티드의 (i)의 하위서열

과 혼성화하는 핵산 서열;

(c) (a) 또는 (b)의 대립형질 변이체;

(d)Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제, 또는 상기 DNA 서열에 적어도 70% 동일한 그것의 변이체; 및

(e) 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드 단편을 코드하는 (a), (b), (c) 또는 (d)의 하위서열

로 구성되는 군으로부터 선택된, 글루카노트랜스페라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코드하는 분리된 핵산 서열.

청구항 17.

제 16 항에 있어서, SEQ ID NO:1의 아미노산 1 내지 1503으로서 나타낸 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 서열.

청구항 18.

제 16 항에 있어서,Escherichia coliDSM 13049에 존재하는 플라스미드로 클론된 DNA 서열의 일부를 코드하는 글루카노트랜스페라제에 의해 코드되는 폴리펩티드와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 서열.

청구항 19.

적합한 발현 숙주에서 폴리펩티드의 발현을 지시할 수 있는 하나 이상의 제어 서열에 작동가능하게 연결된 제 15 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 핵산 서열을 포함하는 핵산 구성물.

청구항 20.

제 19 항의 핵산 구성물, 프로모터, 및 전사 및 전사 중지 신호를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 21.

제 19 항의 핵산 구성물을 포함하는 재조합 숙주 세포.

청구항 22.

(a)Thermus속, 바람직하게Thermus rubens종, 예컨대Thermus rubensATCC 31556로부터의 균주를 배양하여 폴리펩티드를 포함하는 상청액을 생성하는 단계; 및

(b) 폴리펩티드를 회수하는 단계

를 포함하는, 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 23.

(a) 폴리펩티드의 생성에 도움이 되는 조건하에서 제 21 항에 규정된 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 폴리펩티드를 회수하는 단계

를 포함하는, 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 24.

식품 제조를 위한 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드의 사용.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 식품이 일본식 디저트, 스넥, 밀제품, 국수, 겨자피, 슈마이피, 가공 해산물, 냉동 또는 냉장 가공 식품, 이유식, 유아식, 애완동물 사료, 동물 사료, 드링크, 운동식 및 영양보충식으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 사용.

청구항 26.

가열에 의해 조리하기 전 또는 가열에 의해 조리한 후 즉시 식품 재료에 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드를 첨가하는 것을 포함하는 식품 제조 방법으로서, 여기에서 폴리펩티드가 식품 재료에 있는 녹말에 대해 작용하여 고리 글루칸을 생성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제 26 항에 있어서, 식품이 일본식 디저트, 스넥, 밀제품, 국수, 겨자피, 슈마이피, 가공 해산물, 냉동 또는 냉장 가공 식품, 이유식, 유아식, 애완동물 사료, 동물 사료, 드링크, 운동식 및 영양보충식으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드를 포함하는 클리닝 또는 세제 조성물.

청구항 29.

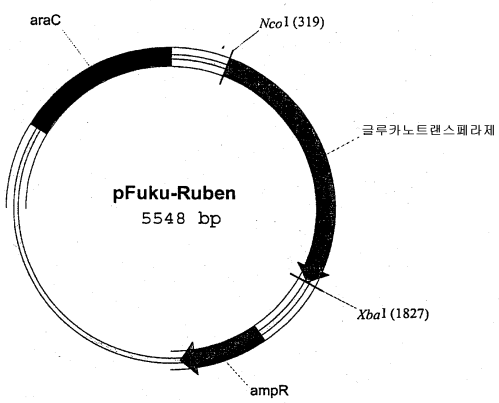
녹말 오염의 제거, 특히 아밀로스 오염의 제거를 위한 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드의 사용.

청구항 30.

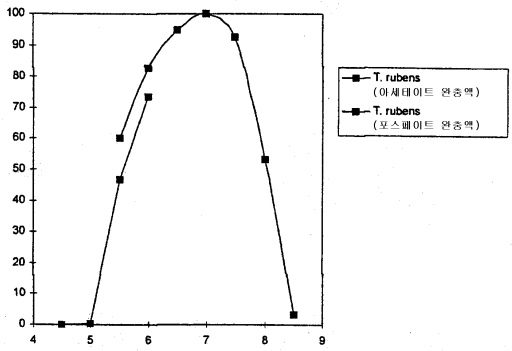
아밀로스 오염-함유 단단한 표면 또는 아밀로스 오염-함유 세탁물을 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 규정된 폴리펩티드 또는 제 28 항에 규정된 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 단단한 표면 또는 세탁물로부터 녹말 오염, 특히 아밀로스 오염을 제거하는 방법.

도면

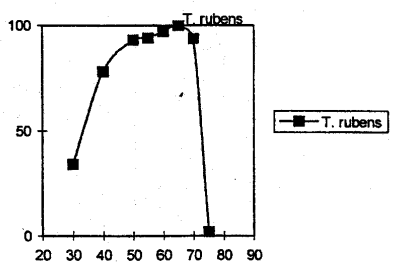
도면 1



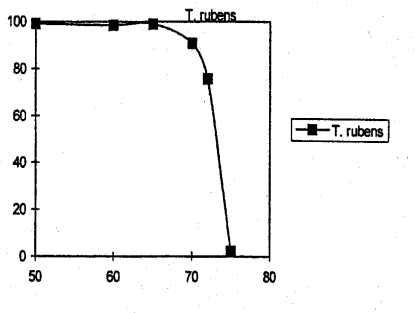
도면 2



도면 3



도면 4



<110> Novo Nordisk A/S
<120> Polypeptides having glucanotransferase activity and
nucleic acids encoding same
<130> 6012.204-WO
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1503
<212> DNA
<213> Thermus rubens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1503)
<400> 1

```
atg caa ctc caa cgc gct ttt gga att ttg ctc cac ccc acc agt ttt   48
Met Gln Leu Gln Arg Ala Phe Gly Ile Leu Leu His Pro Thr Ser Phe
  1               5                  10                  15
ccg ggt cgc tgg ggg att ggg gct ctg ggc cgc gag gcc gag cgg ttt   96
Pro Gly Arg Trp Gly Ile Gly Ala Leu Gly Arg Glu Ala Glu Arg Phe
             20                  25                  30
ttg gac tgg ctg gcc gat gcg gga gcc cgc tgg tgg cag gtc tta ccg   144
Leu Asp Trp Leu Ala Asp Ala Gly Ala Arg Trp Trp Gln Val Leu Pro
         35                  40                  45
ctg ggc cct acc agt tac ggc gac tcg ccg tac cag tcc ttc tcg gct   192
Leu Gly Pro Thr Ser Tyr Gly Asp Ser Pro Tyr Gln Ser Phe Ser Ala
     50                  55                  60
ttt gcc ggt aac ccg tat ttg gtt gac ccc gag atg ctg att gaa aaa   240
Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Val Asp Pro Glu Met Leu Ile Glu Lys
 65                  70                  75                  80
ggc tgg ctg gaa caa agc gaa gcg ccc ccg ccg tat ccg acc cag cgc   288
Gly Trp Leu Glu Gln Ser Glu Ala Pro Pro Pro Tyr Pro Thr Gln Arg
                 85                  90                  95
gtg gat tat ggc tgg ctt tac cag acc cgc tgg ccc ctg ttg cgg cgg   336
Val Asp Tyr Gly Trp Leu Tyr Gln Thr Arg Trp Pro Leu Leu Arg Arg
```

```
            100                 105                 110
gct ttc gcg ggg ttt cgg gca agg gct tcg gcc cag gat aag acc cga   384
Ala Phe Ala Gly Phe Arg Ala Arg Ala Ser Ala Gln Asp Lys Thr Arg
        115                 120                 125
ctg gaa gcc ttt atc gag gcc gag cgc ttc tgg ctg gaa gac tat gcg   432
Leu Glu Ala Phe Ile Glu Ala Glu Arg Phe Trp Leu Glu Asp Tyr Ala
    130                 135                 140
ctc ttt atg gcc ctc aag acc cgg ttt gac ggc aag ccc tgg aac gag   480
Leu Phe Met Ala Leu Lys Thr Arg Phe Asp Gly Lys Pro Trp Asn Glu
145                 150                 155                 160
tgg agc ccc gag ctg cgc gac cgt gaa ccg gct gcc ctg gcc agg gcc   528
Trp Ser Pro Glu Leu Arg Asp Arg Glu Pro Ala Ala Leu Ala Arg Ala
                165                 170                 175
cgt gag gag ctg gcc gag gag gtg gcc ctt tac gag tgg att cag tgg   576
Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Val Ala Leu Tyr Glu Trp Ile Gln Trp
            180                 185                 190
ctt ttt tat ctg gaa tgg ggc cag acc aag gcc tat gcc gaa tcc aag   624
Leu Phe Tyr Leu Glu Trp Gly Gln Thr Lys Ala Tyr Ala Glu Ser Lys
        195                 200                 205
ggg att cag att atc ggc gat atg ccc atc ttt gtg gcc ttc gat tcc   672
Gly Ile Gln Ile Ile Gly Asp Met Pro Ile Phe Val Ala Phe Asp Ser
    210                 215                 220
tca gat gtc tgg gcc aac ccg cag tac ttc tac ctc gag gcc gat ggc   720
Ser Asp Val Trp Ala Asn Pro Gln Tyr Phe Tyr Leu Glu Ala Asp Gly
225                 230                 235                 240
aac ccc acg gtg gtg gcg ggc gtt ccg cgg gac tac ttc tcc gaa acc   768
Asn Pro Thr Val Val Ala Gly Val Pro Arg Asp Tyr Phe Ser Glu Thr
                245                 250                 255
ggc cag ctc tgg ggc aat ccg ctc tat cgc tgg gat gtg atg gaa agg   816
Gly Gln Leu Trp Gly Asn Pro Leu Tyr Arg Trp Asp Val Met Glu Arg
            260                 265                 270
gac aac ttt gcc tgg tgc att gcc cgc ata agg cag tcg ctc aag cag   864
Asp Asn Phe Ala Trp Cys Ile Ala Arg Ile Arg Gln Ser Leu Lys Gln
        275                 280                 285
tgc cac ctg gtg cgc atc gac cac ttc cgc ggg ttt gaa gcc tac tgg   912
Cys His Leu Val Arg Ile Asp His Phe Arg Gly Phe Glu Ala Tyr Trp
    290                 295                 300
gag gtt ccg ttt ggc cgg ccc aat gct gtg gag ggg cgc tgg gtc aaa   960
Glu Val Pro Phe Gly Arg Pro Asn Ala Val Glu Gly Arg Trp Val Lys
305                 310                 315                 320
gcc cca ggg gag aag ctg ttt gct gcg gtg cgg gcc caa ctg agc gat   1008
Ala Pro Gly Glu Lys Leu Phe Ala Ala Val Arg Ala Gln Leu Ser Asp
                325                 330                 335
gcg ccc atc att gcc gaa gac ctg ggg gtg atc acc ccc gag gtg gag   1056
Ala Pro Ile Ile Ala Glu Asp Leu Gly Val Ile Thr Pro Glu Val Glu
            340                 345                 350
gct ttg cgc gat ggc ttc ggg ttc ccc ggc atg aag att ttg cag ttt   1104
Ala Leu Arg Asp Gly Phe Gly Phe Pro Gly Met Lys Ile Leu Gln Phe
        355                 360                 365
gct ttt tcc ggt gag gac aac gcc ttt ttg ccc cac aac tac ccc gcg   1152
```

```
Ala Phe Ser Gly Glu Asp Asn Ala Phe Leu Pro His Asn Tyr Pro Ala
    370                 375                 380
cac ggc aat gtg gtg gtg tac agc gga acc cac gac aac gac acc acc   1200
His Gly Asn Val Val Val Tyr Ser Gly Thr His Asp Asn Asp Thr Thr
385                 390                 395                 400
ctg gga tgg ttc cgc acc gcg ccg gag gcc gag cgg gcc ttc atg cgg   1248
Leu Gly Trp Phe Arg Thr Ala Pro Glu Ala Glu Arg Ala Phe Met Arg
                405                 410                 415
gcc tac ctg gcc cgc tat ggc atc cgt tgt ttg tcg gaa tac gag gtc   1296
Ala Tyr Leu Ala Arg Tyr Gly Ile Arg Cys Leu Ser Glu Tyr Glu Val
            420                 425                 430
gcg ggc gct ttg atc gag ctg gcc ttc aaa agc ccg gcc aag ctg gct   1344
Ala Gly Ala Leu Ile Glu Leu Ala Phe Lys Ser Pro Ala Lys Leu Ala
        435                 440                 445
att gtg cct ttg cag gac gtg ctg ggg ctg ggc ccc gag gcc cgc atg   1392
Ile Val Pro Leu Gln Asp Val Leu Gly Leu Gly Pro Glu Ala Arg Met
    450                 455                 460
aac ttc ccc gga cgg ctg ggg gac aac tgg gcg tgg cgc tac gcc gaa   1440
Asn Phe Pro Gly Arg Leu Gly Asp Asn Trp Ala Trp Arg Tyr Ala Glu
465                 470                 475                 480
ggc gac ctc gag ccc ggt ctg gcc gcg gga ctg cgg gcc ctg gcc gag   1488
Gly Asp Leu Glu Pro Gly Leu Ala Ala Gly Leu Arg Ala Leu Ala Glu
                485                 490                 495
gcc agc cag cgc gct                                               1503
Ala Ser Gln Arg Ala
            500
<210> 2
<211> 501
<212> PRT
<213> Thermus rubens
<400> 2
Met Gln Leu Gln Arg Ala Phe Gly Ile Leu Leu His Pro Thr Ser Phe
  1               5                  10                  15
Pro Gly Arg Trp Gly Ile Gly Ala Leu Gly Arg Glu Ala Glu Arg Phe
             20                  25                  30
Leu Asp Trp Leu Ala Asp Ala Gly Ala Arg Trp Trp Gln Val Leu Pro
         35                  40                  45
Leu Gly Pro Thr Ser Tyr Gly Asp Ser Pro Tyr Gln Ser Phe Ser Ala
     50                  55                  60
Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Val Asp Pro Glu Met Leu Ile Glu Lys
 65                  70                  75                  80
Gly Trp Leu Glu Gln Ser Glu Ala Pro Pro Pro Tyr Pro Thr Gln Arg
                 85                  90                  95
Val Asp Tyr Gly Trp Leu Tyr Gln Thr Arg Trp Pro Leu Leu Arg Arg
            100                 105                 110
Ala Phe Ala Gly Phe Arg Ala Arg Ala Ser Ala Gln Asp Lys Thr Arg
        115                 120                 125
Leu Glu Ala Phe Ile Glu Ala Glu Arg Phe Trp Leu Glu Asp Tyr Ala
    130                 135                 140
Leu Phe Met Ala Leu Lys Thr Arg Phe Asp Gly Lys Pro Trp Asn Glu
```

```
145                 150                 155                 160
Trp Ser Pro Glu Leu Arg Asp Arg Glu Pro Ala Ala Leu Ala Arg Ala
                165                 170                 175
Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Val Ala Leu Tyr Glu Trp Ile Gln Trp
            180                 185                 190
Leu Phe Tyr Leu Glu Trp Gly Gln Thr Lys Ala Tyr Ala Glu Ser Lys
        195                 200                 205
Gly Ile Gln Ile Ile Gly Asp Met Pro Ile Phe Val Ala Phe Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Asp Val Trp Ala Asn Pro Gln Tyr Phe Tyr Leu Glu Ala Asp Gly
225                 230                 235                 240
Asn Pro Thr Val Val Ala Gly Val Pro Arg Asp Tyr Phe Ser Glu Thr
                245                 250                 255
Gly Gln Leu Trp Gly Asn Pro Leu Tyr Arg Trp Asp Val Met Glu Arg
            260                 265                 270
Asp Asn Phe Ala Trp Cys Ile Ala Arg Ile Arg Gln Ser Leu Lys Gln
        275                 280                 285
Cys His Leu Val Arg Ile Asp His Phe Arg Gly Phe Glu Ala Tyr Trp
    290                 295                 300
Glu Val Pro Phe Gly Arg Pro Asn Ala Val Glu Gly Arg Trp Val Lys
305                 310                 315                 320
Ala Pro Gly Glu Lys Leu Phe Ala Ala Val Arg Ala Gln Leu Ser Asp
                325                 330                 335
Ala Pro Ile Ile Ala Glu Asp Leu Gly Val Ile Thr Pro Glu Val Glu
            340                 345                 350
Ala Leu Arg Asp Gly Phe Gly Phe Pro Gly Met Lys Ile Leu Gln Phe
        355                 360                 365
Ala Phe Ser Gly Glu Asp Asn Ala Phe Leu Pro His Asn Tyr Pro Ala
    370                 375                 380
His Gly Asn Val Val Val Tyr Ser Gly Thr His Asp Asn Asp Thr Thr
385                 390                 395                 400
Leu Gly Trp Phe Arg Thr Ala Pro Glu Ala Glu Arg Ala Phe Met Arg
                405                 410                 415
Ala Tyr Leu Ala Arg Tyr Gly Ile Arg Cys Leu Ser Glu Tyr Glu Val
            420                 425                 430
Ala Gly Ala Leu Ile Glu Leu Ala Phe Lys Ser Pro Ala Lys Leu Ala
        435                 440                 445
Ile Val Pro Leu Gln Asp Val Leu Gly Leu Gly Pro Glu Ala Arg Met
    450                 455                 460
Asn Phe Pro Gly Arg Leu Gly Asp Asn Trp Ala Trp Arg Tyr Ala Glu
465                 470                 475                 480
Gly Asp Leu Glu Pro Gly Leu Ala Ala Gly Leu Arg Ala Leu Ala Glu
                485                 490                 495
Ala Ser Gln Arg Ala
            500
```