



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C12P 13/12 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 9/1085 (2006.01); C12P 11/00 (2006.01); C12P 13/02 (2006.01); C12P 13/12 (2006.01); C12P 19/40 (2006.01); C12P 21/02 (2006.01); C12Y 205/01048 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015119400, 25.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.10.2013

Дата регистрации:
17.04.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
26.10.2012 EP 12190150.8

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2016 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 17.04.2018 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 26.05.2015

(86) Заявка РСТ:
EP 2013/072380 (25.10.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/064244 (01.05.2014)

Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнёры"

(72) Автор(ы):

МЕРКАММ Мюриэль (FR),
ЛУИ Доминик (FR),
ЖАЙАРДОН Карин (FR),
ТОМА Доминик (FR),
МАРЛЬЕР ФИЛИПП (BE)

(73) Патентообладатель(и):

АДИССЕО ФРАНС С.А.С. (FR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 1993/017112 A1, 02.09.1993. база
данных GenBank: AAF74981.1, 10.06.2000. база
данных UniProtKB/Swiss-Prot: P55217.3,
03.10.2012. RU 2447146 C2, 10.04.2012.
PAKULA A.A. ET AL. Genetic analysis of
protein stability and function.// Annu. Rev.
Genet. 1989. 23:289-310, см. с. 305-306.

(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ L-МЕТИОНИНА ИЗ О-ФОСФО-L-ГОМОСЕРИНА И МЕТАНТИОЛА

(57) Реферат:

Предложен способ получения L-метионина, в котором О-фосфо-L-гомосерин (OPHS) и метантиол ферментативно превращают в L-метионин и H₃PO₄ согласно схеме реакции: О-фосфо-L-гомосерин + CH₃-SH <=> L-метионин + H₃PO₄. Указанное ферментативное превращение достигают путем использования OPHS-зависимой метионинсинтазы, представляющей собой белок, полученный из цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) в результате мутации. При этом OPHS-зависимая метионинсинтаза представляет собой

белок, выбранный из группы, состоящей из (a) белка, содержащего любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29; (b) белка, имеющего последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% любой из SEQ ID NO: от 6 до 29, и обладающего ферментативной активностью превращения OPHS и метантиола в L-метионин и H₃PO₄. Предложено также применение белка, обладающего ферментативной активностью превращения OPHS и метантиола в L-метионин и H₃PO₄, для

превращения OPHS и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 . С использованием способа получения L-метионина осуществляют получение S-аденозилметионина, получение цистеина, получение глутатиона, а также получение 2-оксо-

4-метилтиобутаноата. Группа изобретений позволяет эффективно превращать OPHS + $\text{CH}_7\text{-SH}$ в L-метионин. 6 н. и 2 з.п. ф-лы, 7 ил., 3 табл., 6 пр.

R U 2 6 5 0 8 5 9 C 2

R U 2 6 5 0 8 5 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12P 13/12 (2006.01)*C12N 9/10* (2006.01)*C12N 15/09* (2006.01)*C12N 15/54* (2006.01)*C12N 15/64* (2006.01)*C12P 21/02* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 9/1085 (2006.01); *C12P 11/00* (2006.01); *C12P 13/02* (2006.01); *C12P 13/12* (2006.01); *C12P 19/40* (2006.01); *C12P 21/02* (2006.01); *C12Y 205/01048* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015119400, 25.10.2013**

(24) Effective date for property rights:
25.10.2013

Registration date:
17.04.2018

Priority:

(30) Convention priority:
26.10.2012 EP 12190150.8

(43) Application published: **20.12.2016** Bull. № 35(45) Date of publication: **17.04.2018** Bull. № 11(85) Commencement of national phase: **26.05.2015**

(86) PCT application:
EP 2013/072380 (25.10.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/064244 (01.05.2014)

Mail address:
**191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i
partnery"**

(72) Inventor(s):

**MERKAMM Myuriel (FR),
LUI Dominik (FR),
ZHAJARDON Karin (FR),
TOMA Dominik (FR),
MARLER FILIPP (BE)**

(73) Proprietor(s):

ADISSEO FRANS S.A.S. (FR)(54) **METHOD FOR ENZYMATIC PRODUCTION OF L-METHIONINE FROM O-PHOSPHO-L-HOMOSERINE AND METHANETHIOL**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method for the preparation of L-methionine in which O-phospho-L-homoserine (OPHS) and methanethiol are enzymatically converted to L-methionine and H₃PO₄ according to the reaction scheme: O-phospho-L-homoserine + CH₃-SH $\rightleftharpoons$ L-methionine + H₃PO₄. This enzymatic conversion is achieved by using OPHS-dependent methionine synthase, which is a protein obtained from cystathionine-gamma synthase (CF 2.5.1.48) as a result of a mutation. OPHS-dependent methionine synthase is a protein selected from the group consisting of (a) a

protein comprising any of the amino acid sequences SEQ ID NO: 6 to 29; (b) a protein having a sequence identical to at least 90% of any one of SEQ ID NOs: 6 to 29, and having enzymatic activity of converting OPHS and methanethiol to L-methionine and H₃PO₄. Also disclosed is the use a protein having enzymatic activity of converting OPHS and methanethiol to L-methionine and H₃PO₄, for converting OPHS and methanethiol to L-methionine and H₃PO₄. Use of the method of producing L-methionine enables to produce S-adenosyl methionine, cysteine, glutathione, as well as 2-oxo-4-methylthiobutanoate.

EFFECT: group of inventions enables to efficiently
convert OPHS + CH₇-SH into L-methionine.

8 cl, 7 dwg, 3 tbl, 6 ex

R U 2 6 5 0 8 5 9 C 2

R U 2 6 5 0 8 5 9 C 2

Настоящее изобретение относится к способу получения L-метионина, в котором О-фосфо-L-гомосерин и метантиол ферментативно превращают в L-метионин и H_3PO_4 . Такого превращения достигают путем воздействия фермента О-фосфо-L-гомосерин (ОНФС)-зависимой метионинсинтазы. Настоящее изобретение также относится к О-фосфо-L-гомосерин-зависимым метионинсинтазам, т.е. белкам, которые способны ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Настоящее изобретение также относится к микроорганизмам, генетически модифицированным таким образом, чтобы производить L-метионин из О-фосфо-L-гомосерина и метантиола.

Описанные ферменты и процессы также могут быть с успехом использованы для синтеза производных метионина, таких как S-аденозилметионин, глутатион, цистеин, S-аденозилгомоцистеин и метилтиоаденозин. Настоящее изобретение также относится к методам скрининга ферментов, катализирующих превращение О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 .

L-метионин является незаменимой аминокислотой, образующейся в ходе метаболизма, при превращении L-аспартата, путем активации, в L-аспартил фосфат с последующим восстановлением до полуальдегида L-аспартата и L-гомосерина. У бактерий, также как и у грибов, L-гомосерин подвергается О-ацетилированию с образованием или сукцинила, или ацетильного эфира, который, сам по себе, подвергается конденсации серы, или непосредственно с сульфидом (SH_2) с образованием L-гомоцистеина, или опосредованно с L-цистеином с образованием L-цистатинина и его дальнейшей конверсией в гомоцистеин. Метилирование гомоцистеина происходит с помощью метилтетрагидрофолата, с образованием L-метионина.

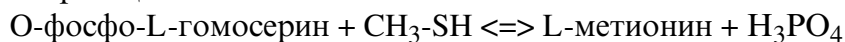
В растениях, L-гомосериновый эфир, используемый в качестве предшественника цистатинина, представляет собой О-фосфо-L-гомосерин. Цистатинин затем превращается в гомоцистеин под действием цистатинин бета-лиазы. Метилирование гомоцистеина затем приводит к образованию метионина. О-фосфо-L-гомосерин также образуется в ходе метаболизма в клетках бактерий, растений, грибов и млекопитающих, как прямой предшественник L-треонина, при участии пиридоксальфосфата треонинсинтазы (КФ (код фермента) 4.2.3.1). У растений существует жесткое регулирование потока углерода в метионин и треонин в О-фосфо-L-гомосерин точке перехода (Amir et al., *TRENDS Plant Science* 7 (2002), 153). В литературе (смотри, например, Kreft et al., *Plant. Physiol.* 104 (1994), 1215; Ravel et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 316 (1995), 572) имеются сведения о том, что и L-цистеин, и сульфид (SH_2) могут быть конденсированы растительной цистатинин-гамма-синтазой с О-фосфо-L-гомосерином в L-цистатинин и L-гомоцистеин, с одновременным высвобождением фосфата. Сообщалось также, что выбор субстрата тиола очень ограничен, помимо L-цистеина, лишь немногие субстраты являются приемлемыми.

Хотя метионин является незаменимой аминокислотой, он не синтезируется *de novo* у животных, которые должны получать извне метионин или метионин-содержащие белки, или относящиеся к ним серосодержащие соединения. В частности, метионин имеет важное значение для кормления в птицеводстве и животноводстве, он не содержится в достаточном количестве в используемых растительных кормах. Таким образом, для эффективного фермерства необходим дополнительный источник метионина. На сегодняшний день, большинство, если не весь метионин, используемый для кормления животных, поступает из нефтехимии. Одним из ограничений производства метионина является стоимость энергии, затрачиваемой на восстановление серы. Таким

образом, существует потребность в альтернативных способах получения этой аминокислоты, предпочтительно, использующих возобновляемые ресурсы, которые позволили бы использовать микроорганизмы, синтез метионина в которых сопоставим с производством метионина в промышленном масштабе.

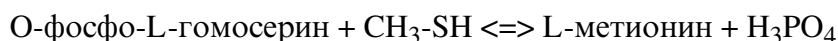
Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности путем создания способа получения L-метионина, в котором О-фосфо-L-гомосерин и метантиол ферментативно превращают в L-метионин и H_3PO_4 . В таком способе источником серы является метантиол. В этом соединении сера представлена в виде сульфида, уже восстановленная. Кроме того, использование О-фосфо-L-гомосерина в качестве предшественника, экономит, по меньшей мере, два атома углерода на молекулу синтезированного метионина по сравнению со стандартным метаболическим путем, который основан на использовании ацетилированных или сукцинизированных производных гомосерина. В целом этот путь дает гораздо лучшие результаты в синтезе метионина и его производных.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу производства L-метионина, в котором L-метионин ферментативно получают в согласно следующей схеме реакции:



В настоящее время отсутствуют данные о существовании в природе белка, обладающего способностью превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Авторы настоящего изобретения рассмотрели возможность получения L-метионина экономически эффективным способом из О-фосфо-L-гомосерина и метантиола, и, с этой целью, разработали белки, которые не встречаются в природе, и которые способны превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Как видно из приведенных примеров, авторы настоящего изобретения разработали систему, которая позволяет создавать ферменты, обладающие способностью превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Кроме того, авторы изобретения успешно применили эту систему для создания новых вариантов ферментов, полученных из существующих ферментов, обладающих способностью превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Для этой цели они отталкивались от существующих ферментов, не обладающих способностью превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 , получали мутанты из таких существующих ферментов, и отбирали ферменты, демонстрирующие способность превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Таким образом, авторы изобретения выявили новую ферментативную активность, не описанную ранее, и предложили надежные и воспроизводимые способы получения соответствующих ферментов. Соответствующие ферменты в контексте настоящего изобретения называют О-фосфо-L-гомосерин-зависимыми метионинсинтазами.

Таким образом, настоящее изобретение, в частности, относится к способу производства L-метионина, в котором О-фосфо-L-гомосерин и метантиол ферментативно превращают в L-метионин и H_3PO_4 согласно следующей схеме реакции:



где ферментативное превращение осуществляют путем использования О-фосфо-L-гомосерин-зависимой метионинсинтазы.

В принципе, любая О-фосфо-L-гомосерин-зависимая метионинсинтаза, т.е. любой белок, обладающий способностью превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в

L-метионин и H_3PO_4) может быть использован в способе по изобретению. Настоящее изобретение впервые описывает белки, обладающие этой способностью, и предлагает способы получения дополнительных белков, обладающих этой способностью. В частности, настоящее изобретение показывает, что, взяв за основу, растительную

цистатионин-гамма-синтазу (КФ 2.5.1.48), которая в природе не обладает способностью превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин, можно получить, в результате мутации и отбора, ее варианты, обладающие этой способностью.

О-фосфо-L-гомосерин-зависимые метионинсинтазы будут описаны ниже, в контексте белка по изобретению, и любая описанная О-фосфо-L-гомосерин-зависимая

метионинсинтаза, может быть использована в способе по изобретению.

Как видно из приведенных примеров, авторы изобретения успешно создали несколько различных белков, которые демонстрируют способность превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Последовательности этих белков

показаны в SEQ ID NO: от 6 до 29. Эти белки получены, путем мутации и отбора в скрининговой системе, как описано в примерах, из растительной цистатионин гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48), которая, в природе, не способна превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин.

Кроме того, отталкиваясь от последовательностей, представленных в SEQ ID NO: от 6 до 29, возможно предложить дополнительные белки, обладающие активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 . То есть, например, возможно дальнейшее увеличение аффинности белков к субстрату О-фосфо-L-гомосерина и/или к субстрату метантиола, или улучшение других свойств белка, как описано ниже. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению, ферментативного превращения О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 достигают путем использования белка, выбранного из группы, состоящей из:

(а) белка, содержащего любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29;

(b) белка, имеющего последовательность, идентичную по меньшей мере на 60% любой из SEQ ID NO: от 6 до 29, и обладающего ферментативной активностью превращения О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 .

Ферментативная активность по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 может, например, быть оценена с помощью анализа, как описано в приведенных примерах. Для этой цели можно, например, использовать штамм *S. cerevisiae*, который имеет ауксотрофный фенотип по метионину. Примерами такого штамма являются штаммы, в которых ферменты гомосерин трансацетилаза и гомоцистеинсинтаза удалены или инактивированы. Предпочтительно, оба фермента удалены или инактивированы. Как показано на Фигуре 1, *S. cerevisiae*, зависит от обязательного использования О-ацетилгомосерина для синтеза гомоцистеина, который затем превращается в метионин. Фермент гомосерин трансацетилаза, ответственный за синтез О-ацетилгомосерина, кодируется геном MET2. После инактивации MET2, гомосерин не может больше превращаться в О-ацетилгомосерин, и весь поток гомосерина перенаправляется в сторону фосфогомосерина. Поскольку реакция, катализируемая MET2, является единственным источником О-ацетилгомосерина в дрожжах, инактивация гена MET2 приводит к появлению дрожжевых штаммов, имеющих строгий ауксотрофный фенотип по метионину. Тем не менее, гомоцистеин (последний предшественник метионина) может быть получен или из цистеина (через

транссульфурационный путь), или из переработки S-аденозилметионина. Для того чтобы быть уверенными, что метионин не может быть синтезирован вообще, ген MET6, кодирующий гомоцистеин метилтрансферазу, отвечающую за синтез метионина из гомоцистеина и метилтетрагидрофолата, также удаляют.

5 Таким образом, в анализе для проверки способности белка превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 , может быть, предпочтительно, использован штамм *S. cerevisiae*, в котором гены MET2 и/или MET6, предпочтительно оба гена, удалены или инактивированы. Штамм с одновременно инактивированными *met2Δ met6Δ* (двойной мутант), не может расти в отсутствие метионина и, в частности, 10 не может расти в присутствии метантиола в качестве источника серы. Такой штамм уже не в состоянии синтезировать О-ацетил-гомосерин, но производит О-фосфо-гомосерин. Такой штамм дрожжей затем может быть трансформирован молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, который будет протестирован на способность превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Штамм 15 выращивали в/на среде, содержащей метантиол в качестве единственного источника серы; способность расти на такой среде свидетельствует о том, что экспрессированный белок в состоянии превращать О-фосфо-L-гомосерин (ОНПС) и метантиол в L-метионин; еще более предпочтительным является использование штамма, в котором ген, кодирующий треонинсинтазу, также инактивирован, например, путем делетирования 20 или разрушения. В *met2Δ met6Δ* мутантных штаммах, ОНПС синтезируется в реакции, катализируемой гомосерин-киназой, кодируемой геном THR1, но он не может эффективно накапливаться из-за его активного превращения в треонин с помощью треонин-синтазы, кодируемой геном THR4. Такие тройные *met2Δ met6Δ thr4Δ* мутантные штаммы, таким образом, позволяют детектировать очень низкую активность ОНПС-зависимой метионинсинтазы, и были использованы для первого скрининга клеток с 25 целью выделения новых белков, обладающих ОНПС-зависимой метионинсинтазной активностью.

Эта ферментативная активность в дальнейшем может быть подтверждена с помощью *in vitro* анализа, в котором О-фосфо-L-гомосерин и метантиол инкубируют *in vitro* в 30 подходящих условиях с бесклеточным экстрактом из штамма дрожжей, экспрессирующего белок, который будет протестирован, или с (частично) очищенным белком, который будет протестирован, и в котором производство метионина детектируется с помощью жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией 35 (ЖХ/МС/МС) с использованием C^3 метионина в качестве внутреннего контроля (Ravanel et al. Archives of Biochemistry and Biophysics 316 (1995), 572-584).

О-фосфо-L-гомосерин, используемый в таком *in vitro* анализе в качестве субстрата, может быть получен, например, способом, показанным на Фигуре 2 (Barclay et al., J. Chem. Soc., Chem. Com (1994) 815-816).

40 Как упоминалось выше, примерами белков, обладающих ферментативной активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 , являются белки, имеющие аминокислотную последовательность, в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29. Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению используют белок, 45 содержащий аминокислотную последовательность, в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29. Тем не менее, конечно, также можно использовать варианты этих белков, то есть белки с аминокислотной последовательностью, имеющей высокую степень идентичности аминокислотной

последовательности, в соответствии с любой из SEQ ID NO: от 6 до 29, и обладающие ферментативной активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 . Идентичность последовательности составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или, по меньшей мере 95%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99% любой из последовательностей, в соответствии с SEQ ID NO: от 6 до 29. Предпочтительно, степень идентичности определяют путем сравнения соответствующей последовательности с аминокислотной последовательностью, в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29. Когда сравниваемые последовательности не имеют одной и той же длины, степень идентичности, предпочтительно, относится или к проценту аминокислотных остатков в более короткой последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в более длинной последовательности, или к проценту аминокислотных остатков в более длинной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в более короткой последовательности. Степень идентичности последовательностей может быть определена методами, хорошо известными в данной области техники, с использованием подходящих, предпочтительно, компьютерных алгоритмов, таких как CLUSTAL. При использовании Clustal-анализа для того, чтобы определить, является ли конкретная последовательность идентичной, например, на 80% эталонной последовательности, могут быть использованы настройки по умолчанию, или, предпочтительно, следующие настройки: Matrix: blosum 30; Open gap penalty: 10.0; Extend gap penalty: 0.05; Delay divergent: 40; Gap separation distance: 8 для сравнения аминокислотных последовательностей. Для сравнений нуклеотидных последовательностей, значение "Extend gap penalty" устанавливают предпочтительно равным 5,0.

Предпочтительно, степень идентичности рассчитывают по всей длине последовательности. Кроме того, если в контексте настоящего изобретения используют термин "гомология", этот термин, предпочтительно, означает "идентичность последовательности".

Способ по изобретению также позволяет получать другие серосодержащие соединения, являющиеся производными L-метионина. Примерами таких соединений являются S-аденозилметионин, глутатион, цистеин, S-аденозилгомоцистеин, метилтиоаденозин и 2-оксо-4-метилтиобутаноат.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения S-аденозилметионина, который включает в себя способ получения L-метионина по изобретению, описанный выше, и, в котором L-метионин дополнительно преобразуют в S-аденозилметионин в соответствии со следующей реакцией:



Эта ферментативная реакция известна в данной области техники, и ферменты, катализирующие эту реакцию, известны в данной области техники.

Эти ферменты называются S-аденозилметионин синтазы (КФ 2.5.1.6). Примерами соответствующих ферментов являются SAM1 и SAM2 в дрожжах. Таким образом, в случае, когда такой способ осуществляется в организме, такой организм, предпочтительно, сверхэкспрессирует соответствующий фермент (ы), который (е) способен превращать L-метионин в S-аденозилметионин.

Также, может быть полезной дальнейшая модификация такого организма, чтобы предотвратить поток S-аденозилметионина в другие метаболические пути. В дрожжах, может, например, быть полезной, инактивация активности аденозин-киназы (КФ 2.7.1.20,

кодируемой геном дрожжей AD01) для того, чтобы уменьшить поток S-аденозилметионина в S-аденозилгомоцистеин.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к способу получения цистеина, который включает способ получения L-метионина по изобретению, описанный выше, и в котором L-метионин далее превращают в цистеин. Превращение L-метионина в цистеин известно из предшествующего уровня техники, и может быть достигнуто за счет средств и методов, известных специалистам в данной области. Например, L-метионин может быть сначала превращен в S-аденозилметионин, который затем превращают в S-аденозилгомоцистеин в соответствии со следующей реакцией:

S-аденозилметионин + метил-акцептор $\Rightarrow$ S-аденозилгомоцистеин + метилированный акцептор

Эта реакция катализируется S-аденозилметионин-зависимой метилтрансферазой.

S-аденозилгомоцистеин может быть далее превращен в L-гомоцистеин в соответствии со следующей реакцией:

S-аденозилгомоцистеин $\rightleftharpoons$ L-гомоцистеин + аденозин

Эта реакция катализируется S-аденозилгомоцистеин гидролазой, КФ 3.3.1.1.

Впоследствии L-гомоцистеин может быть превращен в L-цистатинин в соответствии со следующей реакцией:

L-гомоцистеин + L-серин $\rightleftharpoons$ L-цистатинин + H₂O

Эта реакция катализируется цистатинин-бета-синтазой (КФ 4.2.1.22). И, наконец, L-цистатинин превращают в цистеин в соответствии со следующей реакцией:

L-цистатинин + H₂O $\rightleftharpoons$ L-цистеин + NH₃ + оксобутаноат

Эта реакция катализируется цистатинин-гамма-лиазой (КФ 4.4.1 0.1).

Если такой способ осуществляется в дрожжах, предпочтительно, сверхэкспрессированы следующие гены: SAM1, SAM2, SAH1, STR4 и STR1. Кроме того, ген STR2, кодирующий у дрожжей цистатинин гамма-синтазу, должен быть делетирован для того чтобы снизить обратный синтез, из цистеина в гомоцистеин. Кроме того, такие дрожжи, преимущественно, также содержат мутацию MET6, ликвидирующую метилтетрагидрофолат-зависимую метионинсинтазу, а также делецию гена DUG2, который участвует в основном пути деградации глутатиона.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к способу получения глутатиона, который включает способ получения L-метионина по изобретению, описанный выше, и в котором L-метионин дополнительно превращают в глутатион. Превращение L-метионина в глутатион известно в данной области техники и может быть осуществлено с помощью средств и методов, известных специалистам в данной области. Например, L-метионин может быть сначала превращен в S-аденозилметионин, который дополнительно превращают в цистеин, как описано выше, и полученный таким образом цистеин, дополнительно превращают в Glu-Cys (гамма-L-глутамил-L-цистеин) в соответствии со следующей реакцией:

АТФ + L-глутамат + L-цистеин $\rightleftharpoons$ гамма-L-глутамил-L-цистеин + АДФ + Pi

Эта реакция катализируется глутамат-цистеинлигазой (КФ 6.3.2.2).

Полученный таким образом Glu-Cys затем превращают в глутатион в соответствии со следующей реакцией:

АТФ + гамма-L-глутамил-L-цистеин + глицин = глутатион + АДФ + Pi

Эта реакция катализируется глутатионсинтазой (КФ 6.3.2.3). Если такой способ осуществляют в дрожжах, предпочтительно, чтобы дрожжи были сконструированы так, как это описано выше в связи со способом производства цистеина, и такие дрожжи также должны сверхэкспрессировать гены GSH1 и GSH2, участвующие в превращении

цистеина в глутатион. В наиболее предпочтительном варианте ген GSH1 экспрессирует устойчивый фермент по типу обратной связи.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к способу получения 2-оксо-4-метилтиобутаноата, который включает способ получения L-метионина по изобретению, описанный выше, и в котором L-метионин дополнительно превращают в 2-оксо-4-метилтиобутаноат в соответствии со следующей реакцией:

Метионин + 2-оксо кислота $\Rightarrow$ 2-оксо-4-метилтиобутаноат + L-аминокислота

Эта ферментативная реакция известна в данной области техники, и ферменты, катализирующие эту реакцию, известны в данной области техники. Эти ферменты называются метионинтрансаминазы (КФ 2.6.1.88). Примерами соответствующих ферментов являются AR08, BAT1, BAT2 в дрожжах. Таким образом, в случае, когда такой способ осуществляется в организме, такой организм, предпочтительно, сверхэкспрессирует соответствующий фермент (ы), который (ые) способен превращать L-метионин в 2-оксо-4-метилтиобутаноат.

Также может быть полезной дальнейшая модификация такого организма, чтобы предотвратить поток 2-оксо-4-метилтиобутаноата в другие метаболические пути. В дрожжах, например, может быть полезной, инактивация активности фенилпируват декарбоксилазы (КФ 4.1.1.43, кодируемой геном ARO10 в дрожжах) или активности пируватдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.1 кодируемой генами PDC1, PDC5 и PDC6 в дрожжах) для того, чтобы уменьшить поток 2-оксо-4-метилтиобутаноата в 3-(метилтио)пропионовый альдегид.

Способ по настоящему изобретению может быть осуществлен *in vitro* или *in vivo*. Под реакцией *in vitro* понимают реакцию, в которой используют не клетки, а бесклеточную систему. Таким образом, термин "*in vitro*", преимущественно, означает в бесклеточной системе. Термин "*in vitro*", в одном варианте осуществления, означает в присутствии изолированного фермента. В одном варианте осуществления фермент, используемый в способе, используют в очищенном виде.

Для проведения процесса *in vitro* субстраты для реакции и фермента инкубируют в условиях (буфер, температура и т.д.), позволяющих ферменту быть активным, и иметь место ферментативному превращению. Реакцию проводят в течение времени, достаточного для получения L-метионина. Продукция L-метионина может быть измерена способами, известными в данной области техники.

Фермент может быть в любой подходящей форме, позволяющей ферментативной реакции иметь место. Он может быть очищенным, частично очищенным, в виде сырых клеточных экстрактов или в виде частично очищенных клеточных экстрактов. Также возможно, что фермент иммобилизован на подходящем носителе.

В другом варианте осуществления, способ по изобретению осуществляют в культуре, в присутствии организма, предпочтительно, микроорганизма, производящего белок, обладающий способностью превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин и H_3PO_4 . Белок представляет собой белок, описанный здесь.

Организм, используемый в таком способе, предпочтительно, представляет собой клетку-хозяина в соответствии с настоящим изобретением, как описано здесь.

Настоящее изобретение также относится к белку, обладающему способностью ферментативно превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. В контексте настоящего изобретения, такие ферменты называют OHPS-зависимыми метионинсинтазами. Как упоминалось выше, до настоящего времени нет никаких сведений о существовании в природе белков, обладающих способностью превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин, и, настоящее изобретение впервые

предлагает белки, позволяющие получать L-метионин в соответствии со способом по изобретению, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления, белок по изобретению, способный ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин, получают из цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) в результате мутации. Такой мутацией может быть замена одного или нескольких аминокислотных остатков и/или удаление одного или нескольких аминокислотных остатков и/или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности цистатионин гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48).

Цистатионин-гамма-синтазы известны и описаны в различных организмах. Например, для растений известны более чем 350 последовательностей цистатионин-гамма-синтазы, в частности, для *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Triticum aestivum*, *Solanum lycopersicum*, *Lemna paucicostata*, *Solanum tuberosum*, *Spinacia oleracea*, *Astragalus racemosus*, *Astragalus bisulcatus*, *Astragalus sinicus* and *Neptunia amplexicaulis*.

Цистатионин-гамма-синтазы также известны для бактерий и грибов. Для бактерий описаны более 22,000 последовательностей; примерами последовательностей бактерий и грибов являются последовательности из *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Helicobacter pylori*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas dacunhae*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces phaeochromogenes*.

Способы получения белков, обладающих активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 описаны в приведенных примерах и более подробно будут описаны ниже. В принципе, любая цистатионин-гамма-синтаза (КФ 2.5.1.48) может быть использована в качестве исходного материала для получения белка, обладающего активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 . Предпочтительно, белок, обладающий активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 , полученный из цистатионин-гамма-синтазы, (КФ 2.5.1.48) имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%, аминокислотной последовательности природной цистатионин-гамма-синтазы.

В одном предпочтительном варианте осуществления, цистатионин-гамма-синтаза (КФ 2.5.1.48), из которой происходит OHPS-зависимая метионинсинтаза, представляет собой растительную цистатионин-гамма-синтазу (КФ 2.5.1.48), предпочтительно цистатионин-гамма-синтазу (КФ 2.5.1.48) CGS1 из *Arabidopsis thaliana*, наиболее предпочтительно, цистатионин гамма-синтазу (КФ 2.5.1.48), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В еще более предпочтительном варианте OHPS-зависимую метионинсинтазу, используемую в способе по изобретению, получают из последовательности SEQ ID NO: 2. Эта последовательность соответствует последовательности SEQ ID NO: 1, за исключением того, что остаток глицина в положении 84 заменен на остаток серина. Эта замена, то есть mto мутация, снимает репрессию трансляции, оказываемую S-аденозилметионином на CGS1 (Onoue et al., *Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), 14903-14911). В наиболее предпочтительном варианте осуществления, OHPS-зависимую метионинсинтазу, используемую в способе по изобретению, получают из последовательности SEQ ID NO: 3. Эта последовательность

соответствует последовательности SEQ ID NO: 2 за исключением того, N-концевая хлоропластная сигнальная последовательность (аминокислотные остатки от 1 до 57) была удалена, и остаток метионина добавлен на N-конце.

Примерами OHPS-зависимых метионинсинтаз, которые могут быть использованы в способе по настоящему изобретению, являются

(i) OHPS-зависимые метионинсинтазы, полученные из цистатионин-гамма-синтазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, путем замены или делеции по меньшей мере одного аминокислотного остатка в SEQ ID NO: 3, выбранного из группы, состоящей из:

- (a) пролина 10;
- (b) аспарагина 11;
- (c) глутамина 15;
- (d) изолейцина 27;
- (e) аланина 30;
- (f) лейцина 45;
- (g) серина 47;
- (h) валина 60;
- (i) аланина 68;
- (j) фенилаланина 150;
- (k) треонина 178;
- (l) аспартата 183;
- (m) изолейцина 185;
- (n) треонина 220;
- (o) метионина 232;
- (p) валина 245;
- (q) аланина 257;
- (r) аспарагина 259;
- (s) фенилаланина 261;
- (t) фенилаланина 275;
- (u) изолейцина 287;
- (v) гистидина 289;
- (w) тирозина 324;
- (x) глицина 326;
- (y) пролина 356;
- (2) треонина 371;
- (aa) валина 396;
- (bb) пролина 405;
- (cc) аспартата 431;
- (dd) изолейцина 436;
- (ee) изолейцина 457;
- (ff) аспартата 459;
- (gg) пролина 470;
- (hh) глутамата 472;
- (ii) аланина 506;
- (jj) изолейцина 507;

или

(ii) OHPS-зависимые метионинсинтазы, полученные из цистатионин-гамма-синтазы, аминокислотная последовательность которой, по меньшей мере, на 60% идентична

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, путем замены или делеции по меньшей мере одной аминокислоты, соответствующей любой из перечисленных выше, от (a) до (jj), в SEQ ID NO: 3.

Предпочтительно, последовательность идентична по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80% и, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90%.

Термин "замена" означает, что аминокислоту, находящуюся в указанном положении, замещают другим аминокислотным остатком. В контексте настоящего изобретения, фраза "замещенный другим аминокислотным остатком" означает, что соответствующие аминокислотные остатки в указанном положении могут быть замещены любыми другими возможными аминокислотными остатками, предпочтительно, аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. Предпочтительные замены для определенных положений указаны ниже. Аминокислотные остатки, расположенные в позиции, соответствующей позиции, выбранной из группы, включающей позиции от (a) до (jj), перечисленные выше, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, могут быть идентифицированы специалистом способами, известными в данной области техники. Например, такие аминокислотные остатки могут быть идентифицированы путем сравнения изучаемой последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 3, и путем идентификации позиций, соответствующих указанным выше позициям в SEQ ID NO: 3. Сравнение может быть проведено методами и способами, известными специалисту в данной области, например, с использованием такого известного компьютерного алгоритма, как алгоритм Липмана-Пирсона (Science 227 (1985), 1435) или алгоритма CLUSTAL. Предпочтительно, чтобы в таком сравнении, максимальная гомология приходилась на консервативные аминокислотные остатки, присутствующие в аминокислотных последовательностях.

При сравнении аминокислотных последовательностей таким способом, независимо от того, есть ли в аминокислотных последовательностях вставки или делеции, позиции соответствующих аминокислотных остатков могут быть определены в заданной последовательности.

По одному из вариантов осуществления, OHPS-зависимые метионинсинтазы по настоящему изобретению имеют аминокислотную последовательность, в которой

(i) аминокислотный остаток в положении 10 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на лейцин; и/или

(ii) аминокислотный остаток в положении 11 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аспарат; и/или

(iii) аминокислотный остаток в положении позиции 15 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аргинин; и/или

(iv) аминокислотный остаток в положении 27 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серин; и/или

(v) аминокислотный остаток в положении 30 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на треонин;

и/или

(vi) аминокислотный остаток в положении 45 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серии; и/или

5 (vii) аминокислотный остаток в положении 47 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на треонин; и/или

(viii) аминокислотный остаток в положении 60 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аспарат; и/или

10 (ix) аминокислотный остаток в положении 68 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, в положении, соответствующем этой позиции, замещен на треонин; и/или

(x) аминокислотный остаток в положении 150 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на лейцин; и/или

15 (xi) аминокислотный остаток в положении 178 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на изолейцин; и/или

(xii) аминокислотный остаток в положении 183 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на глутамат; и/или

(xiii) аминокислотный остаток в положении 185 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на валин; и/или

25 (xiv) аминокислотный остаток в положении 220 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серии; и/или

(xv) аминокислотный остаток в положении 232 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на лейцин; и/или

30 (xvi) аминокислотный остаток в положении 245 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аланин; и/или

(xvii) аминокислотный остаток в положении 257 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на треонин; и/или

35 (xviii) аминокислотный остаток в положении 259 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аспарат или серии; и/или

40 (xix) аминокислотный остаток в положении 261 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серии; и/или

(xx) аминокислотный остаток в положении 275 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на лейцин; и/или

45 (xxi) аминокислотный остаток в положении 287 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на валин или фенилаланин; и/или

(xxii) аминокислотный остаток в положении 289 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на тирозин или аргинин; и/или

(xxiii) аминокислотный остаток в положении 324 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен фенилаланином; и/или

(xxiv) аминокислотный остаток в положении 326 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серин; и/или

(xxv) аминокислотный остаток в положении 356 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на треонин; и/или

(xxvi) аминокислотный остаток в положении 371 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аланин; и/или

(xxvii) аминокислотный остаток в положении 396 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аланин; и/или

(xxviii) аминокислотный остаток в положении 405 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серин; и/или

(xxix) аминокислотный остаток в положении 431 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на глицин; и/или

(xxx) аминокислотный остаток в положении 436 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на треонин; и/или

(xxxi) аминокислотный остаток в положении 457 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на лейцин; и/или

(xxxii) аминокислотный остаток в положении 459 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на аспарагин; и/или

(xxxiii) аминокислотный остаток в положении 470 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на серин; и/или

(xxxiv) аминокислотный остаток в положении 472 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на глицин; и/или

(xxxv) аминокислотный остаток в положении 506 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на глицин; и/или

(xxxvi) аминокислотный остаток в положении 507 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещен на валин.

Настоящее изобретение также относится к вариантам, описанным выше от (i) до (xxxvi), в которых аминокислотный остаток, указанный как замещающий аминокислотный остаток в положении SEQ ID NO: 3, не является конкретным

аминокислотным остатком, но представляет собой аминокислотный остаток, консервативный по отношению к указанному замещающему аминокислотному остатку.

Оценить, является ли аминокислота консервативной по отношению к другой аминокислоте, можно методами, известными в данной области техники. Одной из возможностей является использование матрицы РАМ 250; альтернативно, могут быть использованы матрицы семейства Blossum.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к ОНPS-зависимой метионинсинтазе, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, идентичную, по меньшей мере, на 60% последовательности SEQ ID NO: 3, где аминокислотные остатки в положении 356 в SEQ ID NO: 3, или в положении, соответствующем этой позиции, замещены другим аминокислотным остатком. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к такому белку, в котором, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, замещен в положении, выбранном из группы, состоящей из позиций 10, 11, 15, 27, 28, 30, 32, 45, 47, 60, 68, 104, 150, 178, 183, 185, 220, 232, 245, 257, 259, 261, 275, 287, 289, 324, 326, 371, 396, 405, 431, 436, 457, 459, 470, 472, 506 и 507, предпочтительно, выбранном из группы, состоящей из позиций 10, 11, 15, 30, 32, 45, 47, 68, 104, 150, 178, 183, 185, 220, 232, 245, 257, 259, 261, 275, 287, 289, 326, 371, 396, 405, 431, 436, 459, 470, 472, 506 и 507, еще более предпочтительно, выбранном из группы, состоящей из позиций 275 и 396.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции являются следующие:

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 10, 27, 60, 324 и 457.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 32, 287, 289 и 356.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 10, 232, 245, 259, 356, 431 и 436.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 11, 15, 30, 45, 47, 68, 178, 356, 371 и 459.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 32 и 356.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 32, 60, 324 и 457.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 32, 287, 289 и 356.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 32, 232, 245, 259, 356, 431 и 436.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 32, 45, 47, 68, 178, 356, 371 и 459.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 232, 245, 259, 356, 431 и 436.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 178, 356, 371 и 459.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 150, 257, 259, 261, 275, 289, 356 и 506.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 185, 356 и 405.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 356, 396 и 472.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 326, 356 и 396.

5 В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 220, 275, 356 и 396.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 83, 275, 356, 396 и 507.

10 В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 287, 356, 396 и 507.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 356, 396 и 470.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 356 и 507.

15 В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 356 и 396.

В одном варианте осуществления, позициями, в которых происходят замены и/или делеции, являются следующие: позиции 275, 287 и 356.

Предпочтительными заменами в этих позициях являются те, которые указаны выше.

20 ОНПС-зависимые метионинсинтазы, которые могут быть использованы в способе по изобретению, представляют собой ферменты, которые могут быть получены из любой из описанных выше ОНПС-зависимых метионинсинтаз путем делеции одной или нескольких N-концевых аминокислот, соответствующих аминокислотам от 1 до 103 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. Как показано на примерах

25 укороченные формы вышеописанных ОНПС-зависимых метионинсинтаз, например, укороченные формы, в которых, по сравнению с SEQ ID NO: 3, 31 аминокислотный остаток или 103 аминокислотных остатка удалены на N-конце, также все еще обладают эффективной ОНПС-зависимой метионинсинтазной активностью.

В предпочтительном варианте ОНПС-зависимая метионинсинтаза по изобретению 30 также обладает ферментативной активностью по превращению О-фосфо-L-гомосерина и сульфида в L-гомоцистеин + H_3PO_4 . Предпочтительно, сульфид представляет собой металл, такой как сульфид Na_2S . В этом случае превращение происходит в соответствии со следующей схемой реакции:

35 О-фосфо-L-гомосерин + $Na_2S \rightleftharpoons$ L-гомоцистеин + H_3PO_4

Активность по превращению О-фосфо-L-гомосерина (OPHS) и сульфида металла в L-гомоцистеин и H_3PO_4 , может быть выявлена с помощью анализа, который является в основном таким же, как описано выше в связи с детекцией активности по превращению О-фосфо-L-гомосерина (OPHS) и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 . В этом случае,

40 используют *met2Δ met25Δ* двойной мутантный штамм дрожжей и его выращивают на среде с Na_2S в качестве единственного источника сульфата. В самом деле, MET25

кодирует единственную, известную в дрожжах, гомоцистеин-синтазную активность, катализирующую конденсацию О-ацетил-L-гомосерина с сульфидом. Чувствительность анализа можно легко повысить, используя штаммы *S. cerevisiae*, сконструированные 45 таким образом, чтобы, в дополнение к двойным мутациям *met2 met25*, они включали в себя, мутацию *thr4*, приводящую к накоплению О-фосфо-L-гомосерина.

Эта ферментативная активность также может быть дополнительно подтверждена с помощью анализа *in vitro*, в котором О-фосфо-L-гомосерин и Na_2S инкубируют *in vitro*

в подходящих условиях с бесклеточным экстрактом из штамма дрожжей, экспрессирующего белок, который будет протестирован, или с (частично) очищенным белком, который будет протестирован, и в котором производство гомоцистеина определяют с помощью колориметрического метода (Becker et al., Journal of Biochemical Chemistry 244 (1969), 2418). Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих белок по изобретению. Молекулой нуклеиновой кислоты может быть молекула ДНК или РНК, предпочтительно, молекула ДНК.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. В предпочтительном варианте осуществления, вектор представляет собой вектор, обеспечивающий экспрессию нуклеиновой кислоты по изобретению так, чтобы осуществлялась продукция белка по изобретению. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения, нуклеиновая кислота по изобретению, функционально связана с последовательностями, контролирующими экспрессию, которые обеспечивают возможность экспрессии в требуемой системе клетки-хозяина или в клетке-хозяине. Термин "функционально связанный", так как он использован в настоящем описании, относится к связи между одной или более последовательностями, контролирующими экспрессию, и кодирующей областью в молекуле нуклеиновой кислоты, которая будет экспрессирована, таким образом, что экспрессия достигается в условиях, совместимых с последовательностью, контролирующей экспрессию.

Экспрессия включает транскрипцию гетерологичной последовательности ДНК, предпочтительно, в транслируемую мРНК. Регуляторные элементы, контролирующие экспрессию в клетках растений, животных, грибов, а также бактерий хорошо известны специалистам в данной области техники. Они включают промоторы, энхансеры, сигналы терминации, сигнальные последовательности и тому подобное. Примеры, вместе с подробными пояснениями относительно векторов, приведены ниже.

Промоторы для использования вместе с молекулой нуклеиновой кислоты могут быть гомологичными или гетерологичными по своему происхождению и/или по отношению к гену, который будет экспрессирован. Подходящими промоторами являются, например, промоторы, контролирующие конститутивную экспрессию. Тем не менее, промоторы, активирующиеся только в ответ на внешние воздействия, также могут быть использованы. В данном контексте могут быть использованы искусственные и/или химически индуцируемые промоторы.

Вектор по настоящему изобретению может быть введен в (микро)организм с тем, чтобы быть экспрессированным и привести к продуцированию белка, способного превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин.

Обзор различных экспрессионных систем приведен, например, в Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516, in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544) и in Sawers et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4), Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463), Griffiths et al. (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440). Обзор экспрессионных систем дрожжей, например, сделан Hensing et al. (Antonie van Leeuwenhoek 67 (1995), 261-279), Bussineau et al. (Developments in Biological Standardization 83 (1994), 13-19), Gellissen et al. (Antonie van Leeuwenhoek 62 (1992), 79-93), Fleer (Current Opinion in Biotechnology 3 (1992), 486-496), Vedvick (Current Opinion in Biotechnology 2 (1991), 742-745) и Buckholz (Bio/Technology 9 (1991), 1067-1072).

Экспрессионные векторы были широко описаны в литературе. Как правило, они содержат не только ген селективного маркера и ориджин репликации (точку начала

репликации), обеспечивающие репликацию в выбранном хозяине, но и бактериальный или вирусный промотор, и, в большинстве случаев, сигнал терминации транскрипции. Между промотором и сигналом терминации транскрипции существует, как правило, по меньшей мере, один сайт рестрикции или полилинкер, обеспечивающий возможность вставки кодирующей последовательности ДНК. В качестве промоторной последовательности может быть использована последовательность ДНК, контролирующая в природе транскрипцию соответствующего гена, если она активна в выбранном организме-хозяине. Тем не менее, эта последовательность может также быть заменена на другие промоторные последовательности. Можно использовать конститутивные промоторы, контролирующие конститутивную экспрессию гена, а также индуцируемые промоторы, предусматривающие планомерный контроль экспрессии гена. Бактериальные и вирусные промоторные последовательности, обладающие этими свойствами, подробно описаны в литературе. Последовательности, регулирующие экспрессию в микроорганизмах (например, *E.coli*, *S. cerevisiae*) достаточно подробно описаны в литературе. Промоторами, обеспечивающими наиболее высокую экспрессию расположенной ниже последовательности, являются, например, промотор T7 (Studier et al., *Methods in Enzymology* 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacIIV5 (DeBoer et al., B Rodriguez and Chamberlin (Eds), *Promoters, Structure and Function*; Praeger, NY, (1982), 462-481; DeBoer et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1983), 21-25), Ip1, rae (Boros et al., *Gene* 42 (1986), 97-100). Индуцируемые промоторы, предпочтительно, используют для синтеза полипептидов. Эти промоторы часто обеспечивают более высокий выход полипептидов, чем конститутивные промоторы. Для того чтобы получить оптимальное количество полипептида, часто используют двухэтапный процесс. Сначала клетки-хозяева культивируют в оптимальных условиях до сравнительно высокой клеточной плотности. На втором этапе, индуцируют транскрипцию в зависимости от типа используемого промотора.

В этом отношении, наиболее подходящим является tac промотор, который может быть индуцирован лактозой или IPTG (изопропил - бета-D-тиогалактопиранозид) (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), 21-25). Сигналы терминации транскрипции также описаны в литературе.

Трансформация клетки-хозяина полинуклеотидом или вектором по изобретению может быть осуществлена стандартными методами, как описано, например, в Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; *Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. Клетку-хозяина культивируют в питательной среде, соответствующей требованиям для конкретной клетки-хозяина, в частности, в отношении величины pH, температуры, концентрации соли, аэрации, антибиотиков, витаминов, микроэлементов и т.д.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, которая содержит/ трансформирована молекулой нуклеиновой кислоты или вектором по изобретению. В предпочтительном варианте такая клетка-хозяин экспрессирует белок по изобретению и способна превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. В принципе, клеткой-хозяином может быть любая клетка-хозяин, например, клетка животного, растения, гриба, бактерии. В предпочтительном варианте осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку бактерии или гриба. В более предпочтительном варианте осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку бактерии, например, из рода *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacillus* или *Acinetobacter*, наиболее предпочтительными из этих видов являются *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus*

subtilis или *Acinetobacter villandi*.

В другом предпочтительном варианте клетка-хозяин представляет собой клетку гриба, например, из рода *Saccharomyces*, *Candida*, *Ashbya*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Debaryomyces* или *Torulopsis*, более предпочтительно, из рода: *S.cerevisiae*, *Saccharomyces maximus*, *Candida Maltosa*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces Lactis*, *Pichia pastoris*, *Pichia stipitis*, *Yarrowia lipolitica*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus nidullans*, *Debaryomyces hansenii* или *Torulopsis utilis*. В более предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку.

Как указано выше, настоящее изобретение также относится к способу получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, способный превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Такой способ включает следующие стадии:

(i) осуществление мутации в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей цистатионин-гамма-синтазу (КФ 2.5.1.48) таким образом, чтобы получить мутантные цистатионин-гамма-синтазы;

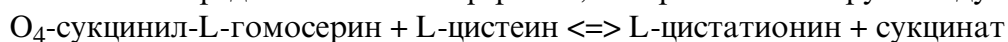
(ii) экспрессию мутантных молекул нуклеиновой кислоты, полученных на стадии (i) в клетке-хозяине в условиях культивирования, позволяющих отбирать молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие белок, способный ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин;

(iii) идентификацию тех клеток-хозяев, которые экспрессируют белок, способный ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин; и

(iv) получение из клетки-хозяина, идентифицированной на стадии (iii), молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей мутированную цистатионин-гамма-синтазу, способную ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин.

Настоящее изобретение также относится к способу получения белка, способного ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин, причем указанный способ включает в себя стадию экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, полученной в соответствии с описанным выше способом по изобретению, и выделение кодированного белка.

Термин "цистатионин-гамма-синтаза (КФ 2.5.1.48)" относится к любому ферменту, имеющему ферментативную активность цистатионин-гамма-синтазы. Цистатионин-гамма-синтаза представляет собой фермент, который катализирует следующую реакцию



Эта активность может быть измерена с помощью методов, известных в данной области техники (Ravanel, *Biochem. J.* 331 (1998), 639-648).

В соответствии со стадией (i) описанного выше способа по изобретению, мутированный вариант молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей цистатионин-гамма-синтазу, сделан таким образом, чтобы получить мутантную цистатионин-гамма-синтазу. Методы мутагенеза молекул нуклеиновых кислот, хорошо известны специалистам в данной области техники. Таким образом, можно вставить различные типы мутаций в молекулы нуклеиновых кислот методами, обычно используемыми в молекулярной биологии (смотри, например, Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA), что приведет к синтезу цистатионин-гамма-синтазы с модифицированной аминокислотной последовательностью по сравнению с исходной последовательностью. В принципе, возможен любой тип мутации на уровне молекулы нуклеиновой кислоты, например, делеции, вставки и/или замены. В предпочтительном варианте мутация, осуществленная в нуклеиновой кислоте, приводит к замене аминокислоты на уровне аминокислотных последовательностей.

Можно осуществить только одну мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты, но также, конечно, можно осуществить одну или несколько мутаций в молекуле нуклеиновой кислоты, ведущих к одной или более мутаций на уровне аминокислот. В принципе, не существует верхнего предела по количеству мутаций. Тем не менее, предпочтительно, чтобы мутантная молекула нуклеиновой кислоты имела последовательность, идентичную по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% исходной последовательности, кодирующей цистатионин-гамма-синтазу, используемую на стадии (i) описанного выше способа.

В предпочтительном варианте, мутантная молекула нуклеиновой кислоты, полученная на стадии (i), кодирует мутантный вариант цистатионин-гамма-синтазы, который имеет не более 20 изменений в аминокислотных остатках по сравнению с цистатионин-гамма-синтазой, кодируемой исходной нуклеиновой кислотой, более предпочтительно не более 15 изменений, еще более предпочтительно не более 10 изменений и наиболее предпочтительно не более 5 изменений.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая цистатионин гамма-синтазу (КФ 2.5.1.48)" на стадии (i) способа по изобретению, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, обладающий ферментативной активностью цистатионин-гамма-синтазы, как указано выше. В принципе, любая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такой фермент, может быть использована в способе по изобретению в качестве исходного материала. Цистатионин-гамма-синтазы были подробно описаны выше, также как и их распространение в природе. Любая нуклеиновая кислота, кодирующая любую из этих цистатионин-гамма-синтаз, может быть использована на стадии (i) способа по изобретению. В предпочтительном варианте осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, используемая на стадии (i) представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую растительную цистатионин-гамма-синтазу. Еще более предпочтительно, цистатионин-гамма-синтаза происходит из *A. thaliana*, предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая цистатионин-гамма-синтазу *A. thaliana*, такая как SEQ. ID NO: 1.

Нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, используемой на стадии (i) может быть адаптирована для использования в клетке-хозяине, которую используют на стадии (ii). Например, можно изменить частоту встречаемости кодонов с тем, чтобы в большей степени соответствовать частоте встречаемости кодонов трансляционной машины используемых клеток-хозяев. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты может быть модифицирована таким образом, чтобы она имела оптимальную частоту встречаемости кодонов по отношению к клетке-хозяину, используемой на стадии (ii).

Кроме того, могут быть необходимы или желательны другие модификации, чтобы адаптировать некоторые молекулы нуклеиновых кислот, такие как молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая растительную цистатионин-гамма-синтазу, к способу по изобретению. Например, растительные цистатионин-гамма-синтазы, как правило, содержат на N-конце хлоропластную сигнальную последовательность, которая направляет белок в хлоропласты. В зависимости от того, какую клетку-хозяина используют на стадии (i), может быть необходимо или желательно удаление этой сигнальной последовательности. Если, например, на стадии (i) используют дрожжевые клетки, то желательно удалить эту хлоропластную сигнальную последовательность. Кроме того, растительная цистатионин-гамма-синтаза может содержать регуляторную

область (также известную как mto область), которая обеспечивает регуляцию трансляции, опосредованную увеличением внутриклеточного пула S-аденозилметионина (SAM). SAM способен связываться с образующимся пептидом цистатионин-гамма-синтазы во время трансляции в кармане, образованной этой mto областью и частью рибосомы, что приводит к остановке трансляции. Может быть желательным избежать этого регулирования при применении способа по изобретению. Таким образом, в предпочтительном варианте, на стадии (i) используют последовательность, кодирующую растительную цистатионин-гамма-синтазу, модифицированную таким образом, чтобы избежать регулирования SAM. Такие мутации были описаны в предшествующем уровне техники, например, в Onoue et al. (Journal of Biological Chemistry 286 (2011), 14903-14911).

Дополнительно, также может быть возможным использование в качестве исходной молекулы нуклеиновой кислоты, последовательности, которая приводит к более стабильной версии цистатионин-гамма-синтазы. Известно, что идентичность второй N-концевой аминокислоты, определяет стабильность всего белка (Varshavsky, Annual Review of Biochemistry 81 (2012), 167-176).

Таким образом, целесообразно, избегать дестабилизирующих остатков (в частности, Tug, Gin, Leu, Phe, Asp, Lys, Arg) и предпочесть стабилизирующие остатки, такие как Val или Ser (Varshavsky, Annual review of Biochemistry 81 (2012), 167-176).

Экспрессия мутантной молекулы нуклеиновой кислоты согласно стадии (ii) способа может быть достигнута способами, известными специалисту в данной области техники. Экспрессионные системы также уже были описаны выше в связи с векторами и клетками-хозяевами по изобретению. На стадии (ii) способа по изобретению используют клетку-хозяина для экспрессии мутантной цистатионин-гамма-синтазы, что позволяет отбирать молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие белок, способный ферментативно превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. В этом контексте, например, можно использовать клетки-хозяева, которые могут выжить только при выращивании на среде, содержащей метантиол, в качестве единственного источника серы, если они способны превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Одним из примеров таких клеток-хозяев являются клетки *Saccharomyces cerevisiae*, которые были генетически модифицированы, так, чтобы быть, по меньшей мере, лишенными функции *met2*. Ген MET2 кодирует гомосеринтрансацилазу, катализирующую превращение гомосерина и ацетил-КоА в O-ацетил гомосерин и КоА. Инактивация гена MET2 приводит к появлению дрожжевых штаммов, имеющих ауксотрофный фенотип по метионину. Предпочтительно, чтобы в штамме дрожжей, с инактивированным геном MET2, ген *met6* также был инактивирован. Ген MET6 кодирует гомоцистеинметилтрансферазу, превращающую гомоцистеин и метилтетрагидрофолат в метионин. Поскольку *S. cerevisiae*, не имеет иных способов синтеза незаменимой аминокислоты метионина, кроме как ее синтез из гомоцистеина, штамм *S. cerevisiae*, лишенный функции MET2 (и, возможно, также функции MET6) может выжить только, если он способен производить метионин другими способами.

Условия культивирования на стадии (ii) подобраны таким образом, что клетка-хозяин может выжить, только если она способна превращать O-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Это может быть достигнуто путем добавления метантиола в качестве единственного источника серы в культуральную среду.

Еще более предпочтительно, чтобы в дополнение к генам MET2 и MET6 был также инактивирован ген THR4. Такая инактивация нацелена на повышение внутриклеточного пула OPNS. В этом случае трансформированные клетки-хозяева выращивают в среде, содержащей и треонин и метантиол вместо метионина. Если используется такая клетка-

хозяин, то возможно выделить мутанты, обладающие очень слабой активностью OPHS-зависимой метионинсинтазы.

Клетки-хозяева, идентифицированные на стадии (iii) способа по изобретению, в дальнейшем используют для получения молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют мутированную цистатионин-гамма-синтазу, способную ферментативно превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Это может быть сделано методами, известными специалистами в данной области техники.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты может быть затем использована для экспрессии соответствующего фермента, или она может быть введена в другие клетки-хозяева.

В предпочтительном варианте осуществления, способ получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, способный превращать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин, включает несколько раундов скрининга, то есть мутаций и выделения соответствующих мутантов, обладающих необходимой активностью.

В этом контексте, предпочтительно, чтобы в первом раунде скрининга использовали клетку-хозяина, в которой гены MET2, MET6 и THR4 инактивированы. Как описано выше, с использованием такой клетки-хозяина, можно отобрать мутанты, обладающие очень слабой активностью OPHS-зависимой метионинсинтазы. Отобранные мутанты подвергают дальнейшему раунду мутагенеза и впоследствии отбирают по OPHS-зависимой метионинсинтазной активности в клетке-хозяине, в которой инактивированы только гены MET2 и MET6, а ген thr4 активен. Такой отбор является более жестким, так как часть OPHS используется треонинсинтазой. В этом случае клетки-хозяева, используемые для отбора клонов с желательными ферментативными свойствами, выращивают в среде, содержащей метантиол в качестве источника серы.

Второй раунд отбора может быть выполнен итеративно и давление отбора может быть увеличено за счет уменьшения количества метантиола, добавленного к среде, и отбора трансформированных штаммов, демонстрирующих быстрый рост.

Фигура 1 показывает упрощенную схему пути биосинтеза метионина в *S.cerevisiae* (взято из: Thomas D. and Y. Surdin-Kerjan; Microbiological and Molecular Reviews 61 (1997); Metabolism of sulfur amino-acids in *Saccharomyces cerevisiae*, page 503-532).

Фигура 2 показывает химический путь синтеза О-фосфо-L-гомосерина.

Фигура 3 схематически показывает укороченные формы CGS1, используемые в качестве исходного материала для создания мутантных версий фермента.

Фигура 4 показывает рост штаммов YA246-4A, экспрессирующих или AD242, или AD328 CGS1 вариант, или осуществляющих контроль вектора pAL06 в среде А, содержащей 0,05 мМ метионина.

Фигура 5 показывает рост штаммов на основе YA246-4A, экспрессирующих CGS1-4 (А), CGS1-5 (В) и CGS1-1 (С) мутантные семейства, соответственно, в среде А, содержащей 0,1 мМ метантиола. CGS1-4 (G84S) и отрицательные контроли с pAL06 пустым вектором показаны на всех графиках.

Фигура 6 показывает рост штаммов на основе YA247-5A, экспрессирующих CGS1-4 семейство мутантов AD242, AD328, MUT24 и MUT27 в среде А, содержащей 1 мМ (А) или 0,1 мМ (В) метантиола. CGS1-4 (G84S) и отрицательные контроли с pAL06 показаны на всех графиках.

Фигура 7 показывает сравнение идентифицированных мутантов CGS.

Описание последовательностей:

SEQ ID NO: 1 аминокислотная последовательность цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) CGS1 из *Arabidopsis thaliana* (AAC25687.1).

SEQ ID NO: 2 аминокислотная последовательность цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) CGS1 из *Arabidopsis thaliana* (AAC25687.1), в которой глицин 84 заменен на серии. Эту последовательность также называют CGS1 G84S или CGS1-0.

SEQ ID NO: 3 аминокислотная последовательность цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) CGS1w3 *Arabidopsis thaliana* (AAC25687.1), в которой глицин 84 заменен на серии, в которой удалены 57 N-концевых аминокислот и добавлен остаток метионина на N-конце. Эту последовательность также называют CGS1 1-4G84S.

SEQ ID NO: 4 укороченная форма аминокислотной последовательности цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) CGS1 из *Arabidopsis thaliana* (AAC25687.1), в которой 88 N-концевых аминокислот удалены, и остаток метионина добавлен на N-конце. Эту последовательность также называют CGS1 1-5G84S.

SEQ ID NO: 5 укороченная форма аминокислотной последовательности цистатионин-гамма-синтазы (КФ 2.5.1.48) CGS1 из *Arabidopsis thaliana* (AAC25687.1), в которой 160 N-концевых аминокислот удалены, и остаток метионина добавлен на N-конце. Эту последовательность также называют CGS1 1-1 G84S.

SEQ ID NO: 6 последовательность мутанта MUT02.

SEQ ID NO: 7 последовательность мутанта MUT04.

SEQ ID NO: 8 последовательность мутанта MUT13.

SEQ ID NO: 9 последовательность мутанта MUT18.

SEQ ID NO: 10 последовательность мутанта MUT19.

SEQ ID NO: 11 последовательность мутанта AD309.

SEQ ID NO: 12 последовательность мутанта AD310.

SEQ ID NO: 13 последовательность мутанта AD311.

SEQ ID NO: 14 последовательность мутанта AD312.

SEQ ID NO: 15 последовательность мутанта AD313.

SEQ ID NO: 16 последовательность мутанта AD242.

SEQ ID NO: 17 последовательность мутанта AD328.

SEQ ID NO: 18 последовательность мутанта AD329.

SEQ ID NO: 19 последовательность мутанта MUT24.

SEQ ID NO: 20 последовательность мутанта MUT27.

SEQ ID NO: 21 последовательность мутанта MUT67.

SEQ ID NO: 22 последовательность мутанта MUT68.

SEQ ID NO: 23 последовательность мутанта MUT70.

SEQ ID NO: 24 последовательность мутанта MUT71.

SEQ ID NO: 25 последовательность мутанта MUT72.

SEQ ID NO: 26 последовательность мутанта MUT74.

SEQ ID NO: 27 последовательность мутанта MUT75.

SEQ ID NO: 28 последовательность мутанта MUT78.

SEQ ID NO: 29 последовательность мутанта MUT79.

Содержание документов, приведенных в данной заявке, включено посредством ссылки во всей своей полноте.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения будут описаны в следующих примерах, которые приведены с целью иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Примеры

Пример 1: Получение укороченных форм CGS1, использованных в качестве исходного материала для получения мутантов

Ген CGS1-4 является синтетическим геном. Синтез проводили с помощью MWG Eurofins оперона (Ebersberg) с использованием алгоритма GENEius с целью оптимизации

частоты встречаемости кодонов для улучшения экспрессии гена в *S. cerevisiae*. Таблица частоты встречаемости кодонов *S. cerevisiae* была взята из базы данных частоты встречаемости кодонов Kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Укороченные формы CGS1-5 и CGS1-1 были подготовлены методом ПЦР с использованием CGS1-4 в качестве

матрицы, с прямыми олигонуклеотидами

GTACCGCTCGAGATGGTTGCTGGTAAGTGGTCTAACAATC для CGS1-5 и

GTACCGCTCGAGATGTCTGTTCAATTGACCGATTCTAAG для CGS1-1. Для обеих форм CGS1-5 и CGS1-1, был использован одинаковый обратный олигонуклеотид

AGTACGGGATCCTCAAATGGCTTCCA. Описанные укороченные модифицированные

формы CGS1 схематически показаны на Фигуре 3.

Пример 2: Получение мутантов укороченных форм CGS1

Укороченные формы генов CGS1 были клонированы в плазмиду pAL06, дрожжевой репликативный вектор получен из вектора pRS316 (Sikorski RS & Hieter П., Genetics 1989, 122: 19-27). Плазмида pAL06 обеспечивает возможность экспрессии клонированного гена под контролем сильного дрожжевого промотора TEFL. CGS1 библиотеки, были генерированы путем гипермутагенной ПЦР с разными концентрациями дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) с использованием протокола, описанного Vartanian JP et al., (Nucleic Acids Res. 1996 24: 2627-2631).

Оба различия в концентрациях: [дТТФ] больше [дЦТФ] и [дГТФ] больше [дАТФ] были использованы в мутагенных ПЦР. Либо $[дТТФ]/[дЦТФ]=[дГТФ]/[дАТФ]=1000$ мкМ/200 мкМ или $[дТТФ]/[дЦТФ]=[дГТФ]/[дАТФ]=1000$ мкМ/150 мкМ были использованы в присутствии 0,5 мМ $MnCl_2$.

Пример 3: Скрининг мутантов, которые могут производить L-метионин из О-фосфо-L-гомосерина и метантиола

Штаммы дрожжей YA247-5A (MAT- α , ade2, his3, Ieu2, met2::loxP, met6::HIS3, trp1, ura3) или YA246-4A (MAT- α , ade2, his3, Ieu2, met2::loxP, met6::HIS3, thr4::loxP, trp1, ura3) были трансформированы CGS1 библиотеками в минимальной среде, содержащей метионин, но не содержащей урацил, чтобы отобрать маркер плазмиды. После выращивания клеток в течение 48 часов клетки собирали, промывали и ресуспендировали в минимальной жидкой среде с метилмеркаптаном в качестве источника серы. Через 7 дней, культуры собирали и разводили в той же жидкой среде, до значения оптической плотности OD(оптическая плотность)₆₀₀ равного приблизительно 0,2. Проводили три последовательных цикла разведения.

Плазмиды, присутствующие в полученных в результате растущих дрожжевых клетках, были затем экстрагированы, амплифицированы в *E. coli*, и полученная ДНК использована для повторной трансформации штаммов YA247-5A (MAT- α , ade2, his3, Ieu2, met2::loxP, met6::HIS3, trp1, ura3) или YA246-4A (MAT- α , ade2, his3, Ieu2, met2::loxP, met6::HIS3, thr4::loxP, trp1, ura3). Затем трансформированные дрожжи были отобраны на твердой минимальной среде, содержащей метионин, но не содержащей урацил. Способность каждой колонии расти с метилмеркаптаном в качестве источника серы затем оценивали при выращивании отдельных клонов в жидкой среде, содержащей метантиол в качестве источника серы. В каждом цикле, плазмиды, содержащиеся в дрожжевых колониях, демонстрирующих лучшие темпы роста в присутствии метантиола, экстрагировали и секвенировали. Отобранными мутантами был трансформирован штамм YA247-5A для *in vitro* анализа, и мутанты были использованы в качестве исходных материалов для новой гипермутагенной ПЦР.

С использованием описанной выше процедуры скрининга (отбора) было выявлено большое количество мутантов CSG1, которые были способны расти на метантиоле в

качестве единственного источника серы, и которые, следовательно, как предполагают, имеют возможность конвертировать О-фосфо-L-гомосерин и метантиол в L-метионин. Были определены последовательности этих мутантов, и мутанты суммированы в следующей таблице 1A, где позиции мутаций указаны со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 3 (CGS 1-4). Мутанты также приведены на Фигурах 7A-D, в которых они сравниваются.

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 1А

5	Аминокислота	Положение	Мутация (и)
	P	10	L
	N	11	D
	Q	15	R
10	I	27	S
	A	30	T
	L	45	S
	S	47	T
	V	60	D
15	A	68	T
	F	150	L
	T	178	I
	D	183	E
	I	185	V
20	T	220	S
	M	232	L
	V	245	A
	A	257	T
25	N	259	D,S
	F	281	S
	F	275	L
	I	287	V,F
30	H	289	Y,R
	Y	324	F
	G	326	S
	P	358	T
	T	371	A
35	V	398	A
	P	405	S
	D	431	G
	I	436	T
40	I	457	L
	D	459	N
	P	470	S
	E	472	G
	A	508	G
45	I	507	V

Следующая таблица 1В перечисляет все проанализированные мутанты и указывает положения найденных мутаций по отношению к полной длине последовательности

SEQ ID NO: 1 (CGS1). Положение по отношению к соответствующей исходной последовательности указано в скобках.

Таблица 1 В

Мутант	Мутации	Исходная последовательность
MUT02	P412(356)T	1-4
MUT04	P66(10)L, I83(27)S, V116(60)D, Y380(324)F, I513(457)L	1-4
MUT13	M57(1)K, I88(32)M, I343(287)V, H345(289)R, P412(356)T, stop564(508)W	1-4
MUT18	P66(10)L, M288(232)L, V301(245)A, N315(259)D, P412(356)T, D487(431)G, I492(436)T	1-4
MUT19	N67(11)D, Q71(15)R, A86(30)T, L101(45)S, S103(47)T, A124(68)T, T234(178)I, P412(356)T, T427(371)A, D515(459)N	1-4
AD309	I88(1)M, P412(325)T	1-5
AD310	I88(1)M, V116(29)D, Y380(293)F, I513(426)L	1-5
AD311	I88(1)M, I343(256)V, H345(258)R, P412(325)T	1-5
AD312	I88(1)M, M288(201)L, V301(214)A, N315(228)D, P412(325)T, D487(400)G, I492(405)T	1-5
AD313	I88(1)M, L101(14)S, S103(16)T, A124(37)T, T234(147)I, P412(325)T, T427(340)A, D515(428)N	1-5
AD242	G160(1)M, P412(325)T	1-1
AD328	G160(1)M, M288(129)L, V301(142)A, N315(156)D, P412(253)T, D487(328)G, I492(333)T	1-1
AD329	G160(1)M, T234(75)I, P412(253)T, T427(268)A, D515(356)N	1-1
MUT24	G160(1)M, F206(47)L, A313(154)T, N315(156)S, F317(158)S, F331(172)L, H345(186)Y, P412(253)T, A562(403)G	1-1
MUT27	G160(1)M, I241(82)V, P412(253)T, P461(302)S	1-1
MUT67	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A, E528(369)G	1-1

MUT68	G160(1)M, F331(172)L, G382(223)S, P412(253)T, V452(293)A	1-1
MUT70	G160(1)M, T276(117)S, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A	1-1
MUT71	G160(1)M, D239(80)E, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A, I563(404)V	1-1
MUT72	G160(1)M, F331(172)L, I343(184)F, P412(253)T, V452(293)A, I563(404)V	1-1
MUT74	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A, P526(367)S	1-1
MUT75	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, I563(404)V	1-1
MUT78	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A	1-1
MUT79	G160(1)M, F331(172)L, I343(184)F, P412(253)T	1-1

Исходная последовательность 1-4 соответствует SEQ ID NO: 3.

Исходная последовательность 1-5 соответствует SEQ ID NO: 4.

Исходная последовательность 1-1 соответствует SEQ ID NO: 5.

В следующей таблице 1С перечислены все проанализированные мутанты, и указаны положения обнаруженных мутаций по отношению к последовательности SEQ ID NO: 3 (CGS1-4). Положение по отношению к соответствующей исходной последовательности указано в скобках.

Таблица 1С

Мутант	Мутации	Исходная последовательность
MUT02	P356T	1-4
MUT04	P10L, I27S, V60D, Y324F, I457L	1-4
MUT13	M1K, I32M, I287V, H289R, P356T, stop508W	1-4
MUT18	P10L, M232L, V245A, N259D, P356T, D431G, I436T	1-4
MUT19	N11D, Q15R, A30T, L45S, S47T, A68T, T178I, P356T, T371A, D459N	1-4

	AD309	I32(1)M, P356(325)T	1-5
5	AD310	I32(1)M, V60(29)D, Y324(293)F, I457(426)L	1-5
	AD311	I32(1)M, I287(256)V, H289(258)R, P356(325)T	1-5
	AD312	I32(1)M, M232(201)L, V245(214)A, N259(228)D, P356(325)T, D431(400)G, I436(405)T	1-5
10	AD313	I32(1)M, L45(14)S, S47(16)T, A68(37)T, T178(147)I, P356(325)T, T371(340)A, D459(428)N	1-5
	AD242	G104(1)M, P356(253)T	1-1
15	AD328	G104(1)M, M232(129)L, V245(142)A, N259(156)D, P356(253)T, D431(328)G, I436(333)T	1-1
	AD329	G104(1)M, T178(75)I, P356(253)T, T371(268)A, D459(356)N	1-1
20	MUT24	G104(1)M, F150(47)L, A257(154)T, N259(156)D, F261(158)S, F275(172)L, H289(186)Y, P356(253)T, A506(403)G	1-1
	MUT27	G104(1)M, I185(82)V, P356(253)T, P405(302)S	1-1
	MUT67	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A, E472(369)G	1-1
25	MUT68	G104(1)M, F275(172)L, G326(223)S, P356(253)T, V396(293)A	1-1
	MUT70	G104(1)M, T220(117)S, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A	1-1
30	MUT71	G104(1)M, D183(80)E, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A, I507(404)V	1-1
	MUT72	G104(1)M, F275(172)L, I287(184)F, P356(253)T, V396(293)A, I507(404)V	1-1
	MUT74	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A, P470(367)S	1-1
35	MUT75	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, I507(404)V	1-1
	MUT78	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A	1-1
40	MUT79	G104(1)M, F275(172)L, I287(184)F, P356(253)T	1-1

Пример 4:

Тест на ферментативную активность у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Экспрессия
любого из описанных выше мутантов в штаммах *Saccharomyces cerevisiae* YA247-5A
(MAT- α , ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, trp1, ura3) и YA246-4A (MAT- α , ade2, his3,
leu2, met2::loxP, met6::HIS3, thr4::loxP, trp1, ura3) избавляет штаммы от их ауксотрофии
по метионину.

Другими словами, при экспрессии любого из указанных выше мутантов, дрожжевые

штаммы YA247-5A и YA246-4A, дефектные по синтезу метионина, растут на минимальной среде с добавлением аденина, гистидина, лейцина, триптофана и урацила.

Экспериментальный дизайн теста:

Мутантные нуклеотидные последовательности были индивидуально клонированы в репликативную плазмиду pAL06 (производную от pRS316) ниже промотора транскрипции (pTEF1) и выше терминатора транскрипции (tADH1).

Полученные таким образом двенадцать плазмид, индивидуально трансформировали в дрожжевые штаммы YA247-5A и YA246-4A. Трансформанты выращивали в среде A (Difco™ азотистое основание дрожжей 6,7%, глюкоза 2%, аденин 0,3 мМ, лейцин 0,75 мМ, гистидин 1,3 мМ, триптофан 0,1 мМ), дополненной 0,2 мМ метионином.

Каждый из трансформантов затем засеивали ($OD_{590}=0,015$) в среду A, содержащую 0,5 мМ метионина, или среду A, содержащую 0,1 или 1 мМ метантиола.

Рост контролировали последующим измерением оптической плотности при 590 нм (OD_{590}). Соответствующий рост каждого клона в двух средах сравнивали с ростом отрицательных контролей YA246-4A или YA247-5A, трансформированных пустым вектором pAL06. В среде A с метионином, все проверенные штаммы имеют время генерации около 4 часов. Например, рост штамма YA246-4A, экспрессирующего мутанты CGS 1-4 (G84S), AD242, AD328, и контрольный вектор pAL06 показаны на Фигуре 4.

Рост в контексте накопления фосфогомосерина:

Рост штаммов на основе YA246-4A, которые накапливают фосфогомосерин и экспрессируют CGS1 белковые мутанты в среде A, содержащей 0,1 мМ метантиол, показан на Фигуре 5.

Во всех случаях, никакого роста не наблюдалось в контроле CGS1-4 (G84S) и для штаммов с плазмидой pAL06.

Для семейства CGS1-4 (Фигура 5A), время генерации составляет от 13 часов для MUT19 до 42 часов для MUT02. Для семейства CGS1-5 (Фигура 5B), время генерации составляет от 9.5 часов для AD312 и AD313 до 12.5 часов для AD310. Для семейства CGS1-1 (Фигура 5C), время генерации составляет около 9.5 часов для AD242, AD328 и AD329.

Рост в контексте ненакопления фосфогомосерина:

Рост штаммов на основе YA247-5A, которые не накапливают фосфогомосерин и экспрессируют CGS1 белковые мутанты в среде A, содержащей 1 мМ метантиол или 0,1 мМ метантиол, показан на Фигурах 6A и 6B соответственно.

С 1 мМ метантиолом не наблюдалось никакого роста для CGS1-1 и для отрицательного контроля, трансформированного пустым вектором pAL06. Время генерации составляет, приблизительно, 21 ч для AD242 или AD328, 10,5 часов для MUT27 и 8 часов для MUT24. С 0,1 мМ метантиолом рост наблюдается только с мутантами MUT24 и MUT27. Время генерации составляет соответственно 19 ч и 40 ч.

Пример 5: In vitro активность OPHS-зависимой метионинсинтазы

In vitro активность фермента, экспрессирующегося в дрожжах, была протестирована в неочищенном лизате дрожжей.

Вслед за проверкой активности осуществлялся мониторинг синтеза метионина в лизате, в присутствии O-фосфо-L-гомосерина (OPHS) и метантиола (CH_3SNa). Лизаты клеток дрожжей YA246-5A, YA246-5A, несущих пустую плазмиду pAL06, YA246-5A, экспрессирующего CGS1-4 и YA246-5A, экспрессирующего мутанты AD246, AD239, MUT24, MUT27, MUT67 или MUT79 сравнили.

Экспериментальная процедура:

Подготовка лизата

Дрожжевые клетки сначала выращивали в полной среде. Эту первую культуру высевали в 100 мл среды А ($OD_{590}=0,3$), которую инкубировали при 28°C при перемешивании в течение 16 часов.

Общее количество белка определяли с использованием анализа по Брэдфорду.

Чтобы начать реакцию, от 0,03 до 0,06 мг общего белка инкубировали при 37°C в 100 мМ Трис pH 8,0, 0,2 мМ пиридоксаль фосфата, 5 мМ CH_3SNa и 25 мМ OPHS в общем объеме 100 мкл в течение 15 минут. 10 мкл аликвоты реакционной смеси отбирали через 15 и 60 минут и реакцию останавливали добавлением 90 мкл хлорной кислоты. Количество метионина в этих аликвотах было определено с помощью ЖХ/МС (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) с использованием ^{13}C Met (метионин) в качестве внутреннего стандарта. Количество образованного метионина нормализовали количеством белка, используемого в исследовании.

Полученные результаты приведены в таблице 2:

Таблица 2

Активность ($nmol/min^{-1}/mg^{-1}$)		Стандартное отклонение
CGS1-4 (G84S)	Невыявленная	-
pAD242	142	± 13
pAD329	143	± 11
pMUT24	354	± 14
pMUT27	343	± 38
pMUT67	864	± 91
pMUT79	462	± 35

Пример 6: In vitro анализ для измерения гомоцистеинсинтазной активности

Гомоцистеинсинтазную активность ферментов, экспрессированных в дрожжах, измеряли путем in vitro анализа с использованием неочищенного лизата дрожжей. Вслед за проверкой активности осуществлялся мониторинг синтеза метионина в лизате в присутствии О-фосфо-L-гомосерина (OPHS) и метантиола (CH_3SNa). Лизаты из клеток дрожжей YA246-5A, несущие пустую плазмиду pAL06, YA246-5A, экспрессирующий CGS1-4 и YA246-5A, экспрессирующий мутанты AD242, AD328, MUT24, MUT27, MUT67 или MUT79 сравнивали.

Экспериментальная процедура: Получение лизата

Дрожжевые клетки сначала выращивали в полной среде. Эту первую культуру высевали в 100 мл среды А ($OD_{590}=0,3$), которую инкубировали при 28°C при перемешивании в течение 16 часов. Общее количество белка определяли с использованием анализа по Брэдфорду. Количество образованного гомоцистеина определяли колориметрическим методом.

Чтобы начать реакцию, от 0,03 до 0,06 мг общего белка инкубировали в 0,1 М Трис pH 8, 0,2 мМ пиридоксаль фосфате, 10 мМ Na_2S , 12,5 мМ OPHS в 100 мкл. Инкубировали 15 минут при 30°C.

Добавляли 500 мкл 1% $NaNO_2$ (растворенного в 0,4Н H_2SO_4) инкубировали в течение 5 минут.

Добавляли 100 мкл $NH_4SO_3NH_2$ и инкубировали в течение 2 минут.

Добавляли 750 мкл 1 объема HgCl_2 .

Добавляли 4 объема сульфаниламида.

Добавляли 2 объема N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида.

Инкубировали в течение 15 минут.

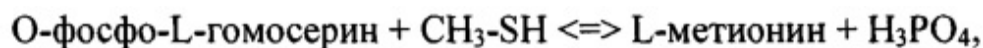
Измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (возрастает пропорционально количеству гомоцистеина, количество определяли путем сравнения с результатами, полученными с известным диапазоном гомоцистеина). Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Активность (нмоль/мин ⁻¹ /мг ⁻¹)		Стандартное отклонение
CGS1-4 (G84S)	Невыявленная	-
pAD242	18	± 4
pAD328	21	± 2
pMUT24	59	± 9
pMUT27	47	± 2
pMUT67	239	± 32
pMUT79	215	± 29

(57) Формула изобретения

1. Способ получения L-метионина, в котором О-фосфо-L-гомосерин (OPHS) и метантиол ферментативно превращают в L-метионин и H_3PO_4 согласно схеме реакции:



причем ферментативное превращение достигают путем использования OPHS-зависимой метионинсинтазы, представляющей собой белок, полученный из цистатионин-гамма-синтазы (КФ (код фермента) 2.5.1.48) в результате мутации, и OPHS-зависимая метионинсинтаза представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

(а) белка, содержащего любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29;

(b) белка, имеющего последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% любой из SEQ ID NO: от 6 до 29, и обладающего ферментативной активностью превращения О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 .

2. Способ по п.1, который осуществляют in vitro.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что его осуществляют путем использования микроорганизма, продуцирующего белок, который определен в п.1.

4. Применение белка, обладающего ферментативной активностью превращения О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 и который выбран из группы, состоящей из:

(а) белка, содержащего любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: от 6 до 29;

(b) белка, имеющего последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% любой из SEQ ID NO: от 6 до 29, и обладающего ферментативной активностью превращения О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 ;

для превращения О-фосфо-L-гомосерина и метантиола в L-метионин и H_3PO_4 .

5. Способ получения S-аденозилметионина, включающий способ получения L-метионина по любому из пп.1-3 и дополнительно включающий стадию превращения L-метионина в S-аденозилметионин.

5 6. Способ получения цистеина, включающий способ получения L-метионина по любому из пп.1-3 и дополнительно включающий стадию превращения L-метионина в цистеин.

7. Способ получения глутатиона, включающий способ получения L-метионина по любому из пп.1-3 и дополнительно включающий стадию превращения L-метионина в
10 глутатион.

8. Способ получения 2-оксо-4-метилтиобутаноата, включающий способ получения L-метионина по любому из пп.1-3 и дополнительно включающий стадию превращения L-метионина в 2-оксо-4-метилтиобутаноат.

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ADISSEO France S.A.S.

<120> Means and methods for the enzymatic production of L-methionine from O-phospho-L-homoserine and metanethiol

<130> U1661 PCT S3

<150> EP12 19 0150.8

<151> 2012-10-26

<160> 29

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 563

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

Met Ala Val Ser Ser Phe Gln Ser Pro Thr Ile Phe Ser Ser Ser Ser
1      5      10      15
Ile Ser Gly Phe Gln Cys Arg Ser Asp Pro Asp Leu Val Gly Ser Pro
20      25      30
Val Gly Gly Ser Ser Arg Arg Arg Val His Ala Ser Ala Gly Ile Ser
35      40      45
Ser Ser Phe Thr Gly Asp Gly Leu Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe
50      55      60
Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys
65      70      75      80
Ser Asn Ile Gly Val Ala Gln Ile Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn
85      90      95
Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser
100      105      110
Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala
115      120      125
Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val
130      135      140
Asp Glu Glu Val Val Val Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly
145      150      155      160
Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly
165      170      175
Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr
180      185      190
Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys
195      200      205
Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe
210      215      220
Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys
225      230      235      240
Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly
245      250      255
Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly
260      265      270
His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met
275      280      285
Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro
290      295      300
Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser
305      310      315      320
Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp
325      330      335
Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys
340      345      350
Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu

```

Страница 1

355 360 365
 Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His
 370 375 380
 Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn
 405 410 415
 Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val
 420 425 430
 Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala
 435 440 445
 His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro
 450 455 460
 Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val
 465 470 475 480
 Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp
 485 490 495
 Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser
 500 505 510
 Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu
 515 520 525
 Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe
 530 535 540
 Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu
 545 550 555 560
 Glu Ala Ile

<210> 2
 <211> 563
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
 Met Ala Val Ser Ser Phe Gln Ser Pro Thr Ile Phe Ser Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Ile Ser Gly Phe Gln Cys Arg Ser Asp Pro Asp Leu Val Gly Ser Pro
 20 25 30
 Val Gly Gly Ser Ser Arg Arg Val His Ala Ser Ala Gly Ile Ser
 35 40 45
 Ser Ser Phe Thr Gly Asp Gly Gly Leu Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe
 50 55 60
 Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys
 65 70 75 80
 Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn
 85 90 95
 Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val
 130 135 140
 Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly
 145 150 155 160
 Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly
 165 170 175
 Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr
 180 185 190
 Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys
 195 200 205
 Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe
 210 215 220
 Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys
 225 230 235 240
 Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly
 245 250 255
 Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly

Страница 2

His Ile Val 260 Thr Thr Asp Cys 265 Tyr Arg Lys Thr Arg 270 Ile Phe Met
 Glu Asn 275 Phe Leu Pro Lys Leu 280 Gly Ile Thr Val Thr 285 Val Ile Asp Pro
 Ala Asp 290 Ile Ala Gly Leu 295 Glu Ala Ala Val Asn 300 Glu Phe Lys Val Ser
 305 Leu Phe Phe Thr Glu Ser 310 Pro Thr Asn Pro Phe 315 Leu Arg Cys Val Asp
 Ile Glu Leu Val 325 Ser Lys Ile Cys His 330 Lys Arg Gly Thr 335 Leu Val Cys
 Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro 340 Leu Asn Gln Lys 345 Ala Leu Ala Leu
 Gly Ala Asp Leu Val Val His 350 Ser Ala Thr Lys Tyr 355 Ile Gly Gly His
 Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys 360 Ile Cys Gly Ser 365 Leu Lys Leu Val Ser
 370 Glu Ile Arg Asn Leu 375 His His Val Leu Gly 380 Pro Leu Asn Pro Asn
 Ala Ala Tyr Leu 385 Ile Ile Arg Gly Met 390 Lys Thr Leu His Leu Arg Val
 Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe 395 Arg Met Ala Glu Ile 400 Leu Glu Ala
 His Pro Lys Val Ser His Val 405 Tyr Tyr Pro Gly Leu 410 Pro Ser His Pro
 Glu His Glu Leu Ala Lys 415 Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val
 420 Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp
 Ser Leu Lys Ile 425 Pro Tyr Ile Ala Pro 430 Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser
 Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met 435 Ser Tyr Trp Asp Leu 440 Pro Gln Glu
 Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile 445 Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe
 Gly Val Glu Asp Phe Glu 450 Asp Val Lys Ala Asp 455 Ile Leu Gln Ala Leu
 545 Glu Ala Ile 550

<210> 3
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
 Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110
 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 555

Страница 3

Thr Thr Val Val 165 Leu Glu Asp Lys Ile 170 Ser Ala Leu Glu Gly 175
 Ser Thr Leu 180 Val Met Ala Ser Gly 185 Met Cys Ala Ser Thr 190 Val Met Leu
 Leu Ala 195 Leu Val Pro Ala Gly 200 Gly His Ile Val Thr 205 Thr Thr Asp Cys
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile 215 Phe Met Glu Asn Phe 220 Leu Pro Lys Leu Gly
 225 Ile Thr Val Thr Val 230 Ile Asp Pro Ala Asp 235 Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu 245 Phe Phe Thr Glu Ser 255 Pro Thr
 Asn Pro Phe 260 Leu Arg Cys Val Asp 265 Ile Glu Leu Val Ser 270 Lys Ile Cys
 His Lys 275 Arg Gly Thr Leu Val 280 Cys Ile Asp Gly Thr 285 Phe Ala Thr Pro
 Leu 290 Asn Gln Lys Ala Leu 295 Ala Leu Gly Ala Asp 300 Leu Val Val His Ser
 305 Ala Thr Lys Tyr Ile 310 Gly Gly His Asn Asp 315 Val Leu Ala Gly Cys Ile
 Cys Gly Ser Leu 325 Lys Leu Val Ser Glu 330 Ile Arg Asn Leu His 335 His Val
 Leu Gly Gly 340 Pro Leu Asn Pro Asn 345 Ala Ala Tyr Leu Ile 350 Ile Arg Gly
 Met Lys 355 Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn 365 Ser Thr Ala Phe
 370 Arg Met Ala Glu Ile Leu 375 Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr
 385 Tyr Pro Gly Leu Pro 390 Ser His Pro Glu His 395 Glu Leu Ala Lys Arg Gln
 Met Thr Gly Phe 405 Gly Gly Val Val Ser 410 Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile
 Glu Thr 420 Thr Ile Lys Phe Val Asp 425 Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala
 Pro Ser 435 Phe Gly Gly Cys Glu 440 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met
 450 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro 455 Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 Asp Asn Leu Val Arg 470 Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu 485 Ala Ile 495

<210> 4
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4
 Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser
 1 Ala Ala Ala Ala 5 Ala Ala Thr Ser Ser 10 Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala
 20 Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser 25 Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala
 35 Ala Pro Pro Val Val Leu Lys 40 Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
 50 Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys 55 Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser
 65 Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser 70 Leu Thr Val His Ala Gly
 85 Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr 90 Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
 100 Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe 105 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
 115 Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn
 120 125

Страница 4

130 135 140
 Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala
 145 150 155 160
 Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
 165 170 175
 Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp
 180 185 190
 Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
 195 200 205
 Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
 210 215 220
 Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Thr Glu Ser Pro
 225 230 235 240
 Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
 245 250 255
 Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 265 270
 Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 280 285
 Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
 290 295 300
 Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 330 335
 Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 345 350
 Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
 355 360 365
 Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 375 380
 Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
 385 390 395 400
 Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
 405 410 415
 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile
 420 425 430
 Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
 435 440 445
 Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
 450 455 460
 Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 465 470 475

<210> 5
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

Страница 5

130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300
 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335
 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350
 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 370 375 380
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Ala Ile

<210> 6
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6
 Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110
 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 165 170 175
 Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu
 180 185 190
 Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu

Страница 6

195 200 205
 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr
 260 265 270
 Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys
 275 280 285
 His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro
 290 295 300
 Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser
 305 310 315 320
 Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile
 325 330 335
 Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val
 340 345 350
 Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly
 355 360 365
 Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe
 370 375 380
 Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln
 405 410 415
 Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile
 420 425 430
 Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala
 435 440 445
 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met
 450 455 460
 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 470 475 480
 Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 485 490 495
 Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 500 505

<210> 7
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 7
 Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ser Ser Val Ala Gln Ile
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Asp Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110
 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 165

Страница 7

Thr Thr Val Val 165 Leu Glu Asp Lys Ile 170 Ser Ala Leu Glu Gly 175
 Ser Thr Leu Val 180 Met Ala Ser Gly 185 Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu
 Leu Ala Leu Val 195 Pro Ala Gly 200 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys
 Tyr Arg Lys Thr Arg 215 Phe Met Glu Asn Phe 220 Leu Pro Lys Leu Gly
 225 Ile Thr Val Thr Val 230 Ile Asp Pro Ala Asp 235 Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr
 Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp 265 Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys
 His Lys Arg Gly Thr Leu Val 280 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro
 Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp 300 Leu Val Val His Ser
 305 Ala Thr Lys Phe Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile
 Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu 330 Ile Arg Asn Leu His His Val
 Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly
 Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe
 370 Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr
 385 Tyr Pro Gly Leu Pro 390 Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln
 Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile
 Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala
 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu 440 Ser Leu Val Asp Gln 445 Pro Ala Ile Met
 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 Lys Ala Asp Ile 485 Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 500 505

<210> 8
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8
 Lys Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Met
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110
 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 Страница 8

130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 165 170 175
 Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu
 180 185 190
 Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu
 195 200 205
 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr
 260 265 270
 Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Val Cys
 275 280 285
 Arg Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro
 290 295 300
 Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser
 305 310 315 320
 Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile
 325 330 335
 Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val
 340 345 350
 Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly
 355 360 365
 Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe
 370 375 380
 Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln
 405 410 415
 Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile
 420 425 430
 Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala
 435 440 445
 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met
 450 455 460
 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 470 475 480
 Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 485 490 495
 Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile Trp Gly Ser Thr Ser
 500 505 510
 Ser Arg Ala Ala Ala Ala Val Gly Glu Phe Leu Met Ile Tyr Asp
 515 520 525
 Phe Tyr Tyr
 530

<210> 9
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9
 Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 Страница 9

65 Pro Pro Val Val Leu 70 Lys Ser Val Asp Glu 75 Glu Val Val Val Ala 80 Glu
 Glu Gly Ile Arg 85 Glu Lys Ile Gly Ser 90 Val Gln Leu Thr Asp 95 Ser Lys
 His Ser Phe 100 Leu Ser Ser Asp Gly 105 Ser Leu Thr Val His 110 Ala Gly Glu
 Arg Leu Gly 115 Arg Gly Ile Val 120 Thr Asp Ala Ile Thr 125 Thr Pro Val Val
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe 135 Lys Lys Thr Ala 140 Glu Leu Ile Asp Phe
 Lys Glu Lys Arg Ser 150 Val Ser Phe Glu Tyr 155 Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 Thr Thr Val Val 165 Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu
 Ser Thr Leu Val 180 Met Ala Ser Gly 185 Met Cys Ala Ser Thr 190 Val Met Leu
 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly 200 Gly His Ile Val Thr 205 Thr Thr Asp Cys
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe 215 Leu Glu Asn Phe 220 Leu Pro Lys Leu Gly
 Ile Thr Val Thr Ala 230 Ile Asp Pro Ala Asp 235 Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 Ala Val Asp Glu 245 Phe Lys Val Ser Leu 250 Phe Phe Thr Glu Ser 255 Pro Thr
 Asn Pro Phe 260 Leu Arg Cys Val Asp 265 Ile Glu Leu Val Ser 270 Lys Ile Cys
 His Lys Arg Gly Thr Leu Val 280 Cys Ile Asp Gly Thr 285 Phe Ala Thr Pro
 Leu Asn Gln Lys Ala Leu 295 Ala Leu Gly Ala Asp 300 Leu Val Val His Ser
 Ala Thr Lys Tyr Ile 310 Gly Gly His Asn Asp Val 315 Leu Ala Gly Cys Ile
 Cys Gly Ser Leu 325 Lys Leu Val Ser Glu 330 Ile Arg Asn Leu His His Val
 Leu Gly Gly Thr 340 Leu Asn Pro Asn 345 Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly
 Met Lys Thr Leu His Leu Arg 355 Val Gln Gln Gln Asn 360 Ser Thr Ala Phe
 Arg Met Ala Glu Ile Leu 375 Glu Ala His Pro Lys 380 Val Ser His Val Tyr
 Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu 395 His Glu Leu Ala Lys Arg Gln
 Met Thr Gly Phe 405 Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Gly Ile
 Glu Thr Thr Thr Lys Phe Val Asp 420 Ser Leu Lys Ile Pro 425 Tyr Ile Ala
 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu 440 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met
 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu 455 Lys Tyr Gly Ile Lys
 Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val 470 Glu Asp Phe Glu Asp Val
 Lys Ala Asp Ile 485 Leu Gln Ala Leu Glu 490 Ala Ile 495

<210> 10
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 10
 Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asp Phe Val Arg Arg Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Thr Gln Ile
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ala
 Страница 10

35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Thr Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110
 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 165 170 175
 Thr Ile Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu
 180 185 190
 Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu
 195 200 205
 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr
 260 265 270
 Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys
 275 280 285
 His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro
 290 295 300
 Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser
 305 310 315 320
 Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile
 325 330 335
 Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val
 340 345 350
 Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly
 355 360 365
 Met Lys Ala Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe
 370 375 380
 Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln
 405 410 415
 Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile
 420 425 430
 Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala
 435 440 445
 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asn Gln Pro Ala Ile Met
 450 455 460
 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 470 475 480
 Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 485 490 495
 Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 500 505

<210> 11
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11
 Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser
 Страница 11

```

1      5      10      15
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala
20      25      30
Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala
35      40      45
Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
50      55      60
Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser
65      70      75      80
Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly
85      90      95
Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
100      105      110
Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
115      120      125
Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn
130      135      140
Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala
145      150      155      160
Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
165      170      175
Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp
180      185      190
Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
195      200      205
Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
210      215      220
Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
225      230      235      240
Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
245      250      255
Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
260      265      270
Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
275      280      285
Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
290      295      300
Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
305      310      315      320
Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
325      330      335
Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Asn Ser Thr Ala
340      345      350
Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
355      360      365
Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
370      375      380
Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
385      390      395      400
Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
405      410      415
Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile
420      425      430
Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
435      440      445
Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
450      455      460
Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
465      470      475

```

<210> 12
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 12
 Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser
 Страница 12

```

1      5      10      15
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Asp Ser Ser Ala
20      25      30
Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala
35      40      45
Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
50      55      60
Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser
65      70      75      80
Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly
85      90      95
Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
100      105      110
Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
115      120      125
Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn
130      135      140
Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala
145      150      155      160
Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
165      170      175
Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Asp
180      185      190
Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
195      200      205
Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
210      215      220
Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
225      230      235      240
Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
245      250      255
Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
260      265      270
Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
275      280      285
Ser Ala Thr Lys Phe Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
290      295      300
Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
305      310      315      320
Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
325      330      335
Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
340      345      350
Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
355      360      365
Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
370      375      380
Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
385      390      395      400
Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
405      410      415
Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Leu Val Asp Gln Pro Ala Ile
420      425      430
Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
435      440      445
Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
450      455      460
Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
465      470      475

```

<210> 13
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 13
 Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser
 Страница 13

```

1      5      10      15
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala
20      25      30
Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala
35      40      45
Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
50      55      60
Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser
65      70      75      80
Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly
85      90      95
Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
100      105      110
Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
115      120      125
Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn
130      135      140
Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala
145      150      155      160
Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
165      170      175
Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Asp
180      185      190
Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
195      200      205
Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
210      215      220
Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
225      230      235      240
Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Val
245      250      255
Cys Arg Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
260      265      270
Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
275      280      285
Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
290      295      300
Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
305      310      315      320
Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
325      330      335
Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
340      345      350
Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
355      360      365
Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
370      375      380
Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
385      390      395      400
Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
405      410      415
Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile
420      425      430
Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
435      440      445
Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
450      455      460
Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
465      470      475

```

<210> 14
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 14
 Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser
 Страница 14

1 Ala Ala Ala 5 Ala Ala Thr Ser 10 Ala Ser Ala Val 15 Ser Ala
 Ala Ser Ala 20 Ala Ala Ser Ser 25 Ala Ala Ala Ala 30 Val Ala Ala
 Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
 50 Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val 60 Gln Leu Thr Asp Ser
 65 Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser 75 Leu Thr Val His Ala Gly
 85 Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
 100 Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe 105 Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
 115 Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val 120 Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn
 130 Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser 140 Ala Leu Glu Gly Ala
 145 Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
 165 Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Asp
 180 Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe 185 Leu Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
 195 Gly Ile Thr Val Thr Ala Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
 210 Ala Ala Val Asp Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
 225 Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
 245 Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly 280 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
 290 Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
 355 Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Gly
 385 Ile Glu Thr Thr Thr Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
 405 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile
 420 Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
 435 Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
 450 Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 465 470 475

<210> 15
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 15
 Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Ser Pro Thr
 Страница 15

1 Ala Ala Ala Ala 5 Ala Ala Thr Ser Ser 10 Ala Ser Ala Val Ser 15 Ser Ala
 Ala Ser Ala Ala 20 Thr Ala Ser Ser 25 Ala Ala Ala Ala Pro 30 Val Ala Ala
 Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
 50 Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser
 65 Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly
 85 Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
 100 Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
 115 Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val 120 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn
 130 Pro Thr Ile Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala
 145 Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
 165 Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp
 180 Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
 195 Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
 210 Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
 225 Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
 245 Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
 290 Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 Gly Met Lys Ala Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
 355 Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
 385 Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
 405 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asn Gln Pro Ala Ile
 420 Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
 435 Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
 450 Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 465 470 475

<210> 16
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 16
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 Страница 16

```

1      5      10      15
Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
20      25      30
Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
35      40      45
Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
50      55      60
Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
65      70      75      80
Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
85      90      95
Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
100      105      110
Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
115      120      125
Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
130      135      140
Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
145      150      155      160
Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
165      170      175
Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
180      185      190
Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
195      200      205
Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
210      215      220
His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
225      230      235      240
Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
245      250      255
Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
260      265      270
Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
275      280      285
Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
290      295      300
Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
305      310      315      320
Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
325      330      335
Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
340      345      350
Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
355      360      365
Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
370      375      380
Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
385      390      395      400
Leu Glu Ala Ile

```

```

<210> 17
<211> 404
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

```

```

<400> 17
Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
1      5      10      15
Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
20      25      30
Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
35      40      45
Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
50      55      60
Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
375      380      385
Страница 17

```

65 Lys Ile Ser Ala Leu 70 Glu Gly Ala Glu Ser 75 Thr Leu Val Met Ala 80
 Gly Met Cys Ala 85 Ser Thr Val Met Leu 90 Leu Ala Leu Val Pro 95 Ala Gly
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp 100 Cys Tyr Arg Lys Thr 105 Arg Ile Phe
 Leu Glu Asn Phe Leu Pro Lys 110 Gly Ile Thr Val Thr 115 Ala Ile Asp
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly 120 Leu Glu Ala Ala Val Asp 125 Glu Phe Lys Val
 130 Ser Leu Phe Phe Thr 135 Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
 145 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr 150 Pro Leu Asn Gln Lys 155 Ala Leu Ala
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 160 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 165 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 170 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 175 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 180 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 185 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 190 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Gly Ile Glu Thr Thr Thr Lys Phe Val
 195 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 200 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 205 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 210 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 215 Leu Glu Ala Ile

<210> 18
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 18
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 5 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 10 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 15 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Ile Val Val Leu Glu Asp
 20 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 25 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu 30 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 35 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 40 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

Страница 18

130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Ala Leu His Leu Arg
 260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300
 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335
 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350
 Ser Ile Val Asn Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 370 375 380
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Ala Ile

<210> 19
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 19
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Leu Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Thr Val Ser Glu Ser Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys Tyr Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

Страница 19

195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300
 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335 340
 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 345 350 355
 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 360 365 370
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 375 380 385
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 390 395 400
 Leu Glu Gly Ile

<210> 20
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 20
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Lys Val Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg

Страница 20

Val Gln Gln 260 Phe Arg Met Ala Glu 270
 275 Gln Asn Ser Thr Ala 280 Tyr Tyr Pro Gly Ile Leu Glu
 Ala His 290 Pro Lys Val Ser His 295 Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Ser Ser His
 300 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 Val Ser Phe Glu Ile 310 Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 320 Asp Ser Leu Lys 325 Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 330 Ser Ile Val 340 Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 345 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly 360 Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 365 Phe Gly Val Glu Asp Phe 375 Glu Asp Val Lys Ala 380 Ile Leu Gln Ala
 385 Leu Glu Ala Ile 390 395 400

<210> 21
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 21
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu 10 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 15 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 20 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 25 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr 35 Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 30 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 35 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 40 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 45 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys 55 Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 50 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 55 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 60 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys 65 His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 65 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 70 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 75 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 80 Ser Glu Ile Arg Asn 85 Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 85 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 90 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 95 Ala His 100 Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 105 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 110 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 115

Страница 21

Asp Ser Leu Lys 325 Ile Pro Tyr Ile Ala 330 Pro Ser Phe Gly Gly 335 Cys Glu
 Ser Ile Val 340 Asp Gln Pro Ala Ile 345 Met Ser Tyr Trp Asp 350 Leu Pro Gln
 Gly Glu Arg Leu Lys Tyr Gly 360 Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 Phe Gly Val Glu Asp Phe 375 Glu Asp Val Lys Ala 380 Asp Ile Leu Gln Ala
 Leu Glu Ala Ile 390 395 400

<210> 22
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 22
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 5 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 10 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 15 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 20 65 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 25 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 30 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 35 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys 120 Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 40 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 45 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 50 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 55 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 60 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Ser Gly
 65 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 70 225 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 75 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 80 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 85 Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 90 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 95 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 100 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 105 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 110 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 115 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 120

Страница 22

385 390 395 400
 Leu Glu Ala Ile

<210> 23
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 23
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Ser Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 240 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300
 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335
 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350
 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 370 375 380
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Ala Ile

<210> 24
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 24
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Glu
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270
 Val Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300
 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335
 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350
 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 370 375 380
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Ala Val

<210> 25
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 25
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 Страница 24

```

      35      40      45
Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
65 70 75 80
Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
85 90 95
Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
100 105 110
Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
115 120 125
Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
130 135 140
Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
145 150 155 160
Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
165 170 175
Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Phe Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
180 185 190
Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
195 200 205
Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
210 215 220
His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
225 230 235 240
Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
245 250 255
Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
260 265 270
Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
275 280 285
Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
290 300
Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
305 310 315 320
Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
325 330 335
Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
340 345 350
Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
355 360 365
Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
370 375 380
Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
385 390 395 400
Leu Glu Ala Val

```

<210> 26
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

```

<400> 26
Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
1 5 10 15
Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
20 25 30
Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
35 40 45
Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
50 55 60
Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
65 70 75 80
Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
85 90 95
Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly

```

Страница 25

```

      100      105      110
Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
      115      120      125
Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
      130      135      140
Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
      145      150      155
Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
      160      165      170      175
Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
      180      185      190
Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
      195      200      205
Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
      210      215      220
His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
      225      230      235      240
Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
      245      250      255
Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
      260      265      270
Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
      275      280      285
Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
      290      295      300
Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
      305      310      315      320
Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
      325      330      335
Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
      340      345      350
Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Ser Gln
      355      360      365
Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
      370      375      380
Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
      385      390      395      400
Leu Glu Ala Ile

```

<210> 27
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

```

<400> 27
Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
1      5      10      15
Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
      20      25      30
Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
      35      40      45
Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
      50      55      60
Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
      65      70      75      80
Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
      85      90      95
Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
      100      105      110
Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
      115      120      125
Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
      130      135      140
Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
      145      150      155      160
Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val

```

Страница 26

```

      165      170      175
Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
      180      185      190
Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
      195      200      205
Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
      210      215      220
His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
      225      230      235
Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
      240      245      250
Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
      255      260      265
Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
      270      275      280
Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
      285      290      295
Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
      300      305      310
Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
      315      320      325
Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
      330      335      340
Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
      345      350      355
Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
      360      365      370
Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
      375      380      385
Leu Glu Ala Val
      390      395      400

```

<210> 28
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

```

<400> 28
Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
1      5      10      15
Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
      20      25      30
Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
      35      40      45
Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
      50      55      60
Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
      65      70      75
Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
      80      85      90
Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
      95      100      105
Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
      110      115      120
Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
      125      130      135
Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
      140      145      150
Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
      155      160      165
Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
      170      175      180
Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
      185      190      195
Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
      200      205      210
His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
      215      220

```

Страница 27

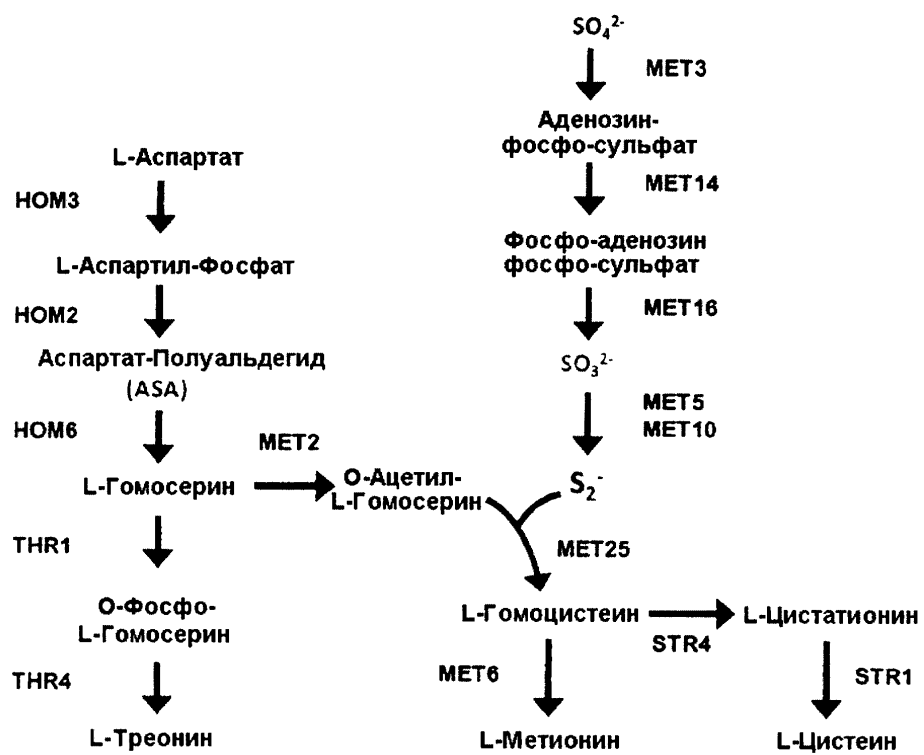
225 Ser Glu Ile Arg Asn 230 Leu His His Val Leu 235 Gly Gly Thr Leu Asn 240 Pro
 Asn Ala Ala Tyr 245 Leu Ile Ile Arg Gly 250 Met Lys Thr Leu His 255 Leu Arg
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala 265 Phe Arg Met Ala Glu 270 Ile Leu Glu
 Ala His Pro Lys Ala Ser His 280 Tyr Tyr Pro Gly 285 Leu Pro Ser His
 Pro Glu His Glu Leu Ala 295 Lys Arg Gln Met Thr 300 Gly Phe Gly Gly Val
 305 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu 315 Thr Thr Ile Lys Phe Val
 Asp Ser Leu Lys 325 Ile Pro Tyr Ile Ala 330 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 Ser Ile Val 340 Asp Gln Pro Ala Ile 345 Met Ser Tyr Trp Asp 350 Leu Pro Gln
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly 360 Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu 375 Asp Val Lys Ala 380 Asp Ile Leu Gln Ala
 385 Leu Glu Ala Ile 390 395 400

<210> 29
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

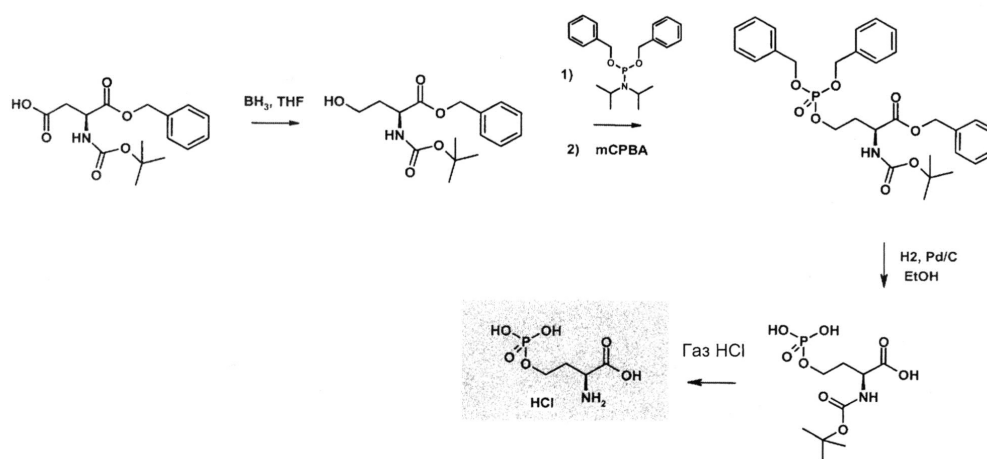
<400> 29
 Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 Thr Asp Ala 20 Ile Thr Thr Pro Val 25 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser 75 Thr Leu Val Met Ala Ser
 Gly Met Cys Ala 85 Ser Thr Val Met Leu 105 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val 140 Asn Glu Phe Lys Val
 Ser Leu Phe Phe Thr 150 Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Phe Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 Ser Glu Ile Arg Asn 230 Leu His His Val Leu 235 Gly Gly Thr Leu Asn 240 Pro
 Asn Ala Ala Tyr 245 Leu Ile Ile Arg Gly 250 Met Lys Thr Leu His 255 Leu Arg
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala 265 Phe Arg Met Ala Glu 270 Ile Leu Glu
 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His

Страница 28

	290				295				300					
Pro	Glu	His	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	Gln	Met	Thr	Gly	Phe	Gly	Gly
305					310					315				320
Val	Ser	Phe	Glu	Ile	Asp	Gly	Asp	Ile	Glu	Thr	Thr	Ile	Lys	Phe
				325					330					335
Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Pro	Tyr	Ile	Ala	Pro	Ser	Phe	Gly	Gly	Cys
			340					345					350	
Ser	Ile	Val	Asp	Gln	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Tyr	Trp	Asp	Leu	Pro
		355					360					365		Gln
Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Phe
	370					375					380			Ser
Phe	Gly	Val	Glu	Asp	Phe	Glu	Asp	Val	Lys	Ala	Asp	Ile	Leu	Gln
385					390					395				400
Leu	Glu	Ala	Ile											



Фигура 1

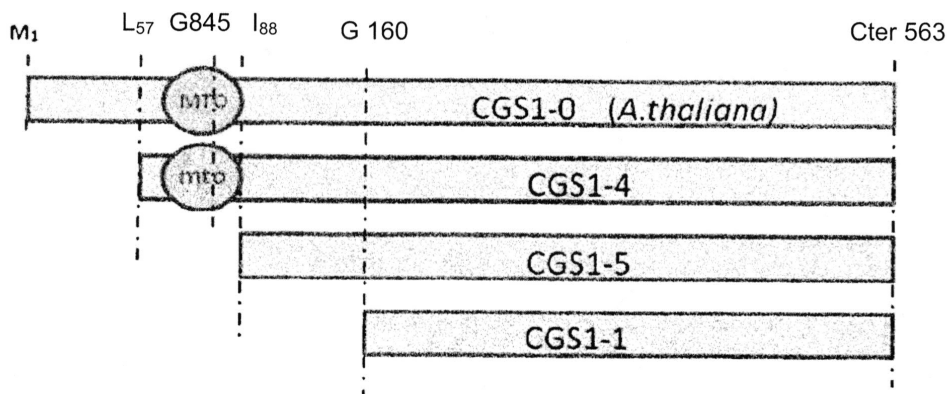


THF - тетрагидрофуран

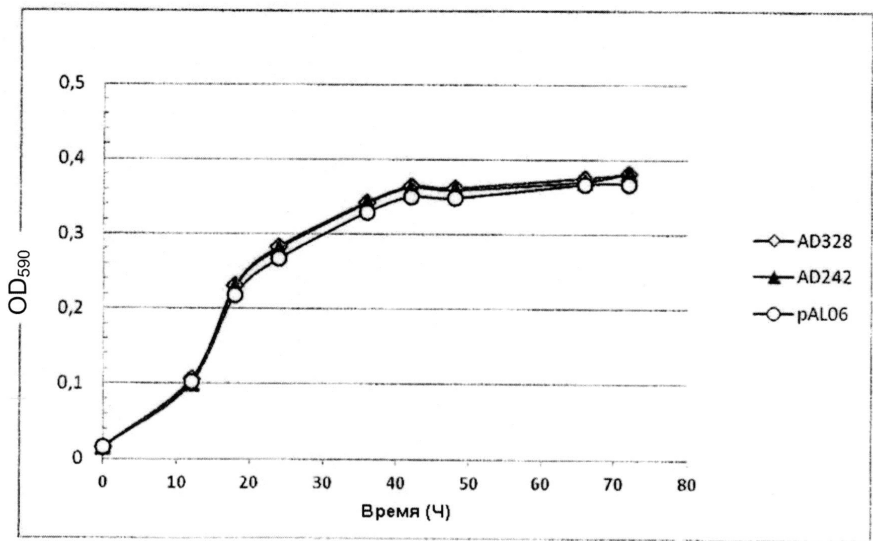
mCPBA – мета-хлорпероксибензойная кислота

Pd/C - палладиевая чернь

Фигура 2

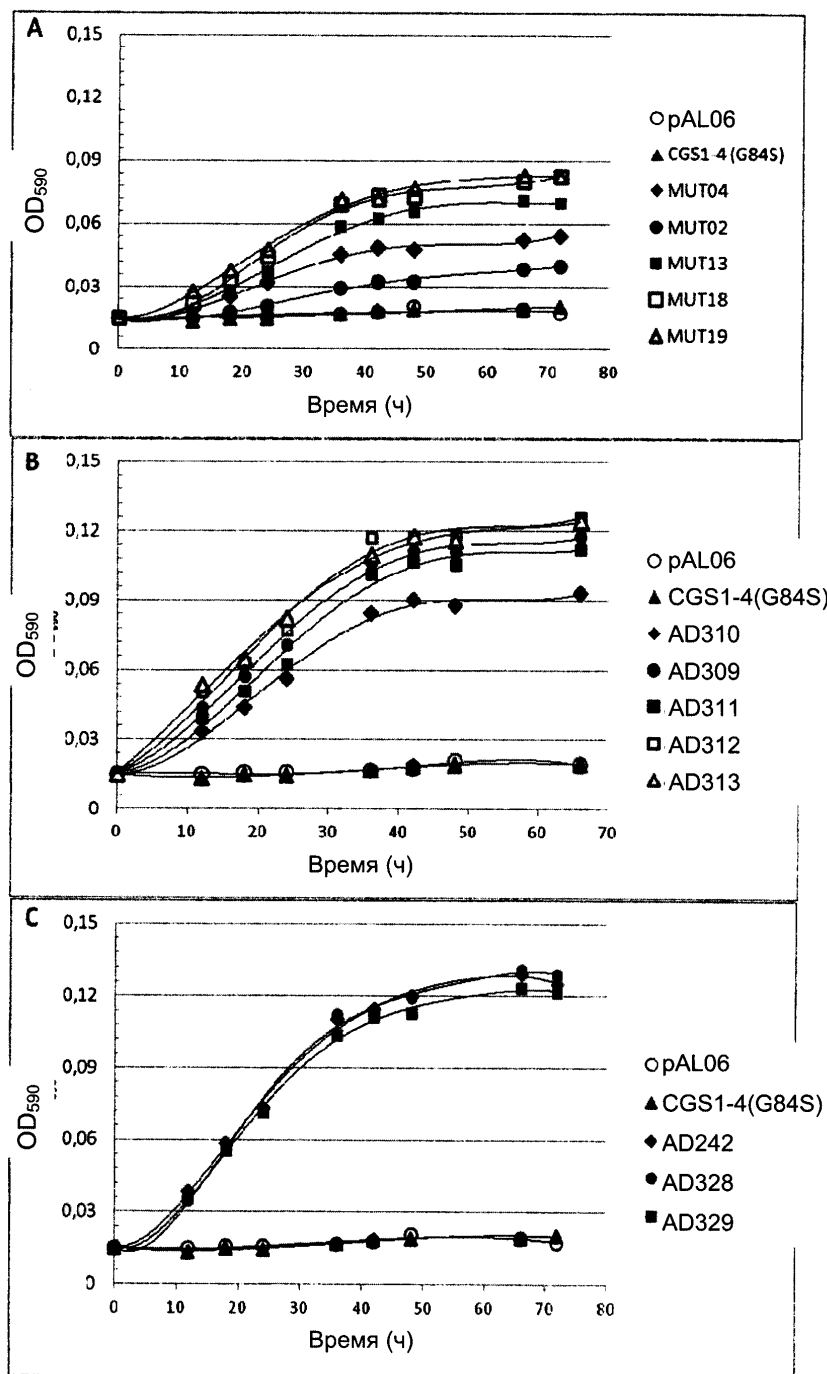


Фигура 3

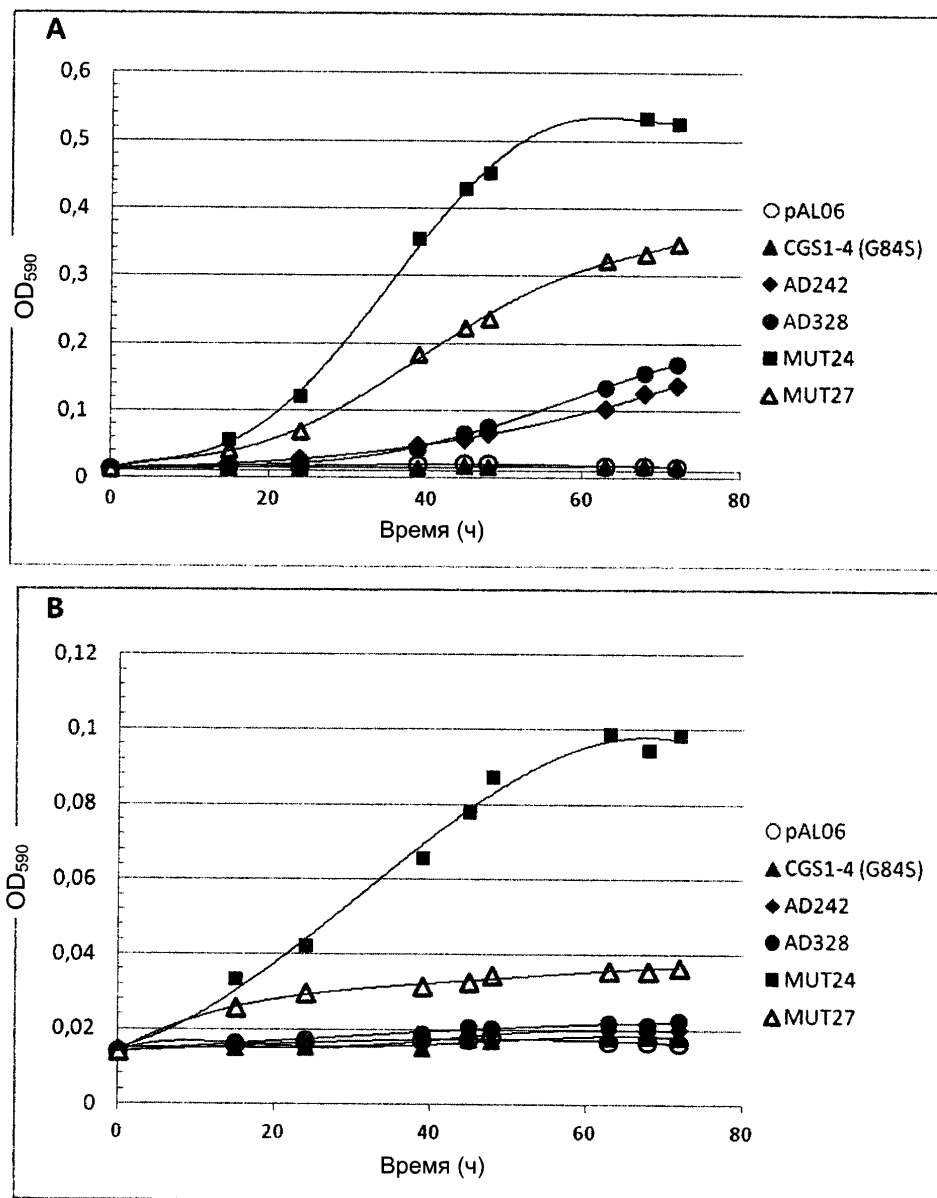


OD₅₉₀ – оптическая плотность

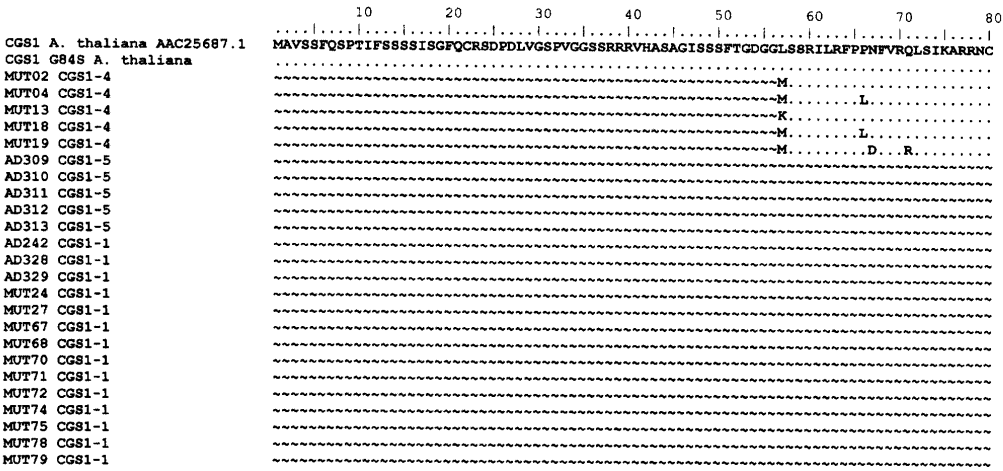
Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7А

```

90      100      110      120      130      140      150      160
CGS1 A. thaliana AAC25687.1 SNIGVQIVAGKWSNNPSSALPSAAAAATSSASAVSSAASAAAAASAAAAAFVAAAPPVLKSVDEEVVVAEEGIREKIG
CGS1 G848 A. thaliana      .S.....
MUT02 CGS1-4      .S.....
MUT04 CGS1-4      .SS.....D.....
MUT13 CGS1-4      .S...M.....
MUT18 CGS1-4      .S.....
MUT19 CGS1-4      .S.T.....T.....
AD309 CGS1-5      .M.....
AD310 CGS1-5      .M.....D.....
AD311 CGS1-5      .M.....
AD312 CGS1-5      .M.....
AD313 CGS1-5      .M.....S.T.....T.....
AD242 CGS1-1      .M.....
AD328 CGS1-1      .M.....
AD329 CGS1-1      .M.....
MUT24 CGS1-1      .M.....
MUT27 CGS1-1      .M.....
MUT67 CGS1-1      .M.....
MUT68 CGS1-1      .M.....
MUT70 CGS1-1      .M.....
MUT71 CGS1-1      .M.....
MUT72 CGS1-1      .M.....
MUT74 CGS1-1      .M.....
MUT75 CGS1-1      .M.....
MUT78 CGS1-1      .M.....
MUT79 CGS1-1      .M.....

```

Фигура 7А (продолжение)

	170	180	190	200	210	220	230	240
CGS1 A. thaliana AAC25687.1	SVQLTDSKHSFLSSD	GSGLTVRAGERLGRGIVTDAITTPVVNTSAYFFKKTAE	LIDFKEKRSVSFEYGRYGNPTTVLEDK					
CGS1 C848 A. thaliana								
MUT02 CGS1-4								
MUT04 CGS1-4								
MUT13 CGS1-4								
MUT18 CGS1-4								
MUT19 CGS1-4								
AD309 CGS1-5							I	
AD310 CGS1-5								
AD311 CGS1-5								
AD312 CGS1-5								
AD313 CGS1-5							I	
AD242 CGS1-1								
AD328 CGS1-1								
AD329 CGS1-1							I	
MUT24 CGS1-1				L				
MUT27 CGS1-1								
MUT67 CGS1-1								
MUT68 CGS1-1								
MUT70 CGS1-1								
MUT71 CGS1-1								
MUT72 CGS1-1							E	
MUT74 CGS1-1								
MUT75 CGS1-1								
MUT78 CGS1-1								
MUT79 CGS1-1								

Фигура 7B

	250	260	270	280	290	300	310	320
CGS1 A. thaliana AAC25687.1	ISALEGAESTLVMASGMCASTVMLLALVLPAGGHIVTTTDCYRKTRIFMENFLPKLGITVTVIDPADIAGLEAAVNEFKVS							
CGS1 G848 A. thaliana								
MUT02 CGS1-4								
MUT04 CGS1-4								
MUT13 CGS1-4								
MUT18 CGS1-4								
MUT19 CGS1-4					L		A	D
AD309 CGS1-5								
AD310 CGS1-5								
AD311 CGS1-5								
AD312 CGS1-5					L		A	D
AD313 CGS1-5								
AD242 CGS1-1								
AD328 CGS1-1					L		A	D
AD329 CGS1-1								
MUT24 CGS1-1								T.S.S.
MUT27 CGS1-1	V							
MUT67 CGS1-1								
MUT68 CGS1-1								
MUT70 CGS1-1					S			
MUT71 CGS1-1								
MUT72 CGS1-1								
MUT74 CGS1-1								
MUT75 CGS1-1								
MUT78 CGS1-1								
MUT79 CGS1-1								

Фигура 7В (продолжение)

	330	340	350	360	370	380	390	400
CGS1 A. thaliana AAC25687.1	L	F	F	T	E	S	P	T
CGS1 G84S A. thaliana	N	P	F	L	R	C	V	D
MUT02 CGS1-4	I	L	V	S	K	I	C	H
MUT04 CGS1-4	K	R	G	T	L	V	C	I
MUT13 CGS1-4	D	G	T	F	A	T	P	L
MUT18 CGS1-4	N	Q	K	A	L	A	L	G
MUT19 CGS1-4	A	D	L	V	V	H	S	A
AD309 CGS1-5	T	K	I	Y	I	G	G	H
AD310 CGS1-5	N	D	V	L	A	G	C	I
AD311 CGS1-5	C	G	S	L	K	L	V	S
AD312 CGS1-5								
AD313 CGS1-5								
AD242 CGS1-1								
AD328 CGS1-1								
AD329 CGS1-1								
MUT24 CGS1-1								
MUT27 CGS1-1								
MUT67 CGS1-1								
MUT68 CGS1-1								
MUT70 CGS1-1								
MUT71 CGS1-1								
MUT72 CGS1-1								
MUT74 CGS1-1								
MUT75 CGS1-1								
MUT78 CGS1-1								
MUT79 CGS1-1								

Фигура 7C

	410	420	430	440	450	460	470	480
CGS1 A. thaliana AAC25687.1								
CGS1 G848 A. thaliana	EIRNLHHVLGGPLNPNAAYLIIRG	MKTLHLRVQQONSTAF	RMAEILEAHPKVSHV	YYPGLPSHPEHELA	KRQMTG	PGGVV		
MUT02 CGS1-4	T.....							
MUT04 CGS1-4	T.....							
MUT13 CGS1-4	T.....							
MUT18 CGS1-4	T.....							
MUT19 CGS1-4	T.....		A					
AD309 CGS1-5	T.....							
AD310 CGS1-5	T.....							
AD311 CGS1-5	T.....							
AD312 CGS1-5	T.....							
AD313 CGS1-5	T.....		A					
AD242 CGS1-1	T.....							
AD328 CGS1-1	T.....							
AD329 CGS1-1	T.....		A					
MUT24 CGS1-1	T.....							
MUT27 CGS1-1	T.....							
MUT67 CGS1-1	T.....				A		S	
MUT68 CGS1-1	T.....				A			
MUT70 CGS1-1	T.....				A			
MUT71 CGS1-1	T.....				A			
MUT72 CGS1-1	T.....				A			
MUT74 CGS1-1	T.....				A			
MUT75 CGS1-1	T.....				A			
MUT78 CGS1-1	T.....				A			
MUT79 CGS1-1	T.....							

Фигура 7С (продолжение)

	490	500	510	520	530	540	550	560
CGS1 A. thaliana AAC25687.1	S	F	E	I	D	G	D	I
CGS1 G848 A. thaliana	E	T	T	I	K	F	V	D
MUT02 CGS1-4	S	L	K	I	P	Y	I	A
MUT04 CGS1-4	P	S	F	G	G	C	E	S
MUT13 CGS1-4	I	V	D	Q	P	A	I	M
MUT18 CGS1-4	S	Y	W	D	L	P	Q	E
MUT19 CGS1-4	E	R	L	K	Y	G	I	K
AD309 CGS1-5	D	N	L	V	R	F	S	F
AD310 CGS1-5	G	V	E	D	F	E	D	V
AD311 CGS1-5	K	A	D	I	L	Q	A	L
AD312 CGS1-5								
AD313 CGS1-5								
AD242 CGS1-1								
AD328 CGS1-1								
AD329 CGS1-1								
MUT24 CGS1-1								
MUT27 CGS1-1								
MUT67 CGS1-1								
MUT68 CGS1-1								
MUT70 CGS1-1								
MUT71 CGS1-1								
MUT72 CGS1-1								
MUT74 CGS1-1								
MUT75 CGS1-1								
MUT78 CGS1-1								
MUT79 CGS1-1								

Фигура 7D

[illegible]

Фигура 7D (продолжение)