(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0096761
(43) 공개일자 2023년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0065 (2013.01)
C12Y 111/01014 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0186596
(22) 출원일자 2021년12월23일
심사청구일자 2021년12월23일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
박주영
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

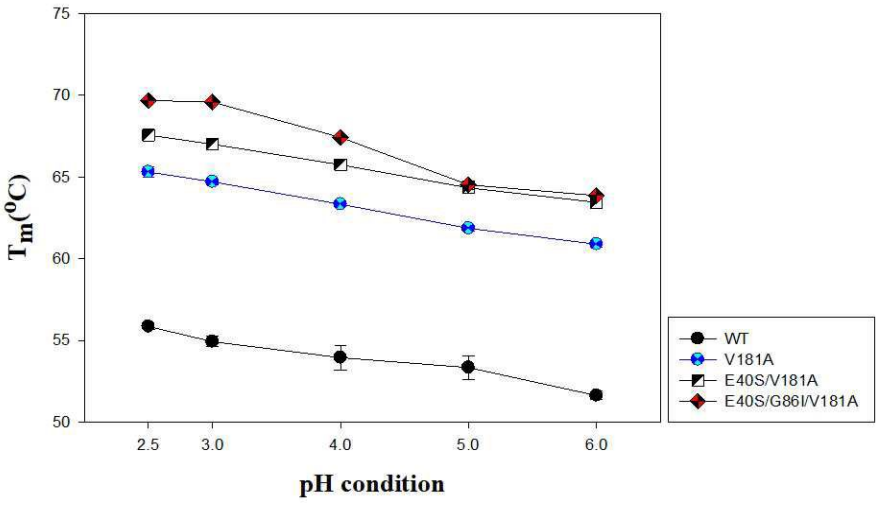
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **헴 단백질과 상호작용을 통해 열적 안정성이 증진된 리그닌 과산화효소 변이체**

(57) 요 약

열적 안정성이 증진된 리그닌 과산화효소(Lignin peroxidase) 변이체에 대한 것으로서, 헴 단백질과의 상호작용을 증진될 수 있도록 효소에 돌연변이를 유발하는 경우, 열적 안정성, 보관 안정성 및 효소의 활성이 증진되는 것을 확인하였다. 본 발명의 리그닌 과산화효소 변이체는 열적 안정성이 야생형 리그닌 과산화효소보다 현저히 증진되었기에, 효소를 활용한 산업 현장에서 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711132575
과제번호 2017M1A2A2087630
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명 바이오·화학 융복합 기술을 이용한 리그닌의 선택적 해중합을 통한 분해 중간체 생산 원천기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2021.01.20 ~ 2022.01.19
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711135278
과제번호 2020R1A5A1019631
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

비-천연 발생 또는 조작(Non-naturally occurring or engineered)된 리그닌 과산화효소 변이체로서, 상기 변이체는 A36R, E40S, G86S, G86I, V181A, H39A 및 V158F로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 헴(Heme) 단백질과의 상호작용이 증진된 것인, 과산화효소 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 리그닌 과산화효소는 PDB(Protein Data Bank) 번호가 1B82의 단백질 구조를 가지는 것인, 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 리그닌 과산화효소는 열 안정성이 증진된 것인, 변이체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 변이체의 돌연변이는 V181A, E40S 및 G86I로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 변이체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 상호작용은 염 다리(Salt bridge), 수소 결합(Hydrogen bond) 및 소수성 상호작용(Hydrophobic interaction)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 상호작용인 것인, 변이체.

청구항 6

리그닌 과산화효소에서 헴 단백질과 상호작용하는 아미노산을 확인하는 단계; 및

상기 헴 단백질과 상호작용하는 아미노산에 변이를 유발하는 단계;를 포함하는, 리그닌 과산화효소 변이체의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 상호작용은 헴(Heme) 단백질과의 염 다리(Salt bridge), 수소 결합(Hydrogen bond) 및 소수성 상호작용(Hydrophobic interaction)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 리그닌 과산화효소 변이체의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 헴 단백질과 상호작용이 증진된 효소 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 효소는 다양한 반응의 반응속도를 비약적으로 증가시킬 수 있는 생물촉매 단백질 분자이다. 효소의 높은 반응속도, 높은 선택성은 기존 화학촉매를 대체할 수 있는 효소의 장점이다.

[0004] 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase: LiP)는 식물 세포벽의 주요 구성 성분 중 하나인 리그닌을 생분해하는 효소로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 또한 페놀계 화합물과 비페놀계 화합물을 모두 분해할 수 있다.

[0005] 따라서, 리그닌 과산화효소를 산업에서 활용하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있으나, 효소를 실제 산업 현장에 적용하는데 걸림돌이 있는데 그 중의 하나가 낮은 열안정성이다. 효소는 높은 온도에서 비활성화되는데 그 이유는 주로 단백질의 접힘구조가 풀려서 고유의 3차 구조를 잃어버리기 때문이다. 높은 열안정성을 가지는 효소는 상기와 같은 문제점을 해결하여 산업 전반에 폭넓게 활용될 수 있으며, 저장 안정성 향상, 미생물 오염 방지, 반응속도 및 생산성의 증가 등의 다양한 이점이 있다.

[0006] 산업계의 요구에 따라 리그닌 과산화효소의 열적 안정성을 증진시키려는 노력이 계속되고 있으나(Biotechnology for biofuels, 2018. 11(1): p. 1-13), 미미한 수준의 열적 안정성의 증가만 확인하였을 뿐, 유의한 수준의 열적 안정성의 증가는 확인하지 못하였다. 따라서, 실제 산업현장에 활용할 수 있을 수준의 높은 열적 안정성을 가진 리그닌 과산화효소의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 비-천연 발생 또는 조작(Non-naturally occurring or engineered)된 리그닌 과산화효소 변이체로서, 상기 변이체는 A36R, E40S, G86S, G86I, V181A, H39A 및 V158F로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 헴(Heme) 단백질과의 상호작용이 증진된 것인, 과산화효소 변이체를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 리그닌 과산화효소에서 헴 단백질과 상호작용하는 아미노산을 확인하는 단계; 및 상기 헴 단백질과 상호작용하는 아미노산에 변이를 유발하는 단계;를 포함하는, 리그닌 과산화효소 변이체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 일 양상은 비-천연 발생 또는 조작(Non-naturally occurring or engineered)된 리그닌 과산화효소 변이체로서, 상기 변이체는 A36R, E40S, G86S, G86I, V181A, H39A 및 V158F로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 헴(Heme) 단백질과의 상호작용이 증진된 것인, 과산화효소 변이체를 제공한다.

[0014] 이 때, 상기 리그닌 과산화효소는 파네로케테 크리소스포리움 (Phanerochaete chrysosporium) 유래인 것일 수 있고, 자세히는 PcLiPO1(PDB: 1B82)일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "변이"는 리그닌 과산화효소의 신규한 헴(Heme) 단백질과의 상호작용에 참여하는

아미노산 서열의 변화를 의미하고, 구체적으로는, 폴리펩타이드의 서열에서 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함하는 의미로 사용된다. 일 경우로는, 음이온기 또는 양이온기를 가지는 아미노산의 부가일 수 있다.

[0016] 상기 “치환” 또는 “아미노산 치환”은 모계(parent) 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치의 아미노산을 다른 종의 아미노산으로 대체하는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0017] 가령, 폴리펩티드의 46번째 알라닌(Alanine 36, A36)을 아르기닌으로(Arginine 36, R36)으로 치환하는 경우, A36R로 표기할 수 있고, 상기 아미노산의 치환 결과 생성되는 결과물은 변이체 A36R로 표기할 수 있다.

[0018] 상기 “삽입” 또는 “아미노산 삽입”은 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치에 아미노산 첨가를 의미한다.

[0019] 상기 “결실” 또는 “아미노산 결실”은 폴리펩타이듸 서열 중 특정 위치의 아미노산 제거를 의미한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 “변이”는 아미노산의 치환임이 바람직하고, 자세히는, 헴 단백질과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기를 공지된 유전공학적인 기법을 이용하여 치환하는 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서에 사용되는 용어 “변이체”는, 대상 단백질을 구성하는 폴리펩타이드의 서열 중 적어도 하나의 아미노산의 서열이 변이된 단백질 또는 단백체를 의미한다. 자세히는, 리그닌퍼옥시데이즈의 아미노산 서열 중 어느 하나 이상의 변이가 일어남으로써 생성되는 단백질을 의미하는 것으로, 상기 변이와 관련하여 설명된 내용 중 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 생성되는 결과물을 의미한다. 가령, 변이체 V181A는 181번째 발린(Valine)이 알라닌(Alanine)으로 치환된 변이체를 의미한다. 2 이상의 변이가 일어난 변이체의 경우에는 슬래쉬(/)로 각각의 변이를 구분한다. 예를 들어, A123C/S49C는, 123번째 알라닌(Alanin 123, A123)이 시스테인(Cysteine 123,C123)으로 치환되고, 동시에 49번째 세린(Serine 49, S49)이 시스테인(Cysteine 49,C49)으로 치환되어 2 이상의 부위에서 아미노산이 각각 치환된 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에 있어서, "A36R"은 폴리펩티드의 36번째 알라닌(Alanine)이 아르기닌(Arginine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 1로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 8로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, "E40S"는 폴리펩티드의 40번째 글루탐산(Glutamic acid)이 세린(Serine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 2로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 9로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, "G86S"는 폴리펩티드의 86번째 글리신(Glycine)이 세린(Serine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 3으로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, "V181A"는 폴리펩티드의 181번째 발린(Valine)이 알라닌(Alanine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 4로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 11으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, "H39A"는 폴리펩티드의 39번째 히스티딘(Histidine)이 알라닌(Alanine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 5로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 12로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, "V158F"는 폴리펩티드의 158번째 발린(Valine)이 페닐알라닌(Phenylalanine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 6으로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, "G86I"는 폴리펩티드의 86번째 글리신(Glycine)이 이소류신(Isoleucine)으로 치환된 돌연변이를 의미하고, 서열번호 7로 표시되는 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 서열번호 14로 표시되는 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 리그닌 과산화효소는 A36R, E40S, G86S, G86I, V181A, H39A 및 V158F의 단독 돌연변이를 가지는 것일 수 있으며, E40S/V181A의 2개의 돌연변이를 가지는 것일 수 있으며, E40S/G86I/V181A의 3개의 돌연변이를 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 일 양태에 있어서, 상기 리그닌 과산화효소는 열 안정성이 증진된 것인, 변이체일 수 있다.

[0031] 다른 양태에 있어서, 상기 리그닌 과산화효소는 헴(Heme) 단백질을 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 또 다른 양태에 있어서, 상기 상호작용은 염 다리(Salt bridge), 수소 결합(Hydrogen bond) 및 소수성 상호작용(Hydrophobic interaction)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0033] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통하여, 본 발명의 리그닌 과산화효소 변이체가 현저히 증진된 열적 안정성을 가지는 것을 확인하였다.

[0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명자들은 높은 열적 안정성을 보이는 효소인 대두 과산화효소와 리그닌 과산화효소의 3D 구조를 분석하였다. 대두 과산화효소에는 헴 구조와 상호작용하나, 리그닌 과산화효소에는 헴 구조와 상호작용하지 않는 아미노산 잔기들을 확인하였으며(실시예 1 참조), 분석을 통해 확인한 아미노산 잔기에 돌연변이를 유도한 돌연변이 효소를 제작하였다(실시예 2 참조).

[0035] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 본 발명자들은 상기와 같이 제조한 돌연변이 효소의 열적 안정성을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행했을 때, 녹는점이 유의한 수준으로 증가하여 헴 구조와의 상호작용을 통해 효소의 열적 안정성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다(실시예 3 참조). 또한, 이러한 증진된 열적 안정성은 헴 구조와 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기가 증가할수록 더욱 높아지는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0036] 본 발명자들은 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 리그닌 과산화효소 돌연변이 변이체가 증진된 열적 안정성, 보관 안정성을 지니며 효소 활성 또한 오히려 증진된 것을 확인할 수 있었다.

[0037] 또 다른 양태로서, 리그닌 과산화효소에서 헴 단백질과 상호작용하는 아미노산을 확인하는 단계; 및 상기 헴 단백질과 상호작용하는 아미노산에 변이를 유발하는 단계;를 포함하는, 리그닌 과산화효소 변이체의 제조 방법을 제공한다.

[0038] 상기 상호작용은 염 다리(Salt bridge), 수소 결합(Hydrogen bond) 및 소수성 상호작용(Hydrophobic interaction)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 상호작용일 수 있다.

발명의 효과

[0040] 일 양상은 열적 안정성이 증진된 리그닌 과산화효소(Lignin peroxidase) 변이체에 대한 것으로서, 아미노산 잔기에 특정 돌연변이가 유발되어 열적 안정성이 현저히 증진되었기에, 효소를 활용하는 산업 현장에서 폭넓게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 대두 과산화효소에서 헴과 상호작용하는 잔기를 확인한 결과로서, 도 1a는 리그닌 과산화효소인 PcLiP01 및 대두 과산화효소의 구조를 중첩하여 헴과 상호작용하는 잔기를 확인한 결과이고, 도 1b 내지 1e는 헴과 친수성 상호작용하는 잔기를 확인한 결과이고, 도 1f는 헴과 소수성 상호작용하는 잔기를 확인한 결과이다.

도 2는 RT-PCR을 통해 리그닌 과산화효소 야생형 및 이의 돌연변이의 녹는점을 확인한 결과이다.

도 3은 pH 조건을 달리하면서 RT-PCR을 통해 야생형 리그닌 과산화효소 및 이의 돌연변이의 녹는점을 확인한 결과이다.

도 4는 pH 조건을 달리하면서 RT-PCR을 통해 야생형 리그닌 과산화효소 및 복수의 돌연변이 잔기를 가지는 리그닌 과산화효소의 녹는점을 확인한 결과이다.

도 5는 야생형 리그닌 과산화효소 및 돌연변이 잔기를 가지는 리그닌 과산화효소의 보관 안정성을 확인한 결과이다.

도 6은 야생형 리그닌 과산화효소 및 돌연변이 잔기를 가지는 리그닌 과산화효소의 효소활성 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 “포함한다(comprise, include)” 및/또는 “포함하는(comprising, including)”은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.

[0046] **[실시예]**

[0047] **실시예 1. 헴 구조와 상호작용하는 아미노산 잔기 확인**

[0048] 헴 단백질을 포함하고 있는 효소인 대두 과산화효소(Soybean peroxidase: SBP)는 식물에서 유래한 과산화효소 중 매우 열에 강한 특성을 가진다. 또한, 헴 구조를 효소에서 제거하는 경우, 절반이상으로 녹는점이 감소한다. 본 발명자들은 이러한 열에 대한 안정성이 효소와 헴 구조의 상호작용에 의해 발생하는 것으로 보아 실험을 진행하였다.

[0049] 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)는 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래 리그닌 과산화효소인 PcLiP01를 준비하였다. 이를 암호화하는 유전자는 Bioneer(한국)를 통해 준비하였다. 합성된 PcLiP01 유전자 서열은 암피실린 내성 pET-21b(+) 벡터에 Nde I 제한 부위와 EcoR I 부위를 통해 클로닝 되었으며, 대장균 BL21(DE3) 숙주 시스템으로 형질 전환되었다. 상기 벡터는 IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 유도성을 띄는 T7 프로모터가 포함되어 있다.

[0050] 상기 리그닌 과산화효소 및 대두 과산화효소(PDB: 1FHF)을 준비하여 실험을 수행하였다. 상기 두 효소의 3D 구조를 헴 단백질을 중심으로 중첩시킨 다음 확인하였다. 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같은 구조를 확인할 수 있었으며, 3D 구조를 분석하여 헴과 상호작용하는 잔기를 확인하였다. 그 결과, 도 1b 내지 도 1f에 나타낸 바와 같이, 대두 과산화효소의 R31, S35, S73, A174, A34 및 F152을 비롯한 아미노산 잔기는 각각 염다리 및 수소결합을 형성하여 헴 단백질의 카르복실기와 수소성 상호작용을 하는 것을 확인할 수 있었다. 리그닌 과산화효소의 경우, A36, E40, G86, V181, H39 및 V158을 비롯한 아미노산 잔기들이 헴 단백질과 상호작용하는 것을 확인하였다.

[0052] **실시예 2. 돌연변이 잔기를 가지는 효소의 제조**

[0053] 상기의 실시예 1에서 확인한 결과에 대한 비교분석을 수행하였다. 그 결과, 상기 효소들의 아미노산 잔기 중, 리그닌 과산화효소의 A36, E40, G86, V181, H39 및 V158 아미노산 잔기의 경우, 헴 구조와 상호작용을 보여주지 않으나, 대두 과산화효소에서는 헴 단백질과 상호작용하는 것을 확인하였으며, 구체적인 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0054]

SBP	Interaction type with heme in SBP	Overlapped site in PcLiP01	Interaction type with heme in PcLiP01
R31	Salt Bridge, Hydrogen Bond	A36	None
S35	Conventional Hydrogen Bond	E40	None
S73	Conventional Hydrogen Bond	G86	None
A174	Carbon Hydrogen Bond	V181	None
A34	Hydrophobic Interaction	H39	None
F152	Hydrophobic Interaction	V158	None

[0056] 상기 결과를 통해, 대두 과산화효소에서만 헴 단백질과의 상호작용을 보이는 아미노산 잔기에 돌연변이를 일으키는 경우, 효소의 열적 안정성을 증진시킬 수 있을 것으로 가설을 세웠다. 이에 기반하여, 리그닌 과산화효소(PcLiP01)에 A36R, E40S, G86S, V181A, H39A 및 V158F 돌연변이가 발생한 돌연변이 효소를 제작하였다.

[0058] **실시예 3. 돌연변이 아미노산 잔기를 가지는 효소의 열 안정성 확인**

[0059] 상기 실시예 2에서 제조한 돌연변이 효소의 녹는점을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. Real-Time PCR(RT-PCR)을 진행하면서 녹는점(Tm) 값을 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 돌연변이 효소는 야생형보다 열 안정성이 증진되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, pH를 달리하면서 녹는점을 확인하기 위하여 pH 값(pH 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 및 6.0)이 다른 0.1M Britton-Robinson 완충액을 사용하여 Real-Time PCR을 수행하였고, 시차 주사 형광 측정법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, H39A, E40S 및 V158F 돌연변이체의 녹는점은 pH 3.0에서 각각 58.1, 59.5 및 56.7 ℃였으며, 이는 동일한 pH 조건에서 야생형보다 3.2, 4.6 및 1.8 ℃ 높게 나타났다. 특히, V181A 돌연변이체의 녹는점은 pH 3.0 조건에서 야생형보다 9.8 ℃ 더 높게 나타났다.

[0061] **실시예 4. 복수의 돌연변이 잔기를 가지는 효소의 열 안정성 확인**

[0062] 헴 단백질과 상호작용할 수 있는 복수의 돌연변이 아미노산 잔기를 가지는 돌연변이 효소의 녹는점을 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 가장 우수한 열 안정성을 보여준 V181A 돌연변이 효소를 선정하여 pH 조건을 달리하면서 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 이중 돌연변이체(E40S/V181A)와 삼중 돌연변이체(E40S/G86I/V181A)는 야생형에 비해 상당히 향상된 열역학적 안정성을 보였으며, 삼중 돌연변이체의 경우, 녹는점이 15 ℃ 가량 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0063] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자는 헴과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기의 수가 증가할수록 효소의 열 안전성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0065] **실시예 5. 복수의 돌연변이 잔기를 가지는 효소의 보관 안정성 확인**

[0066] 열안전성이 증가된 돌연변이 효소의 동역학적 보관 열안전성을 확인하였다. 구체적으로, 리그닌 과산화효소의 야생형 및 돌연변이체(V181A, E40S/V181A 및 E40S/G86I/V181A)를 50° C 인큐베이터에서 pH 6의 10mM 아세트산 나트륨 완충액에 저장하고 잔류 활성을 얼음물에 식힌 다음, pH 3의 0.1M Britton-Robinson 완충액에서 측정하였다. 불활성화 상수는 잔류 활성 및 시간의 자연 로그를 사용하여 선형 회귀를 플롯팅하여 결정하였다. 그 결과, 하기 표 2 및 도 5에 나타낸 바와 같이, V181A와 E40S/V181A의 반감기는 야생형 리그닌 과산화효소에 비하여 각각 43배와 119배 가량, 삼중 돌연변이 E40S/G86I/V181A의 경우, 반감기가 146배 가량 더 길게 나타났다.

표 2

[0068]

	k_d (hr^{-1})	$t_{1/2}$ (hr)	Fold
WT	0.28	3.83	-
V181A	0.40 X10^{-2}	165.9	43
E40S/V181A	0.15 X10^{-2}	455.1	119
E40S/G86I/V181A	0.12 X10^{-2}	558.7	146

[0070] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자는 헴과의 상호작용이 효소의 열역학적 안정성뿐만 아니라 동역학적 보관 열안정성 증가에도 크게 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0072] **실시예 6. 돌연변이 잔기를 가지는 효소의 동력학적 특성 확인**

[0073] 열 안정성이 증진된 돌연변이 효소의 효소 활성을 확인하였다. 구체적으로 야생형 및 돌연변이 리그닌 과산화효소의 K_{cat} 값 및 K_m 값을 확인하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0074]

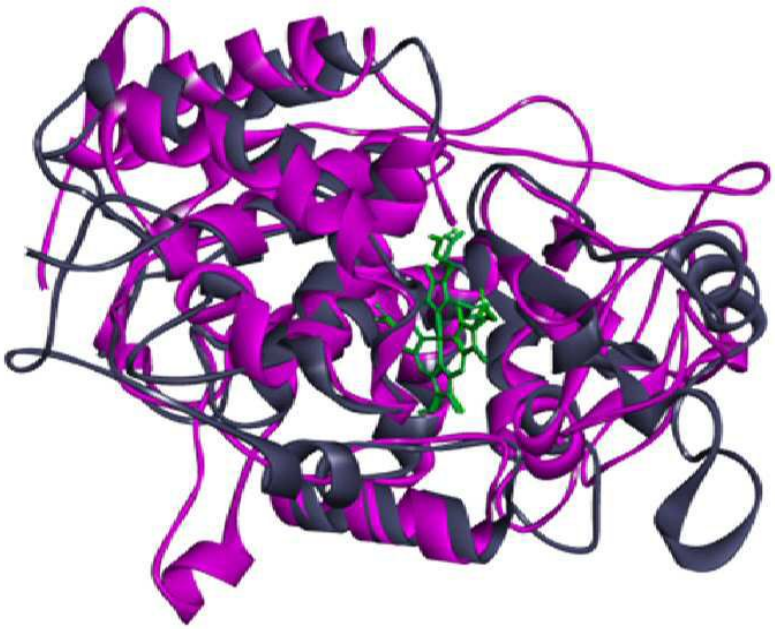
	$k_{cat}(s^{-1})$	$K_m(\mu M)$	$k_{cat}/K_m(mM^{-1}s^{-1})$
WT	18.19	86.74	209.67
V181A	19.31	111.31	173.51
E40S/V181A	24.03	123.66	194.36
E40S/G86I/V181A	25.80	143.41	179.87

[0076] 그 결과, 돌연변이 효소의 K_{cat} 값 및 K_m 값은 야생형에 비해 오히려 증가하여, 돌연변이 효소의 효소활성이 증진되는 것을 확인할 수 있었으며, 산화환원 매개체인 베라트릴 알코올(veratryl alcohol: VA)의 농도를 변화시키면서 촉매의 동역학 매개변수를 확인했을 때에도, 도 6에 나타낸 바와 같이, 야생형에 비해 돌연변이체의 효소활성이 증진된 것을 확인할 수 있었다.

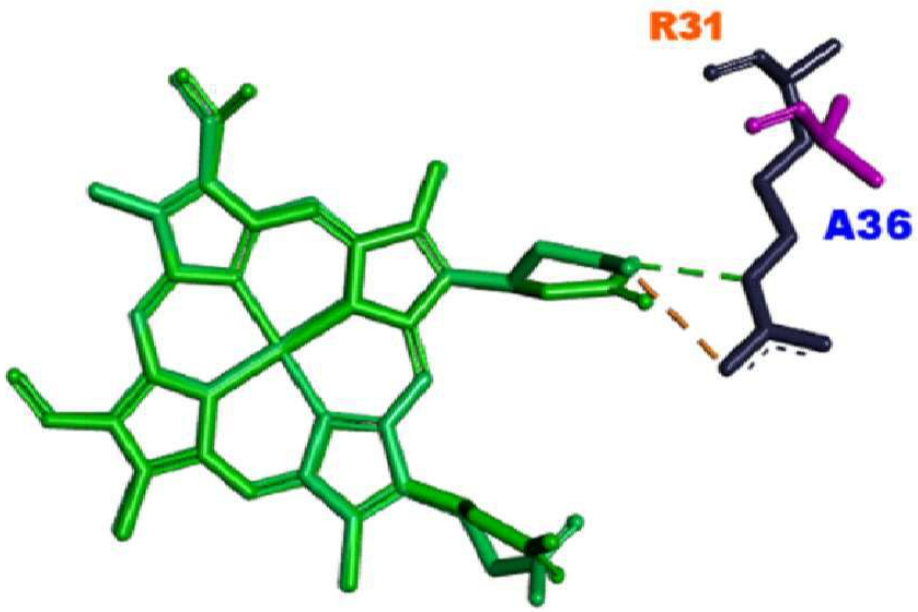
[0078] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

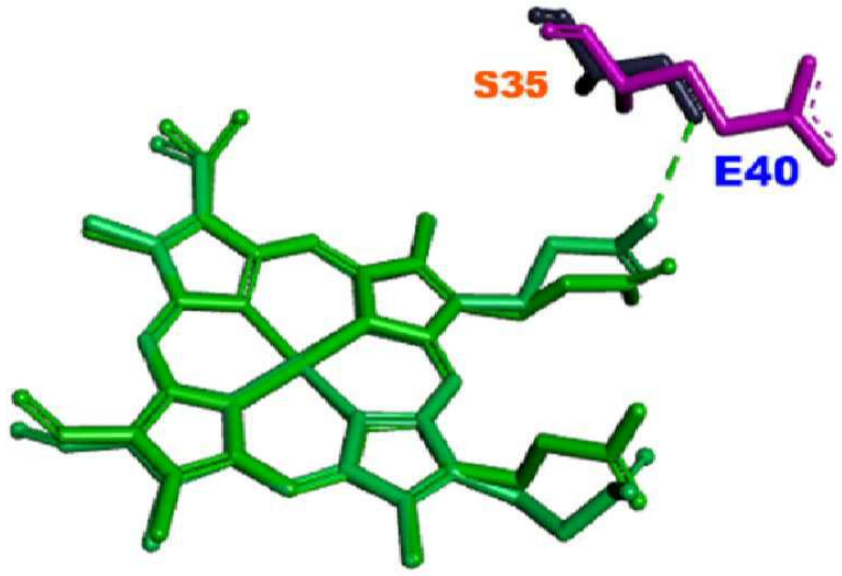
도면1a



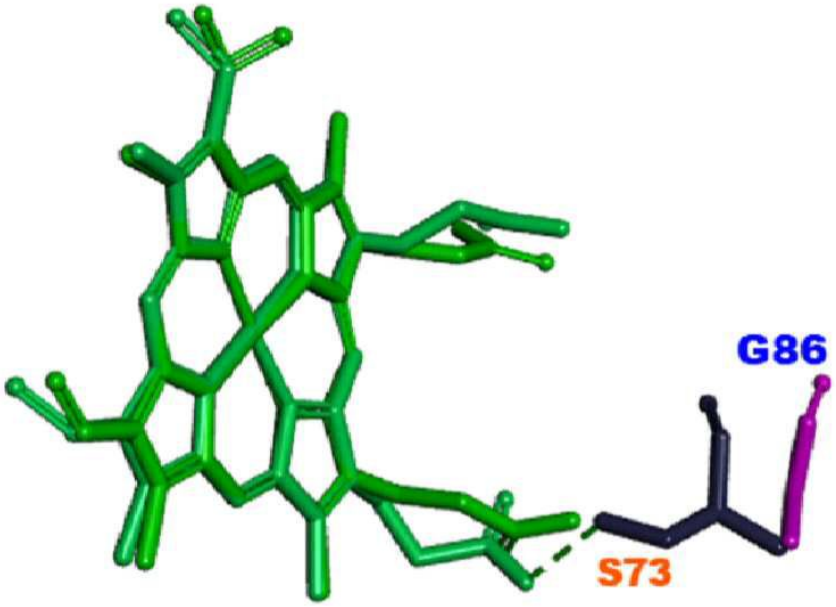
도면1b



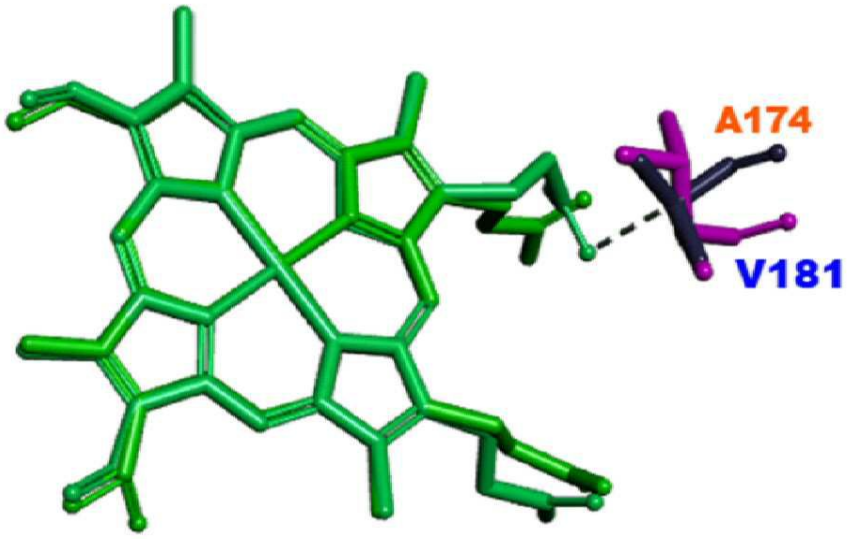
도면1c



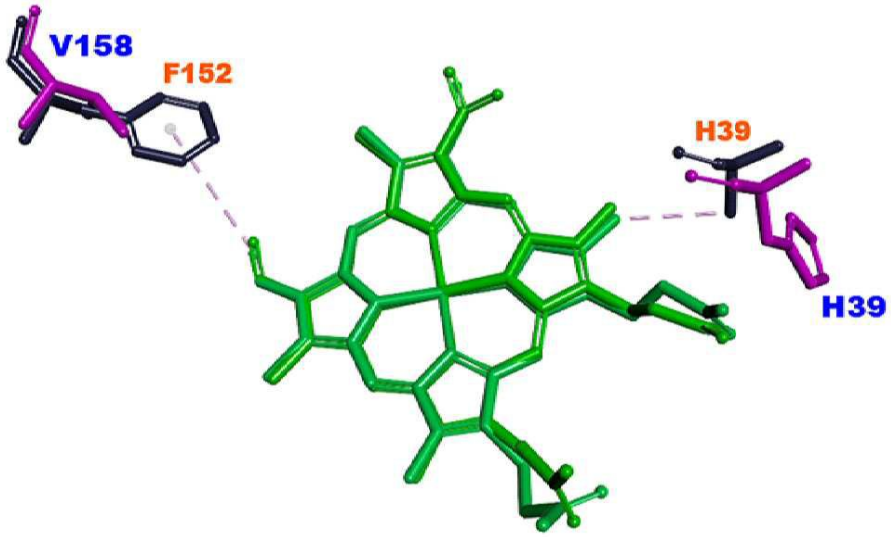
도면1d



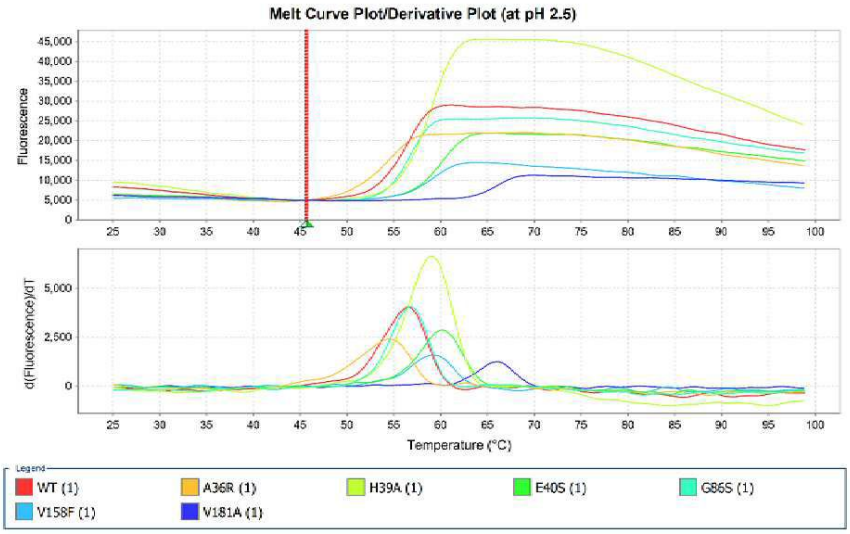
도면1e



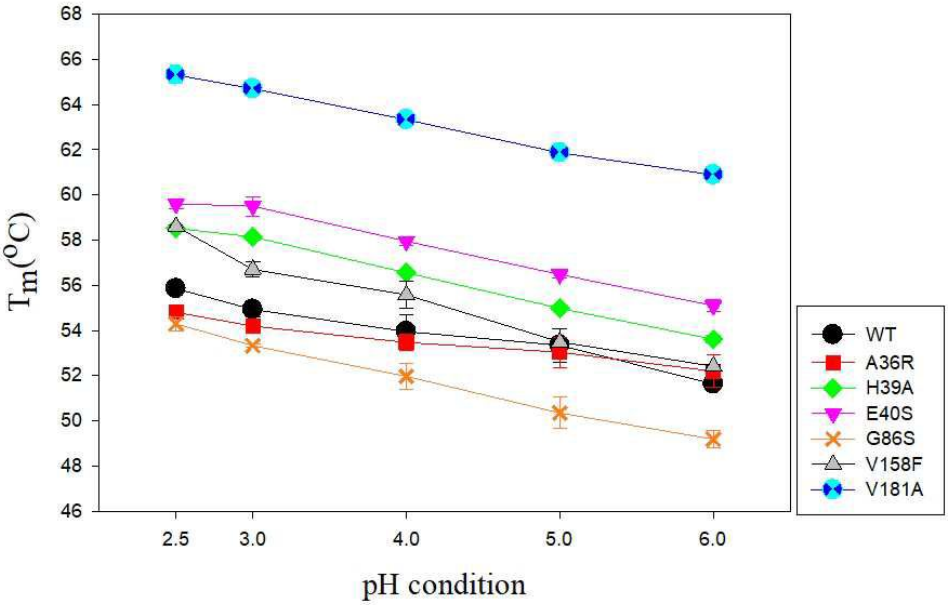
도면1f


V158
F152
H39
H39

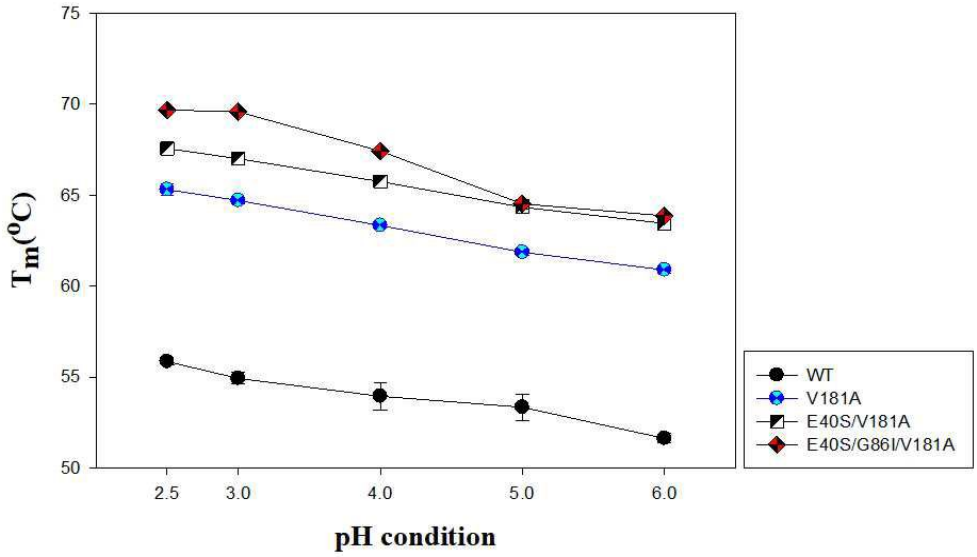
도면2


Melt Curve Plot/Derivative Plot (at pH 2.5)
Fluorescence
d(Fluorescence)/dT
Temperature (°C)
Legend
WT (1)
A36R (1)
H39A (1)
E40S (1)
G86S (1)
V158F (1)
V181A (1)

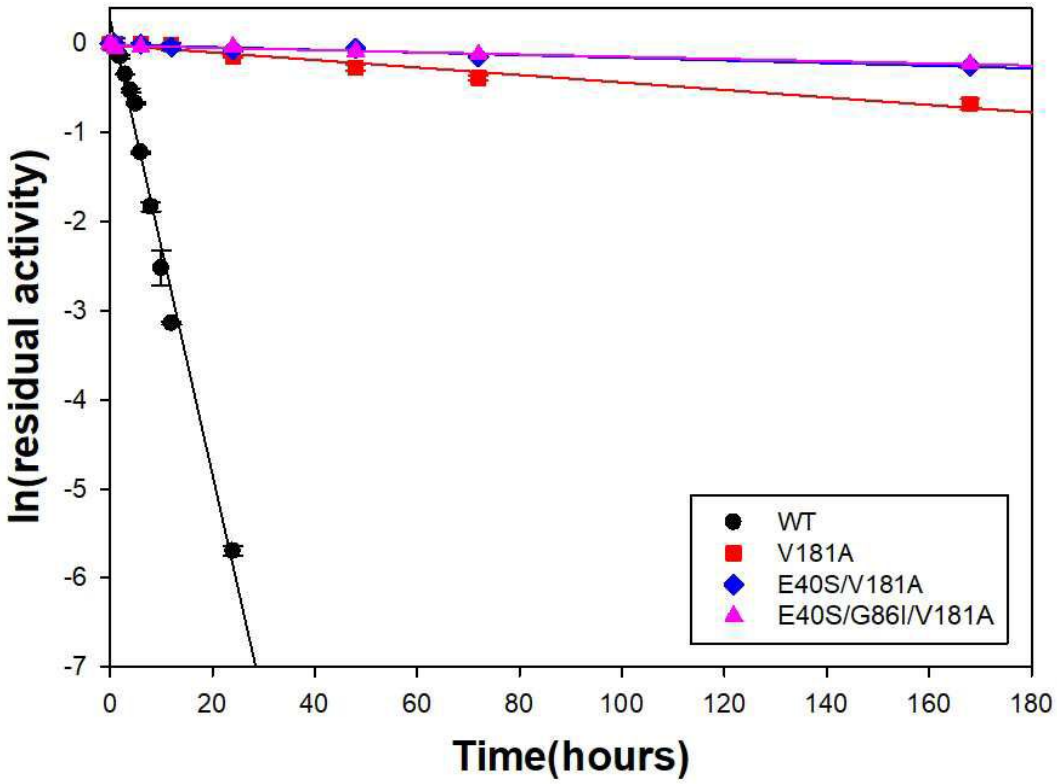
도면3


68
66
64
62
60
58
56
54
52
50
48
46
Tm(°C)
2.5
3.0
4.0
5.0
6.0
pH condition
WT
A36R
H39A
E40S
G86S
V158F
V181A

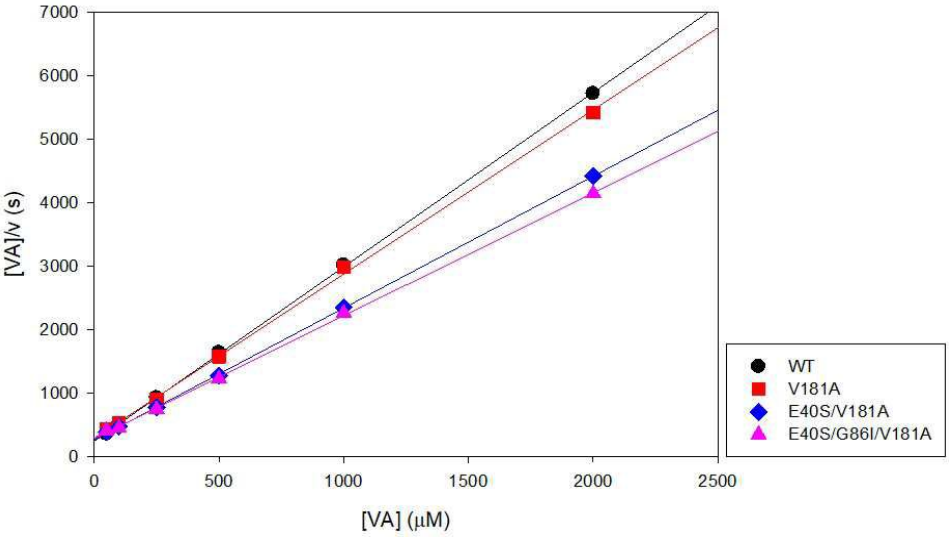
도면4


75
70
65
60
55
50
Tm(°C)
2.5
3.0
4.0
5.0
6.0
pH condition
WT
V181A
E40S/V181A
E40S/G86I/V181A

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> Lignin peroxidase variant with enhanced thermal stability through interaction with heme protein

<130> PN142225

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A36R DNA sequence

<400> 1

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtcgtgaagc tcatgaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata ttggcctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgcgt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagtt aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 2

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E40S DNA sequence

<400> 2

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtgcagaagc tgcggaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata ttggcctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgcgt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagtt aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 3

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G86S DNA sequence

<400> 3

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtgcagaagc tcatgaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata tttctctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgcgt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagtt aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 4

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V181A DNA sequence

<400> 4

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtgcagaagc tcatgaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata ttggcctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgcgt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagcg aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 5

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H39A DNA sequence

<400> 5

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtgcagaagc tgcggaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata ttggcctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgcgt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagtt aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 6

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V158F DNA sequence

<400> 6

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtgcagaagc tcatgaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata ttggcctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgctt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagtt aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 7

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G86I DNA sequence

<400> 7

catatggcgg cggtgattga aaaacgtgcg acctgtagca atggtaaaac ggttggtgat 60

gcgagctgtt gtgcgtggtt cgatgttctg gatgatattc agcaaaacct gtttcatggc 120

ggtcaatgcg gtgcagaagc tcatgaaagt atccgtctgg ttttccacga tagtattgca 180

atctccccgg caatggaagc acagggtaaa tttggcggtg gcggtgcaga tggtagcatt 240

atgatcttcg atgacattga aaccgctttt catccgaata ttattctgga tgaaatcgtt 300

aaactgcaga aaccgtttgt gcaaaaacac ggcgttacgc cgggtgactt catcgcgttt 360

gccggcgcag tcgctctgtc taactgtccg ggtgccccgc agatgaactt tttcaccggt 420

cgtgcaccgg caacgcaacc ggcaccggat ggtctggtcc cggaaccgtt ccataccgtg 480

gaccagatta tcaaccgcgt taatgatgca ggcgaatttg acgaactgga actggtttgg 540

atgctgagcg cacactctgt ggcagcagtt aacgatgtcg acccgaccgt ccagggtctg 600

ccgttcgata gtacgccggg tatttttgac tcccagtttt tcgtggaaac ccaactgcgt 660

ggtacggcat tcccgggtag cggcggtaat cagggcgaag tggaatctcc gctgccgggt 720

gaaattcgca tccaatcaga tcacaccatt gcacgtgact cgcgcacggc ttgcgaatgg 780

cagtcatttg tcaacaatca atcgaaactg gtggatgact ttcagttcat ctttctggcg 840

ctgacccagc tgggtcaaga tccgaacgcc atgacggatt gcagcgacgt tattccgcag 900

tctaaaccga tcccgggtaa tctgccgttc agctttttcc cggccggcaa aaccattaaa 960

gatgtggaac aagcatgtgc tgaaaccccg tttccgacgc tgacgacgct gccgggtccg 1020

gaaacctcgg tccaacgcat cccgccgccg ccgggtgcct gagaattc 1068

<210> 8

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A36R Protein sequence

<400> 8

His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp
20 25 30

Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Arg Glu Ala His
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala
50 55 60

Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile
65 70 75 80

Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu
85 90 95

Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val

100 105 110

Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn

115 120 125

Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala

130 135 140

Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val

145 150 155 160

Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu

165 170 175

Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp

180 185 190

Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile

195 200 205

Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe

210 215 220

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly

225 230 235 240

Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr

245 250 255

Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp

260 265 270

Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro

275 280 285

Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile

290 295 300

Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys

305 310 315 320

Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr

325 330 335

Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly

340 345 350

Ala *** Glu Phe

355

<210> 9

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> E40S Protein sequence

<400> 9

His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp

20 25 30

Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His

35 40 45

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

50 55 60

Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile

65 70 75 80

Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu

85 90 95

Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val

100 105 110

Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn

115 120 125

Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala

130 135 140

Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val

145 150 155 160

Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu

165 170 175

Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp

180 185 190

Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile

195 200 205

Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe

210 215 220

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly

225 230 235 240

Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr

245 250 255

Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp

260 265 270

Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro

275 280 285

Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile

290 295 300

Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys

305 310 315 320

Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr

325 330 335

Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly

340 345 350

Ala *** Glu Phe

355

<210> 10

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G86S Protein sequence

<400> 10

His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp

20 25 30

Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His

```
          35                  40                  45
Glu Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala

     50                  55                  60
Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile
 65                  70                  75                  80
Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Ser Leu
                 85                  90                  95
Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val
            100                 105                 110
Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn
        115                 120                 125

Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala
    130                 135                 140
Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val
145                 150                 155                 160
Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu
                165                 170                 175
Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp
            180                 185                 190
Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile

        195                 200                 205
Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe
    210                 215                 220
Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly
225                 230                 235                 240
Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr
                245                 250                 255
Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp
            260                 265                 270

Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro
        275                 280                 285
```

Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile
290 295 300
Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys
305 310 315 320
Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr
325 330 335
Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly

340 345 350
Ala *** Glu Phe
355

<210> 11
<211> 356
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> V181A Protein sequence
<400> 11
His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp
20 25 30
Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His

35 40 45
Glu Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala
50 55 60
Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile
65 70 75 80
Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu
85 90 95
Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val
100 105 110

Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn
115 120 125

Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala
130 135 140
Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val
145 150 155 160
Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu
165 170 175
Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Ala Asn Asp

180 185 190
Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile
195 200 205
Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe
210 215 220
Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly
225 230 235 240
Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr
245 250 255

Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp
260 265 270
Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro
275 280 285
Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile
290 295 300
Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys
305 310 315 320
Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr

325 330 335
Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly
340 345 350
Ala *** Glu Phe
355
<210> 12
<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H39A Protein sequence

<400> 12

His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp
20 25 30

Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala Ala
35 40 45

Glu Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala
50 55 60

Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile
65 70 75 80

Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu
85 90 95

Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val
100 105 110

Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn
115 120 125

Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala
130 135 140

Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val
145 150 155 160

Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu
165 170 175

Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp
180 185 190

Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile
195 200 205

Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe
210 215 220

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly
225 230 235 240

Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr
245 250 255
Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp
260 265 270
Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro
275 280 285
Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile
290 295 300
Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys

305 310 315 320
Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr
325 330 335
Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly
340 345 350
Ala *** Glu Phe
355

<210> 13
<211> 356
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> V158F Protein sequence
<400> 13
His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys

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

Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile
65 70 75 80

Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu
85 90 95
Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val
100 105 110
Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn
115 120 125
Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala
130 135 140
Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val

145 150 155 160
Asp Gln Ile Ile Asn Arg Phe Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu
165 170 175
Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp
180 185 190
Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile
195 200 205
Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe
210 215 220

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly
225 230 235 240
Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr
245 250 255
Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp
260 265 270
Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro
275 280 285
Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile

290 295 300
Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys

305 310 315 320

Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr

325 330 335

Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly

340 345 350

Ala *** Glu Phe

355

<210> 14

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G86I Protein sequence

<400> 14

His Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys

14 18 23 28

Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp

33 38 43

Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His

48 53 58

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

63 68 73

Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile

78 83 88 93

Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Ile Leu

98 103 108

Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val

113 118 123

Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn

128 133 138

Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala

143 148 153

Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val

158 163 168 173

Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu

178 183 188

Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp

193 198 203

Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile

208 213 218

Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe

223 228 233

Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly

238 243 248 253

Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr

258 263 268

Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp

273 278 283

Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro

288 293 298

Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile

303 308 313

Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Lys

318 323 328 333

Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr

338 343 348

Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly

353 358 363

Ala *** Glu Phe

368